

Compréhension du rôle morphogénétique de l'apoptose et de son évolution: apports de l'étude de la métamorphose de Ciona intestinalis (Tunicata) et de Clytia hemisphaerica (Cnidaria)

Gabriel Krasovec

▶ To cite this version:

Gabriel Krasovec. Compréhension du rôle morphogénétique de l'apoptose et de son évolution : apports de l'étude de la métamorphose de Ciona intestinalis (Tunicata) et de Clytia hemisphaerica (Cnidaria). Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS266 . tel-02868517

HAL Id: tel-02868517 https://theses.hal.science/tel-02868517

Submitted on 15 Jun2020

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.





Thèse de doctorat de Sorbonne Université École doctorale 515 Complexité du Vivant Institut de Biologie Paris-Seine

Thèse de doctorat présentée pour obtenir le grade de Docteur de Sorbonne Université

Par Gabriel KRASOVEC

Compréhension du rôle morphogénétique de l'apoptose et de son évolution: apports de l'étude de la métamorphose de *Ciona intestinalis* (Tunicata) et de *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria)

Composition du jury:

PASINI Andrea, CR, Aix Marseille Université	Rapporteur
RÖTTINGER Éric, DR, Université Nice Sophia-Antipolis	Rapporteur
BONNAUD Laure, PR, MNHN, Sorbonne Université	Examinateur
GAZAVE Eve, CR, Université Paris-Diderot	Examinateur
ROURE Agnès, IE, Sorbonne Université	Examinateur invité
CHAMBON Jean-Philippe, MC, Sorbonne Université	Directeur de thèse
QUÉINNEC Éric, PR, Sorbonne Université	Directeur de thèse

À mes métazoaires préférés,

Résumé

L'apoptose est une mort cellulaire très bien caractérisée d'un point de vue morphologique et biochimique mais dont le rôle morphogénétique a longtemps été restreint à une destruction des structures transitoires ou surnuméraires (Fonction Destructrice de l'Apoptose, FDA). Plus récemment une capacité des cellules apoptotiques à modifier le comportement (migration) ou le destin (prolifération, différenciation, survie) des cellules voisines a été mise en en évidence dans des modèles expérimentaux et des contextes morphogénétiques très divers. Nous avons décidé de regrouper et nommer ces capacités au sein d'une même fonction morphogénétique, la Fonction Constructrice de l'Apoptose (FCA).

Afin de mieux comprendre le fonctionnement et l'évolution de la FCA, j'ai utilisé le cadre morphogénétique de la métamorphose, caractérisée par la présence simultanée d'apoptose et de l'ensemble des comportements et destins cellulaires, chez deux organismes éloignés phylogénétiquement, le cnidaire *Clytia hemisphaerica* et le tunicier *Ciona intestinalis*.

Chez *C. hemisphaerica*, j'ai identifié et caractérisé dans la larve planula en métamorphose de l'apoptose ectodermique et endodermique, la prolifération et la différenciation des i-cells en nématocytes et la migration de ces derniers. Ces résultats confortent l'utilisation de ce modèle pour étudier la FCA.

Chez *C. intestinalis*, j'ai démontré que la migration des Cellules Germinales Primordiales (PGC) est un exemple de FCA, permettant ainsi une caractérisation moléculaire de cette dernière.

J'ai ensuite étudié l'évolution des voies de signalisations apoptotiques par des approches phylogénétiques sur les gènes acteurs de l'apoptose, notamment les caspases, gènes au centre de la régulation de la FDA et de la FCA. J'ai ainsi montré qu'une grande modularité existe dans la régulation de l'apoptose entre les phylums, invitant à explorer plusieurs modèles pour comprendre l'évolution des fonctions morphogénétiques de l'apoptose.

Abstract

Apoptosis has been considered as merely required for the removal of supernumerary cells or larval structures by dismantling cells with a characteristic and conserved set of morphological and biochemical features (**Destructive Function of Apoptosis, DFA**). Accumulating evidences show how apoptotic cells can trigger and modulate other cell behaviors (migration) or cell fates (proliferation, survival, differentiation) during very different morphogenetic events in numbers of animals. These studies led us to define a novel morphogenetic role of apoptosis, hereafter referred as the **Constructive Function** of **Apoptosis** (**CFA**).

To investigate the CFA and its evolution in animals, I initiated characterization of CFA during metamorphosis of two distantly related species with a key phylogenetic position, the cnidarian *Clytia hemisphaerica*, and the tunicate, *Ciona intestinalis*.

In *C. hemisphaerica*, I have identified and characterized endodermic and ectodermic apoptosis in planula larva. This apoptosis occurred in the larva at the same area and at the same time with the proliferation and differentiation of i-cells and nematocytes migration. All together, these results arguing in favor of planula metamorphosis as an excellent model to study CFA.

In *C. intestinalis*, I have demonstrated that primordial germ cells migration is due to CFA during the tail regression process, leading to the molecular characterization of CFA in this model.

Finally, I address the question of apoptotic signaling pathway evolution in metazoans. I have conducted robust phylogenetic reconstruction of the cell death machinery, especially on caspases that are central regulating genes in DFA and CFA, in order to establish orthology relationships between genes that compose the cell death machinery at the metazoan scale. My results suggested an unpredicted complexity of the evolution of the apoptosis regulatory network in metazoans, suggesting to increase the number of models to address the evolution of the morphogenetic functions of apoptosis.

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse Jean-Philippe Chambon et Éric Quéinnec pour m'avoir donné l'opportunité de m'épanouir au travers d'un sujet de thèse que j'ai tout simplement adoré. Je leur exprime mes plus grandes gratitudes pour leur encadrement tout au long de ces trois années. Je souhaite souligner leurs qualités tant professionnelles que personnelles, qui ont permis la réalisation de ce travail dans un cadre, qui, au-delà du professionnel, m'a énormément apporté personnellement.

Je remercie naturellement Dominique Higuet, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son UMR7138 Evolution Paris Seine.

Un grand merci aux membres de mon jury de thèse qui ont bien voulu évaluer mon travail, Éric Röttinger, Andrea Pasini, Eve Gazave, Agnès Roure, et Laure Bonnaud.

Je remercie également tous ceux m'ayant permis de gérer le quotidien de ces trois ans. Merci donc à Danielle, Latifa et Paula.

Mes remerciements vont aux membres de mon équipe, Michael Manuel et Hervé Le Guyader, ainsi que Muriel Jager. Si Muriel fait tant parler d'elle dans les remerciements des manuscrits successifs de l'équipe, ce n'est pas par hasard. Merci pour ton aide et ta patience fondamentales pour le bon déroulement des manips! Enfin Karen Pottin (K-P, prononcez à l'anglosaxonne svp) merci pour ton sens du contact humain, ta facilité à parler et ta capacité à inviter les autres à s'ouvrir davantage, des points qui je pense, m'ont beaucoup apportés au cours de ces trois années.

Je remercie l'ensemble de mon équipe qui a dû, malgré elle, entendre une musique souvent peu conventionnelle, mais particulièrement bien venue en fin de thèse.

L'ensemble des thésards et stagiaires que j'ai rencontré se doit d'être remercié, en espérant n'oublier personne, je remercie bien évidemment Thomas, pilier de thèse durant deux ans, qui m'a beaucoup apporté personnellement. Outre nos nombreuses discussions tardives et enrichissantes, je connais grâce à toi OSS mieux que personne, une qualité qui, j'en suis sûr, me servira pendant des millions d'années. Merci Anne-So, ton soutien indéfectible, ton franc parlé, juste et éclairé, m'a toujours apporté personnellement et professionnellement, et jamais je n'oublierai les pauses thé qui ont été une partie des plus structurantes de mon emploi du temps. Juliette, ta gentillesse légendaire

et ton soutien se doivent d'être remerciés. Unique thésarde de ma génération, ta présence fut fondamentale et ne peut être oubliée.

Enfin, Juliette, Anne-So et Thomas, je me dois de vous féliciter pour avoir supporté mes remarques et centres d'intérêt parfois surprenants pour ne pas dire obscurs. J'espère ne pas vous avoir dégoûté des hamsters, des limules, des blagues peu démocratiques et j'en passe.

Raphaël Meheust, je crois que des remerciements s'imposent pour les débats des plus constructifs auxquels tu as participé, t'investissant corps et âme pour mettre au point des bières fluorescentes, des gloasts à la cione et autres idées culinaires dont une start-up ne pourrait que rêver ! Merci à tous les thésards et post-docs du labo, Arnaud pour les discussions culinaires avec Raph, Marguerite pour avoir aimé les gloasts, Romain, avec qui parler histoire et géopolitique est toujours enrichissant, ainsi que Janahnan, Guillaume, Andrew. Romain, désolé, mais tu n'arriveras jamais à me convaincre de faire du sport.

Je tiens à remercier Cécile (prononcez à l'anglo-saxonne svp - et non, aucun rapport avec un organisme sessile), avec qui j'ai passé deux mois très enrichissants personnellement comme professionnellement. Un encadrement de stage que j'ai apprécié pour des raisons multiples. Merci également Cécile pour avoir été présente cette fameuse matinée, où mon système nerveux central semblait des plus perturbés par un incident malheureux.

Merci à Marion Rosello, pour m'avoir aidé en début de thèse à gérer des planulas pas toujours très coopératives (contrairement aux polypes sessiles). Travailler avec toi fut toujours un plaisir.

Je remercie ma famille, sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui, et particulièrement ma mère pour son soutien qui n'a jamais failli et a toujours été présente pour tous les aspects de ma vie. Merci à mes frères et sœur, Caroline (Carotte), David (Davidou) et Frédéric (Lélic), avec qui nous nous soutenons sans coup faillir, ainsi que Marc, avec qui la proximité actuelle est une victoire qui ne se mesure qu'à la lumière des difficultés traversées.

Je remercie mes amis d'enfance, qui m'ont énormément apporté tout au long de ces années, et qui ont activement et chaleureusement participé à mon développement personnel et ont suivi mon travail de thèse de près ou de loin, Florian Menu, Alexandre Corbet, Sylvain Brischoux. Sylvain, un petit clin d'œil s'impose concernant nos parties de Catane enflammées, ou trahisons, alliances et intrigues politiques ont été une source de décompression des plus appréciables. Merci à mes amis m'ayant soutenu de près ou de loin, notamment Alice Murillio et Alice Percher.

Je me dois de remercier Valentine Charbonnier, qui s'est affectueusement et chaleureusement portée volontaire pour...corriger les multiples coquilles (Mollusca).

8

Je remercie également Agnès Roure et Sébastien Darras pour m'avoir accueilli un mois en début de thèse au laboratoire Arago de Banyuls-sur-mer, et avoir ainsi participé activement à ma formation.

Mes remerciements vont, bien entendu, aux membres de mon comité de thèse : Jérôme Gros, Christine Vesque et Sébastien Darras pour les réflexions et les discussions toujours constructives.

Je remercie également la plateforme aquatique de l'IBPS pour avoir réceptionné les colis de Cione durant ces années de travail, et pour leur aide et disponibilité dans la gestion de l'animalerie Cione.

Il m'importe de remercier *Eukaryotus Josephina* (nom vernaculaire : Joséphine), que j'ai malheureusement gardée peu de temps. Merci pour cette initiative, Jean-Phi, cela m'a changé les idées à un moment où j'en avais besoin. Merci Joséphine de m'avoir aidé dans mes tâches ménagères. Remplissant ses abajoues avec les miettes de pain réparties sur ma table à manger, Joséphine m'a fait gagner des milliers d'heures de ménage, temps que j'ai ensuite réinvesti dans mon travail de thèse. Si certains voudront, après lecture de ce passage, débattre sur le terme « abajoue » en apposition à « bajoue », sachez que je suis prêt à en découdre.

Index des figures et des tableaux

Figure 1: Dessins de morts cellulaires	19
Figure 2: Caractéristiques morphologiques de morts cellulaires en microscopie électronique	20
Figure 3: Représentation de l'ensemble des morts cellulaires définies par le NCCD-2018	23
Figure 4: Progression des étapes de l'apoptose au cours du temps	24
Figure 5: Images de membres postérieurs de souris	28
Figure 6: Intervention de l'apoptose dans l'élimination des tissus interdigitaux	29
Figure 7: Caenorhabditis elegans, individu hermaphrodite	30
Figure 8: Embryon de Caenorhabditis elegans	31
Figure 9: Image montrant l'évolution de la métamorphose du tétard de xénope	33
Figure 10: Changements anatomiques du tube digestif au cours de la métamorphose de Bufo bufo	33
Figure 11: Coupes histologiques de pancréas de Bufo bufo avec marquage TUNEL	34
Figure 12: Hamster du genre Phodopus	37
Figure 13: Coupes d'ovaires de Phodopus sungorus avec marquage TUNEL	38
Figure 14: Schémas récapitulatifs illustrant la vision classique de l'apoptose	39
Figure 15: Représentation schématique de l'apoptose constructrice	41
Figure 16: Dynamique de la fonction de remodelage de l'épithélium par les cellules en apoptose	42
Figure 17: Modèle représentant l'effet de Mahakali	45
Figure 18: Mort cellulaire induite par blessure puis prolifération	48
Figure 19: Schéma illustrant le rôle de l'apoptose dans la régénération d' Hydra vulgaris	50
Figure 20: Régénération induite par les cellules en apoptose chez la souris	52
Figure 21: Structure générale d'une caspase	56
Figure 22: Diversité comparée des caspases entre mammifères, nématode et drosophile	56
Figure 23: Représentation schématique des trois modes d'activation des caspases chez les mammifères	59
Figure 24: Classification des caspases de mammifères en fonction des groupes fonctionnels	61
Figure 25: Schématisation des signalisations apoptotiques de références	68
Figure 26: La voie de signalisation apoptotique dépendante de la caspase 2	74
Figure 27: Analyse phylogénétique de Lamkanfi et al., 2002.	81
Figure 28: Distribution des acquisitions des principaux acteurs apoptotiques sur une phylogénie	84
Figure 29: Anatomie d'un individu adulte Ciona intestinalis	90
Figure 30: Cycle de vie de Ciona intestinalis	<u>91</u>
Figure 31: Phylogénies moléculaires des tuniciers	93
Figure 32: Anatomie de la larve nageant de Ciona intestinalis	96
Figure 33: Évolution de la métamorphose de Ciona intestinalis	96
Figure 34: Événements moléculaires et cellulaires successifs au début de la métamorphose	99
Figure 35: Apoptose au cours de la régression caudale	101
Figure 36: Séquence d'images temporelles de marquage anti-VASA chez la larve de Ciona	101
Figure 37: Phylogénie moléculaire des cnidaires basée sur des séquences d'ADN ribosomaux	104
Figure 38: Cycle de vie de Clytia hemisphaerica	105
Figure 39: Anatomie d'une méduse de Clytia hemisphaerica	106

Figure 40: Développement embryonnaire de l'hydrozoaire Clytia gregarium	107
Figure 41: Diagramme de la succession des stades de la métamorphose de Clytia gregarium	108
Figure 42: Evolution de la métamorphose de la larve planula de Clytia hemisphaerica	109
Figure 43: Déroulement de la métamorphose de la larve planula d'Hydractinia echinata	116
Figure 44: Marquage TUNEL sur des planulas de Hydractinia echinata	116
Figure 45: Hybridation in situ révélant les i-cells chez Hydractinia echinata	118
Figure 46: Profil d'expression de Che-piwi post-blastula de Clytia hemisphaerica	119
Figure 47: Marquage des noyaux en phase-S chez la planula d'Hydractinia echinata	120
Figure 48: Déroulement de la métamorphose de la larve planula de Clytia hemisphaerica	125
Figure 49: Profil apoptotique polarisé de la planula de Clytia hemisphaerica	127
Figure 50: Larve en métamorphose avec marquage YL1/2	128
Figure 51: Profils apoptotiques de Clytia hemisphaerica	129
Figure 52: Hybridations in situ du gène Che-Piwi chez la planula de Clytia hemisphaerica	131
Figure 53: Prolifération cellulaire et migration des nématocytes chez Clytia hemisphaerica	132
Figure 54: Profil apoptotique polarisé de Clytia hemisphaerica	136
Figure 55: Comportements et destins cellulaires intervenant au cours de la métamorphose	138
Figure 56: Proposition de scénario évolutif des gènes Hox	147
Figure 57: Colinéarité dans l'expression des gènes Hox chez la larve de Ciona intestinalis	148
Figure 58: Profils d'expression des gènes Ci-hox chez Ciona intestinalis	150
Figure 59: Vue ventrale schématique d'un embryon en développement de Ciona intestinalis	152
Figure 60: Contrôle du « patterning » de l'épiderme de la queue de la larve de cione	152

Figures de l'article soumis à Developemental Biology non numérotées ici. Article en pages 153 à 186.

Figure 61: Représentation du rôle des gènes Hox dans la régulation de l'apoptose	189
Figure 62: Mesure de la longueur relative de l'endoderme caudal de Ciona intestinalis	191
Figure 63: Longueur relative de l'endoderme caudal de Ciona	191
Figure 64: Phylogénie des caspases de vertébrés et de cione	197
Figure 65: Alignement des séquences protéiques des caspases de vertébrés et de Ciona	200
Figure 66: Phylogénie des caspases-CARD à l'échelle des deutérostomiens	203
Figure 67: Phylogénie des caspases-CARD à l'échelle des métazoaires	215
Figure 68: Phylogénie des Bcl-2 à l'échelle des métazoaires	216
Figure 69: Hybridations in situ des gènes Ci-bax, Ci-bok et Ci-bcl-xl sur des larves de Ciona	219
Figure 70: Expression relative des gènes Ci-bax, Ci-bok et Ci-bcl-xl	219
Figure 71: Effet des inhibiteurs de caspases	220
Figure 72: Répartition des acteurs impliqués (potentiellement) dans les voies mitochondriales	226
Figure 73: Représentation des voies apoptotiques mitochondriale des métazoaires.	230
Figure 74: Hybridation in situ sur des larves LTB de la caspase initiatrice Ci-casp8/10	234
Figure 75: Effet des inhibiteurs de caspases la régression caudale de Ciona	235
Figure 76: Alignement du domaine P20 des caspases à pro-domaine	235
Figure 77: Phylogénie des caspases de vertébrés et d'insectes	237
Figure 78: Répartition sur un arbre phylogénétique des métazoaires de la fonction constructrice	245

Tableau 1: Nomenclature des caspases de Ciona	199
Tableau 2: Nomenclature des caspases-CARD des deutérostomiens	204
Tableau 3: Nomenclature des caspases-CARD des métazoaires	210
Tableau 4: Nomenclature des Bcl-2 des métazoaires	211
Tableau 5: Résultats des tests statistiques pour les inhibiteurs de caspases	221
Tableau 6: Résultats des tests statistiques pour les inhibiteurs de caspases	234

Abréviations

Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor-1

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

BH : Bcl-2 homology domain

CARD : Caspase recruitement domain

Caspase : Cysteinyl aspartate specific protease

Caspase-CARD : Caspase possédant un pro-domaine CARD

Caspase-DED : Caspase possédant un pro-domaine DED

DD : Death domain

DED : Death effector domain

DISC : Death-inducing signaling domains DED complex

FADD : Fas protein with DD

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

RAIDD : RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD

TRADD : TNF-R associated protein with DD

Table des matières

INTRODUCTION	17
I. LA MORT CELLULAIRE	17
I.1. Historique	17
I.2. Différentes morts cellulaires chez les métazoaires	22
I.2.a. La nomenclature définie par le comité sur la mort cellulaire (NCCD)	22
I.2.b. L'apoptose, une mort cellulaire bien caractérisée	24
II. RÔLES CLASSIQUES DE L'APOPTOSE	26
II.1. Embryogenèse	26
II.1.a. L'exemple de la digitation chez les vertébrés tétrapodes	27
II.1.b. Le développement de Caenorhabditis elegans	29
II.2. Métamorphose	31
II.2.a. La métamorphose des lissamphibiens anoures	32
II.2.b. La métamorphose des pupes chez les insectes	34
II.3. Le maintien homéostatique des tissus	35
II.4. Synthèse sur le rôle classique de l'apoptose	38
III. LA FONCTION CONSTRUCTRICE DE L'APOPTOSE	40
III.1. Le remodelage mécanique (mechanical remodelling)	41
III.2. La différenciation	43
III.3. L'induction de survie	44
III.4. La migration	45
III.4.a. L'attraction et la migration induites sur des cellules immunitaires	46
III.4.b. L'attraction par les cellules apoptotiques pour l'engouffrement	47
III.5. La prolifération	47
III.5.a. La régénération de la queue du têtard de Xenopus laevis	49
III.5.b. La régénération du cnidaire Hydra vulgaris dépend des cellules apoptotiques.	49
III.5.c. La régénération du foie de souris est caspase-dépendante	51
III.6. Synthèse sur le rôle constructif de l'apoptose	53
IV. BILAN SUR LES RÔLES MORPHOGÉNÉTIQUES DE L'APOPTOSE	54
V. LA FAMILLE MULTIGÉNIQUE DES CASPASES	55
V.1 Mode de fonctionnement des caspases	55
V.1.a. Structure des caspases	55
V.1.b. L'activation des caspases	57
V.1.c. L'inhibition des caspases par les inhibiteurs d'apoptose : les IAPs	58
V.2. Les groupes fonctionnels des caspases	60

V.2.a. Les caspases inflammatoires	61
V.2.b. Les caspases apoptotiques	63
1) La voie de signalisation intrinsèque	63
2) La voie de signalisation extrinsèque	69
3) Une voie de signalisation dépendante de la caspase 2	71
V.2.c. Synthèse sur les voies de signalisation apoptotiques	72
VI. L'ÉVOLUTION DES CASPASES	75
VI. L'ÉVOLUTION DES CASPASES VI.1. Les relations qui font consensus dans la littérature	75 76
VI. L'ÉVOLUTION DES CASPASES VI.1. Les relations qui font consensus dans la littérature VI.1.a. Les biais dans les analyses	75 76 76
 VI. L'ÉVOLUTION DES CASPASES VI.1. Les relations qui font consensus dans la littérature VI.1.a. Les biais dans les analyses VI.1.b. L'exemple d'une phylogénie des caspases faisant référence 	75 76 76 78
 VI. L'ÉVOLUTION DES CASPASES VI.1. Les relations qui font consensus dans la littérature VI.1.a. Les biais dans les analyses VI.1.b. L'exemple d'une phylogénie des caspases faisant référence VI.2. Des données émergentes chez des modèles non classiques 	75 76 76 78

PROBLÉMATIQUE	 5
- (-	

MODÈLES BIOLOGIQUES	
I. L'ASCIDIE <i>CIONA INTESTINALIS</i> (LINNAEUS, 1767)	89
I.1. Présentation générale	
I.2. Evolution et position phylogénétique	
I.2.a. Histoire et caractéristiques des tuniciers	
I.2.b. Phylogénie	92
I.3. Anatomie et cycle de vie de Ciona intestinalis	94
I.3.a. Anatomie de l'adulte	94
I.3.b. Embryogenèse et anatomie de la larve	95
I.4. La métamorphose	97
I.4.a. Les principales étapes de la métamorphose	97
I.4.b. Le déroulement de la régression caudale	97
I.5. Un modèle idéal pour étudier l'apoptose in vivo	100
II. LE CNIDAIRE <i>CLYTIA HEMISPHAERICA</i> (LINNAEUS, 1767)	102
I.1. Présentation générale	
II.2. Evolution et position phylogénétique	
II.2.a. Histoire et caractéristiques des cnidaires	
II.2.b. Phylogénie	
II.3. Cycle de vie et anatomie	104
II.3.a. Cycle de vie	104

II.3.b. Anatomie	106
II.4. Embryogenèse et métamorphose	

CHAPITRE I La métamorphose de Clytia hemisphaerica	111
I. LES CNIDAIRES, UN MODÈLE À EXPLORER POUR ÉTUDIER LA FCA	111
I.1. L'apoptose chez les cnidaires	112
I.1.a. Les acteurs apoptotiques des cnidaires	112
I.1.b. De l'apoptose au cours de la métamorphose des cnidaires : l'exemple d'Hy	edractinia
echinata	114
I.2. Coexistence de plusieurs comportements cellulaires	117
I.2.a. Les cellules souches des cnidaires, entre maintien et différenciation	117
I.2.b. Les nématocytes et les i-cells migrent au cours de la métamorphose	121
I.3. Clytia hemisphaerica, un organisme idéal pour étudier la FCA	122
II. ARTICLE Nº1	123
III. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE N°1	140
III.1. Synthèse	140
III.2. Perspectives	142

CHAPITRE II La régression caudale de Ciona intestinalis	145
I. LE RÔLE DES GÈNES HOX DANS LE DÉVELOPPEMENT	146
I.1 Les gènes Hox chez Ciona	146
I.1.a. Caractérisation des gènes Ci-hox	146
I.1.b. Les rôles des Ci-hox dans l'embryogenèse et la métamorphose	147
I.2. L'établissement de la polarité de l'épiderme de la nageoire dépend de deux gradients	
antagonistes	151
II. ARTICLE N° 2	153
III. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE N°2	187
III.1. Synthèse	187
III 2 Des gènes lley neuvent réguler l'anontese	100
III.2. Des genes nox peuvent reguler rapoptose	188

CHAPITRE III L'évolution des voies de signalisation apoptotiques	
I. LES ACTEURS APOPTOTIQUES CHEZ <i>CIONA</i>	
I.1. Identification des relations d'orthologies entre caspases	
I.1.a. Les caspases de <i>Ciona</i>	

1) État de l'art sur les caspases de Ciona	195
2) Résultats des analyses phylogénétiques	196
I.1.b. Les tuniciers ont perdu la caspase 9	201
I.1.c. Le répertoire de caspases de Ciona offre des particularités intéressantes	202
I.2. Les acteurs régulant l'apoptose intrinsèque chez Ciona	204
I.2.a. La cione possède des gènes de la famille Bcl-2	205
I.2.b. Apaf-1 n'a pas été mis en évidence chez la cione	205
I.3. Tentative de définition de la voie mitochondriale	206
I.4. Un focus sur la voie mitochondriale est nécessaire	207
II. ARTICLE N°3	208
III. LA VOIE EXTRINSÈQUE CHEZ <i>CIONA</i>	232
III.1. Implication de la voie extrinsèque dans la régression caudale	232
III.2. Implication sur l'évolution de la voie extrinsèque	233
IV. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE NºIII	236

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	239
I. SYNTHÈSE SUR MES TRAVAUX	239
II. ULTIME RÉFLEXION SUR L'APOPTOSE	244
II.1 La fonction ancestrale des caspases	244
II.1.a. Les caspases apoptotiques dans le système immunitaire	246
II.1.b. Les caspases apoptotiques dans d'autres types de morts cellulaires	246
II.1.c. Les caspases apoptotiques dans la différenciation cellulaire	247
II.1.d. Le rôle ancestral des caspases	248
II.2 La mort cellulaire, un prérequis pour la pluricellularité ?	250

Annexes - MATÉRIELS ET MÉTHODES	
I. CIONA INTESTINALIS	
II. CLYTIA HEMISPHAERICA	
III. TRAITEMENTS DES DONNÉES	

SIBLIOGRAPHIE	263

INTRODUCTION

I. LA MORT CELLULAIRE

I.1. Historique

Le premier biologiste à avoir attiré l'attention sur le concept de mort cellulaire est Carl Vogt (1842) (Figure 1), médecin suisse qui remarqua ce phénomène chez le crapaud accoucheur *Alytes obstetricans* (Laurenti, 1768). Il s'est intéressé en particulier à la disparition de la notochorde et son remplacement par les vertèbres durant la métamorphose. Bien que n'utilisant pas explicitement le terme de « mort cellulaire » (il a employé le terme de « résorption »), il a décrit le phénomène au cours du développement du système nerveux, ainsi que durant la métamorphose du têtard. Deux ans plus tard, Jean-Louis Prévost et Hermann Lebert (1844) ont confirmé les observations de Vogt et ont utilisé le terme d'« absorption » des cellules. August Weisman (1864) a décrit le même phénomène chez les diptères, parlant d'« histolyse » durant la pupaison. Il a remarqué que certains tissus larvaires étaient complètement détruits, en opposition à d'autres profondément modifiés (comme le système nerveux). L'observation de la mort cellulaire dans un tissu qui n'est pas destiné à disparaître, mais qui reste en place malgré l'impact de celle-ci a également été faite par Felix (1889) au niveau des muscles de mammifères. Noetzel (1895) a fait le même constat au niveau du ganglion spinal de la grenouille *Rana esculenta* (Linnaeus, 1758) (Figure 1). Plus tard, Collin (1906) a mis en évidence de la mort cellulaire (qu'il qualifie, comme Weisman, d'« histolyse ») durant le

développement de motoneurones et de cellules du ganglion spinal chez le poulet *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) (Figure 1). Il suggéra un rôle prépondérant de celle-ci dans la régulation du nombre de cellules dans l'ensemble des tissus, avec une balance entre production et élimination de cellules surnuméraires. Ainsi, au début du 20^{eme} siècle, la mort cellulaire fut décrite dans des processus biologiques aussi divers que l'embryogenèse, la métamorphose ou le maintien homéostatique des tissus. La première description morphologique de la mort cellulaire programmée (Figure 1) fut effectuée par le biologiste allemand Walther Flemming (1885) à partir de cellules ovariennes de lapin *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758). Il utilisa alors le terme de « chromatolyse » pour désigner la régression folliculaire au niveau des ovaires de mammifères. Le concept de balance entre « prolifération cellulaire par mitose » et « mort cellulaire » pour maintenir l'homéostasie des tissus a été proposé en 1914 par Gräper dans le cas du cancer du sein. La notion de mort cellulaire programmée signifie alors qu'elle est prédictible au cours du temps dans le programme développemental, soit durant l'embryogenèse, soit durant la métamorphose.

Les travaux de Lockshin & Williams (1964) sur le remaniement des muscles inter-segmentaux lors de la métamorphose des pupes de différentes espèces de papillons définissent clairement la mort cellulaire programmée comme prédictible dans le temps et l'espace.

Une rupture conceptuelle est apparue avec les travaux sur la métamorphose de la grenouille *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758) par Tata (1966). Celui-ci a montré, grâce à des inhibiteurs de la transcription et de la traduction, que les ARNs et les protéines produites par la cellule étaient nécessaires à la mort cellulaire de cette dernière au cours de la régression de la queue du têtard. Ainsi, l'intervention d'informations génétiques a fait basculer le concept de mort cellulaire programmée, et le terme « programmé » ne faisait plus référence au « programme » développemental mais au « programme » génétique. Cette rupture par rapport à la vision précédente est confirmée par les travaux de Lockshin & Williams (1965) et Lockshin (1969) par l'étude d'un papillon (ver à soie).

Le développement de la microscopie électronique a permis de caractériser et différencier plusieurs types de mort cellulaire à partir de critères morphologiques identifiables au niveau cellulaire. Une classification basée sur des morphotypes a abouti à la différenciation de trois classes de morts cellulaires, respectivement nommées : type-I (apoptose), -II (autophagie) et -III (nécrose).

L'autophagie (Figure 2.B) a été mise en évidence chez *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) *in vivo* durant le développement, et intervient notamment au niveau du tube digestif (Denton *et al.,* 2009) ou lors de l'ovogenèse (Nezis *et al.,* 2009). Elle est caractérisée par l'isolement des organites du cytoplasme à l'intérieur d'autophagosomes (vacuoles à double membrane). Ces derniers fusionnent avec des lysosomes contenant des hydrolases acides. Cette fusion forme un autolysosome dans lequel les hydrolases vont dégrader le contenu initial de l'autophagosome

(Kroemer *et al.*, 2009). Par conséquent, cette mort cellulaire est caractérisée par une accumulation importante de vacuoles autophagiques dans le cytoplasme de la cellule.



1

2

Figure 1: (1), Carl Vogt, premier biologiste à s'être intéressé à la mort cellulaire. (2) Dessins de morts cellulaires (semblant correspondre à de l'apoptose). Plusieurs éléments sont observés, comme la condensation de la chromatine ou la fragmentation nucléaire, qui permettront plus tard de définir plusieurs types de mort cellulaire en fonction de caractères morphologiques. (a-b), Coupes de cellules folliculaires d'ovaires de lapin marquées à la safranine, publiées par Flemming en 1885. (a) Cellules en « chromatolyse » (exceptées les deux avec un gros noyau). (b), Quelques cellules en « chromatolyse », avec le noyau fragmenté. (c), Coupe de ganglion spinal de grenouille (*Rana esculenta*) en cours de métamorphose marquée à l'hématoxyline, publiée par Noetzel en 1895. Cellule normale (A), cellule avec condensation de la chromatine (B), cellule avec le noyau condensé (C). (d), Coupe de la chorde spinale d'un poulet en développement, publiée par Collin en 1906. Modifiée d'après Clarke & Clarke, 2012.

La nécrose (Figure 2.C) est classiquement considérée comme une mort cellulaire accidentelle (sur un site de blessure par exemple), non programmée, et donc un processus passif. Cependant il paraît judicieux de l'évoquer brièvement étant donné qu'elle est couramment observée. Une cellule en nécrose est caractérisée par une augmentation de son volume et une fragmentation de ses organites. En opposition avec les autres types de morts cellulaires, la membrane plasmique d'une cellule nécrotique cède, ce qui conduit à un déversement de son contenu dans le milieu extra-cellulaire et peux provoquer une réponse inflammatoire.

L'apoptose (Figure 2.D) a été définie en opposition à la nécrose et fut caractérisée grâce à la microscopie électronique par Kerr, Wyllie & Curie (1972). Le terme apoptose, alors utilisé pour la première fois, fait référence au mot grec désignant la chute des feuilles des arbres, processus programmé et prédictible.



Figure 2: Images de cellules en microscopie électronique. A, Cellule normale. B, Cellule en autophagie. C, Cellule en nécrose. D, Cellule en apoptose. Par opposition à la cellule normale (A), il y a vacuolisation du cytoplasme en cas d'autophagie (B) ou nécrose (C). Modifiée d'après Edinger & Thompson, 2004.

Plus tard, les études de Horvitz, Brenner et Sulston sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) ont permis une première description exhaustive de la voie de signalisation apoptotique intervenant au cours de son développement. La transparence de cet organisme a facilité les observations au microscope à contraste interférentiel et a permis de suivre le lignage cellulaire durant son développement. Les cellules en apoptose ont pu être clairement identifiées (Sulston & Horvitz, 1977 ; Hellis & Horvitz, 1986), permettant d'observer facilement les effets de pertes ou de gains de fonction sur ces dernières. Ainsi, les principaux gènes apoptotiques du nématode ont pu être identifiés, leurs fonctions caractérisées et une voie de signalisation apoptotique a été proposée (Sulston, 2003). Ces travaux ont valu le prix Nobel 2002 à ses trois chercheurs pour la généralisation du modèle « nématode » et la première description de la machinerie apoptotique au niveau moléculaire.

Par la suite, l'identification de nouveaux facteurs moléculaires ainsi que de nouvelles voies de régulation, couplées à des descriptions de morts cellulaires ne semblant pas correspondre aux trois types « historiques » (autophagie, nécrose, apoptose), ont nécessité de réviser régulièrement nomenclature et concept. Pour cela, un Comité sur la Nomenclature de la Mort Cellulaires (NCCD -Nomenclature Committee on Cell Death) a été créé en 2005 (Kroemer et al., 2005) et se réunit régulièrement. Ce comité suggère, au fur et à mesure des études sur la mort cellulaire, de nouvelles définitions et de nouveaux critères. La création du NCCD résulte de confusions qui ont été soulignées dans la littérature dans la terminologie liée à la mort cellulaire et par le fait que la catégorisation en type-I, -II et -III ne semblait plus suffisante à la lumière des nouvelles observations. En 2015, le NCCD a défini la mort cellulaire comme la « dégénération permanente » des fonctions vitales de la cellule. En raison des difficultés pour évaluer ces critères, une cellule est considérée comme « morte » si elle présente une perméabilisation irréversible de sa membrane et/ou se retrouve fragmentée. La notion de mort cellulaire régulée (RCD - Regulated Cell Death), en opposition aux morts cellulaires accidentelles, implique une machinerie moléculaire génétiquement codée. Le fait qu'elle soit régulée par des acteurs génétiques implique qu'il est possible de la moduler, grâce à des inhibiteurs, ou en jouant sur l'expression des gènes impliqués. La RCD résulte de perturbations de l'environnement cellulaire mais intervient aussi dans des conditions physiologiques normales. Dans ce dernier cas, on parle plus particulièrement de mort cellulaire programmée (PCD - Programmed Cell death). Elle peut intervenir lors de l'embryogenèse, de la métamorphose, du maintien homéostatique ou au niveau du système immunitaire. Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai le terme PCD car c'est le terme et l'abréviation les plus usuels.

En raison de l'intervention de facteurs moléculaires, les définitions élaborées par le NCCD ciblent les voies de régulation impliquées, ce qui est particulièrement flagrant dans les derniers rapports du comité (notamment de 2015 - 2018) (voir : Cell Death Diff., 2018 Mar;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4. Epub 2018 Jan 23).

I.2. Différentes morts cellulaires chez les métazoaires

I.2.a. La nomenclature définie par le comité sur la mort cellulaire (NCCD)

Historiquement, les morts cellulaires les plus communes, intervenant au cours de processus divers tels que l'embryogenèse, la métamorphose ou le maintien homéostatique des organes sont les type-I (apoptose), -II (autophagie) et -III (nécrose) bien décrits morphologiquement. Cependant, le NCCD ayant choisi de privilégier les critères moléculaires aux dépens des critères morphologiques, la classification en trois types a été abandonnée. C'est préférentiellement à partir de critères moléculaires que les morts cellulaires sont aujourd'hui décrites et catégorisées, conduisant à une expansion de leur nombre avec le temps (Kroemer *et al.*, 2009 ; Galluzzi *et al.*, 2018). Le dernier NCCD (Galluzzi *et al.*, 2018) propose 12 types de morts cellulaires illustrant une certaine diversité (Figure 3), intégrant par exemple la pyroptose*, la catastrophe mitotique* ou encore la ferroptose* (**cf.* page 23).

L'importance relative donnée aux critères moléculaires (passant les aspects morphologiques en second plan) (Galluzzi *et al.*, 2018) pose un problème majeur car les synthèses effectuées par le NCCD prennent essentiellement en compte les mammifères, et ne peuvent donc se généraliser à l'échelle des métazoaires. Cela soit parce qu'une mort cellulaire n'est observée que chez les mammifères (mais a-t-on réellement étudié chez d'autres groupes?), soit parce que seules les voies moléculaires de ces derniers sont utilisées en guise de définition (des modèles historiques comme *Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) étant de moins en moins cités).

Parmi les types de morts cellulaires, l'apoptose est aujourd'hui divisée en deux types (NCCD-2018), à savoir, l'apoptose intrinsèque et l'apoptose extrinsèque, chacune ayant des caractéristiques moléculaires propres mais aussi communes. De plus, elles présentent les mêmes caractéristiques morphologiques (Kerr *et al.*, 1972). Par ailleurs, cette définition est trop restrictive, car focalisée sur les apoptoses observées chez les mammifères. Elle nécessite probablement une révision à la lumière des données existantes dans d'autres modèles biologiques. En revanche, la définition historique (morphologique) présente l'avantage indéniable de s'appliquer à tous les métazoaires, et permet donc une harmonisation lorsque l'on s'intéresse à des modèles non mammaliens.

22



Figure 3: Représentation de l'ensemble des morts cellulaires définies par le NCCD-2018. Elle est uniquement basée sur l'étude des cellules de mammifères. Un ensemble de perturbations intra- ou extra-cellulaires peut activer plusieurs voies de régulation menant à une mort cellulaire. Une inter-connectivité entre les morts cellulaires régulées (RCD – *Regulated Cell Death*) existe au niveau moléculaire, mais il y a également des caractères morphologiques partagés. Les types de RCD peuvent ressembler davantage à de l'apoptose ou bien à de la nécrose. ICD, *Immunogenic Cell Death* ; ADCD, *Autophagy-Dependant Cell Death* ; LDCD, *Lysosome-Dependant Cell Death* ; MPT, *Mitochondrial Permeability Transition*. Modifiée d'après Galluzzi *et al.*, 2018.

*pyroptosis : mort cellulaire issue de la réponse immunitaire lors de perturbations de l'homéostasie intra- ou extracellulaire suite à la présence de pathogènes.

*catastrophe mitotique : mort cellulaire issue de mitose avortée ou mal régulée entraînant une accumulation de dommages au niveau de l'ADN.

*ferroptose : mort cellulaire issue de péroxidation des lipides induite par un stress oxydatif via les ROS.

L'apoptose est définie par des critères morphologiques d'une part (Kerr *et al.*, 1972 ; Elmore *et al.*, 2007) et des critères moléculaires d'autre part (Meier *et al.*, 2000 ; Hangartner, 2000 ; Galluzi *et al.*, 2018).

D'un point de vue morphologique (Figure 4), les observations au microscope électronique montrent que la première étape est la **perte d'adhésion** entre la cellule apoptotique et les cellules adjacentes. L'exposition sur la face externe de la membrane plasmique **de la phosphatidylsérine**, un phospholipide normalement localisé sur la face intra-cellulaire de cette dernière, est ensuite observée. La cellule diminue également en taille en lien avec à une **contraction du cytoplasme**. On observe ensuite une **condensation de la chromatine** (pycnose), suivie d'un « **bouillonnement membranaire** » (*plasma membrane blebbing*). Ce bouillonnement conduit à la formation de **corps apoptotiques** couplée à un maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au cours du processus ; il n'y a donc pas de déversement du contenu cellulaire dans le milieu extérieur (par opposition à la nécrose). La **fragmentation de l50** à 200 paires de bases), puis enfin, **les corps apoptotiques sont phagocytés** (ou engouffrés, anglicisme de *engoulfed*) par les cellules adjacentes et/ou par les cellules du système immunitaire.



Figure 4: Progression des étapes de l'apoptose au cours du temps (de A vers C). Lorsqu'une cellule (A) entre en apoptose, la première étape est une perte d'adhésion suivie par une condensation de la chromatine. Le bouillonnement membranaire provoquera par la suite la formation de corps apoptotiques (C). La fragmentation de l'ADN est considérée comme l'étape de non-retour de la mort cellulaire.

Au niveau moléculaire, l'ensemble des caractéristiques morphologiques de l'apoptose dépend de l'activité d'une famille multigénique de protéases, les caspases (cysteine-dependent aspartate-directed proteases). Les caspases sont au centre de toutes les voies de signalisation apoptotique et interviennent aussi bien au début qu'à la fin de la régulation. Deux voies de signalisation sont décrites (NCCD, 2015, 2018), qu'il importe de présenter ici succinctement car faisant partie intégrante de la définition moderne de l'apoptose (présentées en détail page 63). Il s'agit de l'apoptose extrinsèque (ou voie de régulation extrinsèque = voie des récepteurs de mort) et l'apoptose intrinsèque (ou voie de régulation intrinsèque = voie mitochondriale). A partir des nombreuses revues sur l'apoptose il est possible de résumer ces deux voies de signalisation (Cohen, 1997; Hengartner, 2000; Meier et al., 2000; Reed, 2000; Fan et al., 2005; Fuchs & Steller, 2015). L'apoptose extrinsèque est activée par des facteurs externes à la cellule suite à la perturbation de son environnement extracellulaire. Elle fait intervenir deux types de récepteurs membranaires : les récepteurs de mort (*i.e.* CD95 = FAS) et les récepteurs de dépendance (*dependence receptors*). Chez les mammifères, l'interaction entre les récepteurs de mort et leurs ligands permet le recrutement de la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain) et conduit à la formation d'un complexe, le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Cette plateforme protéique recrutera puis activera les pro-caspases-8 et/ou -10 (caspases spécifiques de cette voie de signalisation). Ces caspases initiatrices (car situées en amont de la voie de signalisation) activeront à leur tour la caspase 3, caspase exécutrice (car en aval de la voie de signalisation), et dont l'activation sera à l'origine de tous les critères morphologiques de l'apoptose.

L'apoptose intrinsèque peut être initiée par des perturbations aussi bien externes qu'internes à la cellule. Cette voie est définie par une modification du potentiel de membrane de la mitochondrie (sous le contrôle de gènes de la famille *Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2)* qui conduit au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Ce dernier formera, avec la protéine Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*), un complexe protéique appelé apoptosome, qui recrutera et activera la procaspase 9 (la caspase initiatrice spécifique de cette voie de signalisation). Enfin, cette dernière activera, elle aussi, la caspase exécutrice 3.

Ces définitions morphologiques et moléculaires permettent donc 1) de reconnaître une cellule en apoptose, grâce à des caractéristiques propres et identifiables chez tous les organismes, et 2) de savoir de quel type d'apoptose il s'agit en fonction des caractéristiques moléculaires observées. Cependant, concernant les voies moléculaires, elles sont basées sur les données issues des vertébrés. On comprend là le problème : il est impossible de généraliser ces définitions à d'autres groupes. Le fait que les relations d'orthologies des gènes impliqués dans la machinerie apoptotique entre les métazoaires ne soient pas connues implique qu'une comparaison des caractéristiques moléculaires

est pour le moment difficile. En revanche, les critères morphologiques sont les seules caractéristiques comparables entre les métazoaires, puisque les voies de signalisation sont trop peu connues hors des modèles classiques. Pour ces raisons, je vais considérer l'apoptose d'abord d'un point de vue morphologique, ce qui permet d'appliquer une définition à l'ensemble des animaux.

II. RÔLES CLASSIQUES DE L'APOPTOSE

La mort cellulaire par apoptose a été observée à l'échelle des métazoaires, où elle est décrite comme un mécanisme d'élimination de cellules et possède donc un rôle destructif que j'appellerai par la suite la **fonction destructrice de l'apoptose** (**FDA**). Cette vision possède des bases historiques car elle provient des données accumulées depuis le début du 20^{ème} siècle sur la mort cellulaire au cours de différents processus morphogénétiques tels que l'embryogenèse, la métamorphose ou encore le maintien homéostatique des tissus. Afin d'illustrer mon propos, je vais prendre quelques exemples caractérisant chacun de ces processus.

Pour l'embryogenèse, la digitation chez les vertébrés tétrapodes est un cas particulièrement éclairant car il illustre l'importance fondamentale de l'apoptose sans laquelle la séparation des doigts est impossible.

L'exemple de *Caenorhabditis elegans* constitue un cas historique, chez lequel la machinerie apoptotique a été pour la première fois caractérisée.

Concernant la métamorphose, le xénope illustre bien le rôle de l'apoptose dans la destruction de tissus larvaires, mais aussi dans la transformation de tissus restant lors du passage du stade têtard au stade adulte. Je présenterai également la métamorphose chez les insectes en me basant sur les papillons, modèle historique de Lockshin & Williams (1964-1965), ainsi que la drosophile.

Enfin, le maintien homéostatique des tissus sera présenté à travers l'exemple de la régulation de la taille des gonades chez les rongeurs. En effet, l'apoptose intervient tout au long de la vie de l'animal et participe aux capacités de reproduction et sa régulation qui est influencée par des facteurs environnementaux.

II.1. Embryogenèse

La mort cellulaire par apoptose est fondamentale dans les processus de développement car elle permet le bon déroulement de la formation des tissus et des différentes parties de l'organisme (Meier *et al.*, 2000). Elle a été observée chez plusieurs groupes de métazoaires, comme les vertébrés, les échinodermes, les ecdysozoaires ou encore les cnidaires (Jacobson *et al.*, 1997 ; Seipp *et al.*, 2001 ; Thurber & Epel, 2007). Elle semble nécessaire pour le développement de tous les métazoaires puisque, à l'exception de *Caenorhabditis elegans*, l'inhibition de l'apoptose entraine un développement avorté. Chez *C. elegans*, l'inhibition donne un individu viable mais stérile (les vers ont alors environ 15 % de cellules supplémentaires à la normale) (Ellis *et al.*, 1991 ; Jacobson *et al.*, 1997).

Classiquement, l'apoptose régule le nombre de cellules au cours du développement en éliminant celles qui sont surnuméraires, notamment dans le cas de surproduction cellulaire au cours du développement du système nerveux central chez les mammifères (Jacobson *et al.*, 1997 ; Meier *et al.*, 2000 ; Yuan & Yankner, 2000). Les nombreux travaux sur le rôle de l'apoptose au cours du développement ont largement contribué à l'idée, communément acceptée, que l'apoptose sculpte le vivant, comme le présente Jean Claude Ameisen dans l'ouvrage « La sculpture du vivant » (2000). Cette idée prend tout son sens lorsque l'on regarde la digitation où l'apoptose « sculpte » le membre en éliminant des cellules pour individualiser les doigts.

II.1.a. L'exemple de la digitation chez les vertébrés tétrapodes

L'apoptose est indispensable dans la formation des doigts et fait partie intégrante du processus de digitation. La digitation consiste en la suppression des tissus interdigitaux par mort cellulaire (Figure 5), ce qui permet ensuite l'individualisation des doigts (Wood *et al.*, 2000; Martinez & Covarrubias., 2011; Lorda-diaz *et al.*, 2015). Par conséquent, sans l'élimination de ces tissus, il ne peut y avoir un développement normal des membres (autopodes).

La digitation est bien documentée au cours de l'embryogenèse de la souris *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) (Therapsida Mammalia Eutheria) et du poulet (Archosauria Dinosauria Saurischia (Jacobson *et al.*, 1997 ; Hernández-Martínez *et al.*, 2009).

L'apoptose a été mise en évidence par microscopie électronique, permettant d'observer notamment la formation des corps apoptotiques (Gavrieli *et al.*, 1992) (Figure 6.A). Des marquages TUNEL (*Terminal transferase-mediated dUTP nick end labelling*) qui permettent de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN et la détection de l'activation de la caspase 3 ont confirmé la mort des cellules par apoptose (Figure 6.B) (Lorda Diez *et al.*, 2015). L'ensemble de ses éléments indique clairement que l'apoptose est la mort cellulaire prépondérante qui intervient dans la digitation (Hernández-Martínez *et al.*, 2009).



Figure 5: Images de membres postérieurs de souris réalisées au microscope électronique à balayage. (A), au stade E12.5 les crêtes (*ridges*; flèches) sont visibles, ainsi que les tissus interdigitaux entre elles. (B), 24 heures plus tard (E13.5) les tissus interdigitaux commencent à régresser. (C), la régression est quasiment complète (E15.5) et les doigts sont libres. Barre d'échelle, 500 µm. Modifiée d'après Wood *et al.*, 2000.

Lors de la formation des doigts, le squelette mésodermique (composé par les phalanges) se développe de façon concomitante avec l'ectoderme qui le recouvre. Les tissus interdigitaux stoppent leurs proliférations lorsque la régression de l'AER (*Apical Ectodermal Ridge*) commence. L'apoptose est ensuite provoquée par la présence d'acide rétinoïque, provenant de la partie proximale du membre, couplée à l'inhibition du facteur de survie Fgf8 par Bmp2/4 au niveau distal (Figure 6.C) (Hernández-Martínez *et al.*, 2009 ; Martinez & Covarrubias, 2011). L'apoptose est initiée par les deux voies de signalisation décrites précédemment, intrinsèque (intervention de la caspase 9) et extrinsèque (intervention de la caspase 8). L'intervention de la voie intrinsèque est également confirmée par la présence de membre de la famille Bcl-2 dont l'anti-apoptotique Bcl-xl exprimé dans les futurs doigts (zone sans apoptose), et les pro-apoptotiques Bax et Bak qui sont exprimés dans la partie distale du membre (zone avec apoptose) (Lindsten *et al.*, 2000).

L'importance de l'apoptose dans la digitation a été confirmée par des approches de pertes de fonctions. Les expériences où l'apoptose est inhibée en interférant sur les différentes voies de régulations (Bmp, Fgf, Ra) montrent des malformations et de la syndactylie en raison de l'absence de séparations interdigitales (Pajni-Underwood *et al.*, 2007 ; Martinez & Covarrubias., 2011). Il a notamment été montré que les souris mutantes pour les récepteurs BMP (Bmpr) présentaient une régression des tissus interdigitaux moins importante que chez les types sauvages, les souris mutantes montrant une morphologie de type « pattes palmées ». De manière intéressante, les animaux à pattes palmées présentent moins d'apoptose interdigitale, et le taux de palmure des membres chez les oiseaux est corrélé à la présence d'apoptose (Ganan *et al.*, 1998). Chez la souris, des malformations plus importantes ont été observées, comme la fusion de doigts ou encore des doigts surnuméraires (Ota *et al.*, 2007 ; Martinez & Covarrubias., 2011).



Figure 6: Intervention de l'apoptose dans l'élimination des tissus interdigitaux au cours de l'embryogenèse de la souris. **A**, image réalisée au microscope électronique à transmission montrant un macrophage (flèche) contenant des corps apoptotiques. Barre d'échelle, 10 μm. Modifiée d'après Wood *et al.*, 2000. **B**, activation de la caspase 3 révélée par immunomarquage (vert) dans les tissus interdigitaux des doigts III et IV. La caspase 3 est l'une des caspases impliquée dans l'exécution de l'apoptose. Modifiée d'après Lorda diez *et al.*, 2015. **C**, voies moléculaires régulant l'apoptose entre les doigts (bleu clair). La présence au niveau de l'ectoderme distal du facteur de survie Fgf8 (violet) bloque l'apoptose. Ensuite, l'inhibition de Fgf8 par Bmp2/4 (vert) couplée à la présence d'acide rétinoïque (RA – rouge), facteur proapoptotique, en zone proximale déclenche la régression interdigitale. Modifiée d'après Martinez & Covarrubias, 2011.

II.1.b. Le développement de Caenorhabditis elegans

C'est chez le nématode que la régulation moléculaire de l'apoptose a été décrite pour la première fois, par l'identification de l'ensemble des gènes impliqués dans la machinerie apoptotique. Ce vers est un excellent modèle pour étudier l'apoptose notamment parce que le lignage cellulaire au cours du développement est bien caractérisé, permettant un suivi spatio-temporel des cellules en apoptose au cours du développement (Horvitz *et al.*, 1982 ; Meier *et al.*, 2000 ; Conradt & Xue, 2005). La transparence de l'animal permet également de suivre le destin de chaque cellule (Figure 7) (Sulston & Horvitz, 1977). Le nombre de cellules éliminées par apoptose (elles présentent les caractéristiques décrites par Kerr *et al.*, 1972) est constant. En effet, sur 1090 cellules produites lors de l'embryogenèse d'un individu hermaphrodite, 131 cellules (toujours les mêmes et au même moment) sont éliminées par apoptose, conduisant à un adulte composé de 959 cellules (Oberst *et al.*, 2008 ; Ellis & Horvitz, 1986). La majorité de la mort cellulaire a lieu entre 5h et 9h post-fécondation et concerne des neurones, notamment les cellules nerveuses de la partie

antérieure et postérieure du cordon nerveux (Sulston et Horvitz 1977) (Figure 8). Lors de l'éclosion, 12h après fécondation, il ne reste aucune trace des cellules éliminées par apoptose durant le développement, car elles ont été engouffrées par les cellules voisines. Par ailleurs, des cellules spécifiques du sexe entrent également en apoptose, suivant si l'embryon est un individu mâle ou hermaphrodite (Sulston & Horvitz, 1977).



Figure 7: *Caenorhabditis elegans*, individu hermaphrodite en vue latérale au microscope à contraste interférentiel. La transparence de l'animal permet un suivi des cellules au cours du développement. Modifiée d'après Sulston & Horvitz, 1977.

Les facilités offertes par ce modèle, de par sa transparence, ont permis d'observer facilement l'effet des pertes de fonctions effectuées sur certains gènes (Ellis *et al.*, 1991). C'est ainsi que Horvitz, Sulston et Brenner ont pu caractériser la voie de signalisation apoptotique chez cette espèce (Sulston, 2003). Pour cela, ils ont utilisé le mutant *ced-1* qui présente un défaut d'engouffrement, ce qui a permis un suivi des cellules en apoptose durant le développement au-delà de leurs disparitions « programmées » (Hedgecock *et al.*, 1983). Les cellules apoptotiques n'étant pas engouffrées, elles restent en place au cours du développement avec une morphologie ronde facilement reconnaissable (Figure 8). Au cours des cribles de mutants, l'observation de ces cellules dont la morphologie est caractéristique a permis de déduire aisément si le gène cible muté était impliqué ou non dans la machinerie apoptotique. En gain de fonction, si la mutation génère plus de cellules arrondies, c'est un gène pro-apoptotique qui est muté et inversement c'est un gène anti-apoptotique si il y en a moins. L'interprétation est inverse en perte de fonction. Ainsi, trois gènes principaux ont pu être identifiés dans la régulation de l'apoptose, *ced-3 -4* et *-9*. La protéine Ced-9, anti-apoptotique, est considérée comme analogue des protéines Bcl-2 de mammifères. C'est un

inhibiteur de Ced-4, analogue d'Apaf-1. Ced-4 est l'activateur de Ced-3, qui est l'unique caspase fonctionnelle connue chez le nématode (Ellis & Horvitz, 1986; Meier *et al.*, 2000). Sept gènes supplémentaires intervenant dans l'engouffrement des corps apoptotiques ont été identifiés en plus de *ced-1*, qui sont *ced-2*, *-5*, *-6*, *-7*, *-8* et *-10*.



Figure 8: Embryon de *Caenorhabditis elegans* vu au microscope à contraste interférentiel. Des cellules en apoptose sont visibles (cellules arrondies - flèches). Modifiée d'après Conradt & Xue, 2005.

II.2. Métamorphose

La métamorphose est une étape clé du cycle de vie qui se caractérise par un changement de forme permettant le passage de la forme larvaire à la forme juvénile. Des réarrangements tissulaires majeurs interviennent au cours des métamorphoses, avec des pertes, des maintiens ou la mise en place de nouveaux organes. L'apoptose représente le mécanisme de mort cellulaire le plus couramment observé lors de la métamorphose d'organismes modèles. C'est un mécanisme de destruction des tissus larvaires (Jacobson *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 2000). L'étude de ce mécanisme s'est fortement concentrée sur les vertébrés et les insectes, raison pour laquelle je prendrai l'exemple de la métamorphose des anoures avec notamment l'élimination de la queue par apoptose chez le têtard (Sachs *et al.*, 1997), ainsi que les exemples des papillons et de la drosophile.

II.2.a. La métamorphose des lissamphibiens anoures

La métamorphose des anoures implique des changements majeurs accompagnés de réarrangements et d'élimination de certains tissus. Les organes et structures typiques de la larve dégénèrent (*i.e.* queue / branchies) tandis que d'autres se développent (*i.e.* membres) lors du passage d'une vie aquatique à un adulte terrestre (Figure 9). Les marquages TUNEL et les nombreuses images en microscopie électronique dans la littérature montrent l'intervention d'une mort par apoptose (Ishizuya-Oka & Shuichi Ueda, 1996 ; Nishikawa *et al.*, 1998 ; Accordi & Chimenti, 2001).

Cette métamorphose est bien documentée chez la grenouille africaine Xenopus laevis (Daudin, 1802) (Ishizuya-Oka et al., 2010). Nos connaissances concernent également d'autres espèces de grenouilles, notamment Rana pipiens (Schreber, 1782) ou encore Bufo bufo (Laurenti, 1768). L'apoptose chez les anoures (Ishizuya-Oka et al., 2010) intervient dans la destruction des tissus larvaires ainsi que dans la réorganisation de tissus du stade larvaire au stade adulte (Accordi & Chimenti, 2001). Plusieurs organes sont touchés, mais c'est au niveau de la résorption de la queue qu'une apoptose particulièrement massive a été observée (Kerr et al., 1974 ; Sachs et al., 1997). L'ensemble des tissus (épiderme, muscle, derme, notochorde et système nerveux) est éliminé (Estabel et al., 2003 ; Nakajima et al., 2005 ; Ishizuya-Oka et al., 2010). Il en est de même pour les branchies qui disparaissent complètement (Atkinson, 1975; Minnich et al., 2002). Le système nerveux central subit de profondes modifications : élargissement et raccourcissement du diencéphale et rétrécissement de la fossa rhomboidale de la médulla. Le système digestif est modifié également (Figure 10), ce qui est en concordance avec le changement de régime alimentaire entre le têtard, herbivore, et l'adulte qui a un régime carnivore (Accordi & Chimenti, 2001). Outre l'intestin, un certain nombre d'organes sont concernés par ces changements majeurs entre larve et adulte et présentent des cellules apoptotiques tels que le pancréas (Figure 11), le thymus, la peau ou encore la rate (Grant et al., 1998 ; Schreiber & Brown, 2003 ; Ishizuya-Oka et al., 2010).



Figure 9: Image montrant l'évolution de la métamorphose du tétard de xénope au cours du temps. On remarque notamment une perte de la queue, un rétrécissement de la taille de la tête et un développement des membres antérieurs et surtout postérieurs. Modifiée d'après Faunes & Larrain, 2016.



Figure 10: Dessins illustrant les changements anatomiques du tube digestif au cours de la métamorphose de *Bufo bufo*. **(A)**, stade 8 dit pro-métamorphique. **(B)**, stade 13 au cours de la métamorphose. On remarque que la taille des organes diminue (*i.e.* intestin, pancréas), d'autres apparaissent (*i.e.* estomac), tandis que le foie, gardant une taille relativement stable, subit de profondes modifications. D, Duodenum ; G, *Gut* - intestin, Gb, *Gallbladder* – vésicule biliaire ; L, *Liver* – foie ; P, Pancréas ; S, *Stomach* - estomac. Modifiée d'après Accordi & Chimenti 2001.



Figure 11: Coupes histologiques de pancréas de *Bufo bufo* avec marquage TUNEL (flèche). (**A**), stade 8 dit prométamorphique. Peu de cellules TUNEL-positives sont présentes. (**B**), stade 13 au cours de la métamorphose. Les cellules TUNEL-positives sont plus nombreuses, en raison de l'apoptose qui intervient massivement dans la restructuration de l'organe. V, *Vessel*-vaisseau sanguin ; barre d'échelle = 25μ m. Modifiée d'après Accordi & Chimenti 2001.

II.2.b. La métamorphose des pupes chez les insectes

La mort cellulaire chez les insectes est étudiée depuis plusieurs décennies, notamment au cours de la métamorphose des pupes en individus adultes, où elle intervient notamment dans l'élimination des muscles inter-segmentaux, dans la modification de l'épithélium du tube digestif ou encore des glandes salivaires. L'apoptose a pu être mise en évidence par plusieurs approches, telles que des immunomarquages anti-caspases activées (*i.e.* chez *Melipona quadrifasciata* (Le Peleteier, 1836) ou encore des marquages TUNEL (*i.e.* chez *Drosophila*) (Jiang *et al.*, 1997 ; Santos *et al.*, 2015 ; Romanelli *et al.*, 2016). Au cours de la métamorphose des insectes, il a été montré que l'apoptose intervenait dans l'élimination de tissus larvaires (*i.e.* muscles inter-segmentaux), mais aussi dans la modification de tissus restant en place du stade larvaire au stade adulte (*i.e.* glandes salivaires). L'élimination des muscles inter-segmentaux a été observée au cours de la métamorphose de la larve du papillon *Bombyx mori* (Lockshin & Williams, 1964, 1965) ou encore chez celle d'*Antheracea polyphemus* (Cramer, 1775) (Schwartz & Truman, 1982). L'élimination de ces muscles a également été mise en évidence chez la drosophile au cours de la métamorphose et juste après éclosion (Truman *et al.*, 1992). Le réarrangement des glandes salivaires, avec présence d'apoptose au cours de la métamorphose, semble également concerner l'ensemble des insectes puisqu'elle a été observée chez le papillon *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) et la drosophile (Weeks & Truman, 1985 ; Lockshin & Zakeri, 1994). L'apoptose a été mise en évidence dans d'autre tissus, notamment lors de la réorganisation du tube digestif chez *Bombyx mori* (Romanelli *et al.*, 2016), ou encore au niveau du système nerveux avec l'élimination d'environ 300 neurones chez la drosophile (Truman *et al.*, 1992, 1994) ou de motoneurones des pattes larvaires chez *Manduca sexta* (Finlayson, 1956; Schwartz & Truman, 1982; Truman *et al.*, 1992).

Ces travaux portant sur plusieurs espèces ont permis de montrer que l'hormone stéroïdienne 20-hydroxyecdysone (ecdysone) est un acteur crucial dans la régulation de la métamorphose et l'induction de l'apoptose (Jiang *et al.*, 1997). En effet, il a été montré que la concentration en ecdysone est corrélée avec les changements majeurs observés, notamment l'élimination des muscles larvaires chez la drosophile. Après l'identification de l'acteur hormonal principalement impliqué dans la régulation de la métamorphose, les outils moléculaires (*i.e.* étude de mutants) disponibles chez la drosophile ont permis de caractériser les gènes apoptotiques chez cette espèce. Sept caspases ont été identifiées, dont une caspase initiatrice (*Dronc*) spécifique de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale (Cooper *et al.*, 2009). Grâce à ce travail, des caspases ont pu être identifiées ensuite chez d'autres modèles d'insectes, notamment des lépidoptères (Huand *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010; Courtiade *et al.*, 2011; Suganuma *et al.*, 2011).

II.3. Le maintien homéostatique des tissus

Le maintien homéostatique permet de maintenir l'organisme ou des organes dans un état d'équilibre, garantissant leur stabilité ainsi que leur fonctionnement dans des conditions physiologiques optimales (Meier *et al.*, 2000). Le maintien homéostatique nécessite une balance entre prolifération et mort cellulaire, notion qui a déjà été abordée par Collin (1906). Au cours de l'embryogenèse, l'intervention de l'apoptose pour compenser un surplus de prolifération en
supprimant les cellules surnuméraires est clairement acceptée (Meier *et al.*, 2000). Cette fonction de l'apoptose est également présente au cours de la vie adulte des organismes, et intervient en fonction du contexte biologique, comme durant les alternances de période de reproduction chez les mammifères, exemple particulièrement bien étudié chez les rongeurs.

L'intervention de l'apoptose dans la régulation de la taille des gonades chez les rongeurs en fonction de la photopériode, marqueur de la saison de reproduction, est un exemple qui permet d'illustrer le rôle de l'apoptose chez un animal adulte, participant ainsi au déroulement normal de son cycle de vie.

Chez le hamster de Dzoungarie *Phodopus sungorus* (Pallas, 1773) (Synapsida Euarchontoglire Muroïdea Cricetinae) (Figure 12), l'intervention de l'apoptose semble prépondérante dans la régulation de la taille des gonades en fin de période de reproduction, alors qu'une prolifération est au contraire remarquée au début de celle-ci (Furuta *et al.*, 1994 ; Moffatt-Blue *et al.*, 2006). L'activité reproductrice du hamster est contrôlée par les variations saisonnières et la durée du jour, comme pour beaucoup d'autres rongeurs (Zucker *et al.*, 1980 ; Hoffmann, 1973-1981 ; Tapanainen *et al.*, 1993). Il a été montré que, lors d'un raccourcissement de la durée d'exposition à la lumière, les gonades mâles de *Phodopus sungorus* diminuent en masse, de façon concomitante avec une modification du taux hormonal (Furuta *et al.*, 1994). Les différences constatées sont statistiquement significatives. Plus important, la fragmentation de l'ADN augmente quand la durée du jour diminue, illustrant la fin de la période de reproduction. Cette fragmentation représente pour les auteurs la présence de cellules apoptotiques. Cette étude est également conforme aux résultats issus de travaux sur le rat chez lequel une diminution du taux de gonadotropine, en fin de période de reproduction, s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose au niveau testiculaire (Tapanainen *et al.*, 1993).

Une étude plus récente sur les gonades femelles a montré des résultats similaires (Moffatt-Blue *et al.*, 2006). Comme pour les études sur les autres rongeurs, les auteurs ont comparé des individus ayant été exposés à des photopériodes différentes. Cette étude montre, comme pour les mâles, une diminution de la taille et du poids des gonades femelles due à de l'apoptose. Outre les marquages TUNEL (Figure 13), un marquage par anticorps permet la mise en évidence de la caspase 3 sous sa forme active (donc clivée). Pour l'ensemble des critères regardés, les auteurs ont pris soin de vérifier qu'il n'y avait pas de différences significatives au sein d'un même groupe (groupe jours longs / groupe jours courts). Ensuite, les différences ont été observées entre les deux groupes d'études, montrant des différences statistiquement soutenues et solides.

Les hormones, en particulier, semblent agir sur le déclenchement de l'apoptose. En effet, la diminution de FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) est proposée comme l'élément essentiel dans la

réduction de la taille des gonades. La LH (*Luteinizing Hormone*) joue également le rôle de facteur de survie (Braw & Tsafriri, 1980), et de manière intéressante, sa concentration diminue en cas de faible exposition à la lumière (Dodge & Badura, 2002).

Ces données illustrent la modification rapide des gonades en fonction des variations photopériodiques déjà observées chez les mâles, et comme pour ces derniers, l'apoptose joue un rôle central dans la régulation de la taille des gonades. C'est un exemple parlant sur le rôle de l'apoptose dans le maintien homéostatique des tissus, et dans la régulation de leur taille en fonction du cycle de vie de l'animal et ce, avec une régulation hormonale influencée par des facteurs environnementaux. L'intervention de l'apoptose dans la « gestion » de la taille des tissus, s'inscrit dans une gestion de

l'homéostasie à l'échelle de l'organisme et constitue l'une des fonctions classiques de l'apoptose chez les métazoaires.



Figure 12: Hamster du genre *Phodopus*. Les espèces du genre *Phodopus* ont un cycle de reproduction basé sur la saisonnalité. Les gonades sont plus petites hors période de reproduction. De la prolifération apparaît juste avant le début de celle-ci, alors que de l'apoptose est mise en évidence lorsqu'elle se termine. Photo de G. Krasovec.



Figure 13: Coupes d'ovaires de *Phodopus sungorus* avec marquage TUNEL (bleu) indiquant les cellules en apoptose (flèche). **A**, Ovaire d'un individu exposé à des jours longs. Il n'y a pas de marquage TUNEL-positif. **B**, Ovaire d'un individu exposé à des jours courts. Des marquages TUNEL-positifs sont présents en raison des cellules en apoptose. g, granulosa ; o, oocytes ; t, theca folliculi. Grossissement, x40. Modifiée d'après Moffatt-Blue *et al.*, 2006.

II.4. Synthèse sur le rôle classique de l'apoptose

La mort cellulaire par apoptose, décrite au cours de différents processus morphogénétiques que sont l'embryogenèse, la métamorphose ou le maintien homéostatique des tissus, est historiquement vu comme un mécanisme de destruction que nous avons appelé ici la **fonction destructrice de l'apoptose (FDA)**. Elle consiste en la sculpture de la forme par la destruction de tissus larvaires ou l'élimination de cellules surnuméraires (Figure 14). Cependant, une nouvelle vision de l'apoptose émerge depuis une dizaine d'années dans la littérature, dans laquelle les cellules apoptotiques jouent aussi un rôle morphogénétique fondamental en agissant sur le comportement et/ou le destin des cellules adjacentes. Ainsi, l'apoptose n'est plus vu comme un simple processus d'élimination, mais a aussi été observé comme capable d'influencer son environnement cellulaire immédiat. C'est cette fonction émergente que je vais illustrer dans la prochaine partie et que nous avons baptisé au laboratoire la **fonction constructrice de l'apoptose (FCA)**.

Sculpture du vivant



Figure 14: Schémas récapitulatifs illustrant la vision classique de l'apoptose. (A), élimination des tissus interdigitaux. (B), mise en place de la lumina. (C), destruction de la queue du têtard. (D), Destruction des canaux du sexe opposé au sexe génétique. (E), élimination de cellules surnuméraires. (F), élimination de cellules anormales. (G), suppression de cellules abîmées. Modifiée d'après Jacobson *et al.*, 1997.

III. LA FONCTION CONSTRUCTRICE DE L'APOPTOSE

Au regard de la littérature des dernières années, il apparaît que les cellules apoptotiques sont capables d'émettre un signal à destination des cellules adjacentes. A la différence de la fonction destructrice de l'apoptose, qui met en avant l'élimination, c'est la capacité de la cellule apoptotique à modifier activement son environnement qui sera présentée dans cette partie. Les caspases sont centrales dans ce mécanisme, car ce sont ces protéines qui, grâce à leur activité enzymatique de protéase, sont capables d'activer l'émission de ces signaux.

Par conséquent, en opposition à la fonction destructrice de l'apoptose (FDA), nous avons défini la fonction constructrice de l'apoptose (FCA) (illustrée Figure 15) comme étant:

Tous signaux moléculaires ou forces mécaniques caspase-dépendant induits par une cellule en apoptose vers les cellules adjacentes et induisant un processus morphogénétique. Ces signaux sont capables de modifier le comportement des cellules adjacentes, en induisant de la migration, de la prolifération, de la différenciation ou encore un mécanisme de survie, ainsi qu'exercer une force mécanique remodelant un tissu.

Dans la partie précédente, j'ai présenté successivement la FDA dans les trois processus morphogénétiques où celle-ci a été décrite: l'embryogenèse, la métamorphose et le maintien homéostatique. Concernant cette partie consacrée à la FCA, je ne vais pas procéder de la même façon. En effet, présenter la FCA successivement dans ces processus ne semble pas des plus judicieux, car elle a été davantage observée en fonction des comportements cellulaires qu'elle induit. Par conséquent, au lieu d'aborder les processus morphogénétiques dans plusieurs sousparties, je vais plutôt séparer ce chapitre en fonction des comportements cellulaires induits. J'illustrerai d'abord la modification mécanique induite par les cellules apoptotiques qui influence les cellules adjacentes. Je vais poursuivre par la différenciation (suggérée dans la littérature), puis l'induction d'un message de survie, la migration induite par les cellules apoptotiques et enfin la prolifération qui fait suite à une blessure.



Figure 15: Représentation schématique de l'apoptose constructrice. La cellule en apoptose relargue vers l'extérieur, à destination des cellules adjacentes, des facteurs moléculaires ou un signal mécanique *via* l'activité des caspases. Ces facteurs vont alors induire aux cellules adjacentes des comportements promouvant du remodelage mécanique, de la migration, de la prolifération, de la différenciation ou un mécanisme de survie. Modifiée d'après Fogarty & Bergmann, 2015.

III.1. Le remodelage mécanique (mechanical remodelling)

Le remodelage des tissus par une force mécanique induite par des cellules en apoptose a également été décrit chez la drosophile (nommée « *apoptotic force* » par Toyama *et al.* (2008) ou encore « *tissu remodelling* » par Monier *et al.* (2015)). Bien que dépendant de l'activité des caspases, il n'y pas d'émission de signal moléculaire vers les cellules adjacentes contrairement aux autres cas de FCA, puisqu'ici c'est la génération d'une force qui impacte l'environnement de la cellule apoptotique.

Au cours de l'embryogenèse de la drosophile, il a été observé que des cellules apoptotiques

provoquaient un changement dans les propriétés mécaniques de l'épithélium au niveau des pattes (Monier *et al.*, 2015). Cette déformation physique de la surface apicale de l'épithélium est dû à une accumulation de protéines composants les jonctions cellulaires (notamment l'E-cadherine, l' α -caténine, la β -caténine, ou encore des filaments de myosine II) sous la surface apicale des cellules apoptotiques (Figure 16) (Monier *et al.*, 2015). Il a été montré que ce sont les filaments de myosine-II formés par la cellule en apoptose qui imposaient des contraintes physiques aux cellules adjacentes en raison de la tension générée. Grâce à cette tension, le rapprochement des cellules saines au niveau de la déformation apicale est effectué au cours de l'élimination de la cellule apoptotique, permettant le maintien de l'intégrité de l'épithélium (Figure 16) (Monier *et al.*, 2015).

Un mécanisme similaire a été décrit dans la mise en place de l'épithélium dorsal chez la drosophile. Il a été montré que les cellules en apoptose exerçaient une force mécanique participant à la fermeture de cet épithélium dorsal (*dorsal closure*) (Tooyama *et al.*, 2008).

Le remodelage mécanique induit par des cellules en apoptose est également suggéré chez la souris. En effet, l'étude d'individus KO pour la caspase 3 ou encore la caspase 9 a permis de détecter des anomalies dans la fermeture du tube neural (Yamaguchi & Miura, 2013).



Figure 16: Dynamique de la fonction de remodelage de l'épithélium par les cellules en apoptose au travers de la formation de câbles de myosine II (myo II) lors de la formation de l'épithélium des pattes de drosophile au cours de l'embryogenèse. Modifiée d'après Monier *et al.*, 2015.

III.2. La différenciation

Bien qu'aucune étude n'est encore démontrée de la différenciation issue de la FCA, le lien entre apoptose et différenciation est suggérée par plusieurs travaux dans la littérature (Alnemri *et al.*, 1996 ; Ishizaki *et al.*, 1998 ; Zermati *et al.*, 2001). En effet, plusieurs types de différenciations cellulaires dépendent de l'activité des caspases chez les mammifères, notamment celles des érythrocytes, des megakaryocytes ou encore des macrophages pour le système immunitaire (Schwerk & Schulze-Osthoff, 2003). Ces types de différenciations sont considérés comme des « morts cellulaires inachevées, par énucléation de la cellule ».

Il a été montré *in vitro*, grâce à des marqueurs fluorogéniques, que la différenciation des érythrocytes, chez l'homme, fait intervenir les caspases-2, -3 et -9. De façon intéressante, la différenciation est stoppée précocement suite à l'inhibition de l'activité des caspases. C'est le clivage de protéines comme PARP-1, Acinus et Lamin-B par les caspases qui permet cette différenciation (Zermati *et al.*, 2001). De plus, il a été mis en évidence une modification du potentiel de membrane de la mitochondrie, ainsi que la formation de l'apoptosome. Ces caractéristiques étant spécifiques de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale, il en a été déduit qu'elle est nécessaire à la régulation de la différenciation des érythrocytes.

La différenciation caspases-dépendante a également été mise en évidence pour d'autres types cellulaires (ne faisant pas partie du système immunitaire), notamment les cellules de la lentille (œil) chez le surmulot *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Ishizaki *et al.*, 1998). Il a été observé *in vitro* que la formation des corps lentinoïdes était bloquée par un traitement à l'inhibiteur ubiquitaire de caspases Z-VAD-Fmk (Ishizaki *et al.*, 1998). C'est en particulier la caspase 3 qui semble être nécessaire dans l'énucléation des cellules épithéliales de la lentille permettant leurs différenciations en fibres.

Cependant, c'est les cnidaires qu'une différenciation induite par l'apoptose de cellules voisines a été rapporté. Chez le cnidaire *Hydractinia echinata*, de la différenciation caspasedépendante a été observée au cours de la métamorphose de la larve planula. Cette différenciation est un prérequis pour le déroulement normal de la métamorphose (Wittig *et al.*, 2011).

III.3. L'induction de survie

Il a été montré au cours de l'embryogenèse de la drosophile, au niveau des disques imaginaux, que des cellules apoptotiques étaient capables d'induire une résistance des cellules adjacentes contre l'apoptose et ainsi promouvoir leur survie (Figure 17) (Bilak *et al.*, 2014).

La capacité des cellules apoptotiques à induire une prolifération de compensation vers les cellules adjacentes a déjà été décrite au niveau des disques imaginaux chez la drosophile après irradiation (Ryoo *et al.*, 2004). Il a également été constaté une augmentation de l'expression du gène *ban* dans les cellules non apoptotiques, qui est connu pour être un gène anti-apoptotique (Brennecke *et al.*, 2003 ; Jaklevic *et al.*, 2008). Cette fonction a été confirmée observation d'une hausse d'expression de *ban* et une faible activité des caspases (évaluée par immuno-marquage anti-caspase 3 activée) dans les cellules adjacentes (Bilak *et al.*, 2014). Au-delà d'un rôle dans la prolifération, il a été suggéré que *ban* puisse induire une résistance dans les cellules non apoptotiques.

Afin d'étudier la résistance conférée par *ban*, de l'apoptose a été provoquée au niveau des disques imaginaux de drosophile par irradiation et/ou surexpression de *rpr* et *hid* (*head involution defective*) (deux gènes pro-apoptotiques de la drosophile) ainsi que par la perte de l'ATM (Oikemus *et al.*, 2004) (provoquant un dysfonctionnement au niveau des télomères et induisant de l'apoptose par réponse aux dommages sur l'ADN).

Dans ces trois cas, une seconde induction d'apoptose, par irradiation, a été effectuée. L'étude a montré que les cellules survivantes à la première induction d'apoptose sont davantage résistantes à la seconde induction, et ont un taux de survie significativement plus élevé (Bilak *et al.*, 2014). Cette résistance est due à l'expression, dans ces mêmes cellules, de *ban*. De manière intéressante, le récepteur tyrosine kinase Tie est nécessaire pour l'activation de ce gène. Or, le ligand Pvf1, qui a été montré comme étant exprimé dans les cellules en apoptose, possède des domaines protéiques permettant l'interaction avec Tie (Bilak *et al.*, 2014). Les auteurs ont donc proposé que les cellules en apoptose expriment Pvf1, qui lui même active Tie, et permet l'expression de *ban* dans les cellules adjacentes. L'expression de *ban* dans ces dernières confère une résistance en cas de seconde induction d'apoptose (Figure 17). Cette résistance induite par des cellules en apoptose à destination des cellules adjacentes a été nommée l'effet Mahalaki (*« the Mahalaki effect »*).



Figure 17: Modèle représentant l'effet de Mahakali. Modifiée d'après Bilak et al., 2014.

III.4. La migration

Il est crucial pour les cellules apoptotiques d'émettre un signal d'attraction (dit « *eat-me signal* ») à destination des cellules adjacentes ou vers celles du système immunitaire pour permettre l'engouffrement des corps apoptotiques (Ravichandran, 2003). Plus que de l'attraction, les cellules apoptotiques semblent capables d'induire la migration des cellules adjacentes.

Le signal d'attraction des cellules apoptotiques été documenté historiquement chez le nématode, dans lequel il dépend d'un signal phosphatidylsérine à la surface des cellules apoptotiques et implique les gènes *ced-2*, *-5* et *-10* (Gumienny *et al.*, 2001 ; Reddien & Horvitz, 2001). De façon intéressante, ces gènes sont aussi impliqués dans la migration (Gumienny *et al.*, 2001 ; Reddien & Horvitz, 2001).

Il a été montré chez les mammifères que ce type de signal est induit par la cellule en apoptose, de façon caspase-dépendant, et modifie le comportement des cellules environnantes en provoquant de la migration. Il s'agit de FCA que je vais présenter au travers des deux études phares qui se sont intéressées à ce signal d'attraction, à savoir les travaux de Lauber *et al.*, 2003 et de Gude *et al.*, 2008.

Bien que ces travaux illustrent davantage un phénomène d'attraction, il existe des études

montrant de la migration caspases-dépendante (Ohsawa *et al.*, 2009 ; Fogarty *et al.*, 2015). En effet, il a été suggéré au cours de l'embryogenèse de la souris que la migration des neurones sensoriels olfactifs (OSNs - *olfactory sensory neuron*) est induite par la caspase 3 qui clive la protéine Sema7A (Ohsawa *et al.*, 2009). De plus, chez les souris KO pour la caspases-3 et -9 on a pu observer des problèmes de développement des bulbes olfactifs ainsi que des déficiences dans la maturation et la formation des synapses des OSNs. Bien que la migration ne soit pas ici directement induite par des cellules apoptotiques, le rôle des caspases suggère que de telles cellules sont capables d'induire un tel comportement.

III.4.a. L'attraction et la migration induites sur des cellules immunitaires

Un signal chimiotactique *via* la lysophosphatidylcholine par les cellules en apoptose est documenté chez les mammifères (Lauber *et al.*, 2003). Ce signal induit de l'attraction et de la migration chez les cellules du système immunitaire. Il a été montré que l'activation d'iPLA2, dont dépend la production de lysophosphatidylcholine qui induit la migration, est réalisée par clivage par la caspase 3.

De l'apoptose a été provoquée par exposition aux UV dans des cellules en culture de trois espèces de mammifères (Homo sapiens (Linnaeus, 1758), Chlorocebus sabaeus (Linnaeus, 1766) et Mus musculus (Linnaeus, 1758) (Lauber et al., 2003). Pour l'ensemble des espèces, l'apoptose induite a provoqué la migration de cellules immunitaires, en particulier les monocytes en contact avec le surnageant des cultures cellulaires. Comme attendu, les cellules perdent la capacité chimiotactique lorsque iPLA2 est inhibée, et inversement sa surexpression l'augmente. De façon intéressante, la protéine iPLA2 a besoin d'être clivée pour être active (Atsumi et al., 1998, 2000). Or, dans les cellules en culture, l'activité des caspases a été mise en évidence par un Western Blot montrant que PARP, un substrat témoin classiquement utilisé pour mettre en évidence l'activation des caspases (Cuvillier et al., 2000, 2001), est bien clivé en condition normale. Ensuite, l'ajout dans les cultures de l'inhibiteur ubiquitaire de caspases Z-VAD-Fmk abolit l'attraction et la migration, indiquant que ce signal est bien caspase-dépendant. De plus, l'analyse de la séquence de iPLA2 a permis de détecter un site composé des acides aminés DVTD, théoriquement clivable par la caspase 3 (Lauber et al., 2003). Le rôle fondamental de la caspase 3 est mis en évidence par les expérimentations impliquant des cellules déficientes pour celle-ci ; ces dernières perdent leur pouvoir chimiotactique et ne présentent pas de protéine iPLA2 sous sa forme clivée.

Le même type d'étude a été réalisé par Gude *et al.*, 2008 sur la sphingosine-1-phosphate (S1P), un lipide bio-actif impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont l'attraction des monocytes (Spiegel & Milstien, 2003). L'étude du lien entre S1P, apoptose et attraction sur les cellules immunitaires a montré que le signal d'attraction provenant des cellules apoptotiques dépend des caspases (Gude *et al.*, 2008).

Il a été remarqué que la protéine S1P, relargué par les cellules en apoptose, permet l'engouffrement (dit « *come-and-get-me signal* » par Gude *et al.*, 2008).

La sphingosine kinase (SphK) permet, à partir de la sphingosine, de produire la sphingosine-1phosphate (S1P). Il a été remarqué qu'une inhibition de la protéine SphK provoque une augmentation de l'expression du gène *sphk*, mais augmente également le nombre de cellules en apoptose (Gude *et al.*, 2008). Une exposition au Z-VAD-Fmk diminue, environ de moitié, le nombre de cellules apoptotiques mais provoque également la diminution du taux de S1P via l'expression de *sphk*. Ces éléments suggèrent que ce sont les caspases qui induisent l'activation de SphK et par la suite la production de S1P.

III.5. La prolifération

Plusieurs travaux montrent que la régénération suite à une blessure dépend d'une prolifération induite par des cellules en apoptose via l'activité des caspases (dit « regenerative apoptosis » pour Bergmann & Steller, 2010). Je me focaliserai sur cette prolifération cellulaire caspase-dépendante, fondamentale car permettant la régénération et donc la survie de l'animal. L'apoptose est observée sur les sites de blessures chez des organismes appartenant à différents clades phylogénétiques, comme *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoa - Arthropoda), *Danio rerio* (Vertebrata - Teleostei), *Mus musculus* (Vertebrata - Tetrapoda) ou *Schmidtea mediterranea* (Lophotrochozoa - Platyzoa) (Benazzi *et al.*, 1975 ; Vriz *et al.*, 2014), suggérant une fonction à une large échelle évolutive de l'apoptose dans la régénération (Figure 18).



Figure 18: Mort cellulaire induite par blessure (rouge) puis prolifération (bleu) lors de la régénération de la nageoire caudale chez *Danio rerio* (Gauron *et al.*, 2013), du corps de *Schmidtea mediterranea* (Pellettieri *et al.*, 2010), de la tête d'*Hydra vulgaris* (Chera *et al.*, 2009) et du tube digestif de *Drosophila melanogaster* (Amcheslavsky *et al.*, 2009). Deux pics de mort cellulaire sont présents chez *Danio rerio et Schmidtea mediterranea*. Le second pic, correspondant à de l'apoptose, est suivi de prolifération. Chez *Hydra vulgaris*, un pic d'apoptose apparaît très vite et la prolifération suit. Chez *Drosophila melanogaster*, la mort des entérocytes suite à une infection bactérienne conduit à une prolifération. Modifiée d'après Vriz *et al.*, 2015.

Je vais présenter dans cette partie trois des exemples de prolifération induites par la FCA parmi les plus documentés. Je parlerai de la régénération de la queue du têtard de xénope afin d'illustrer le fait que la FCA peut être observée chez une larve et concerner un tissu qui sera éliminé plus tard au court du cycle de vie. Ensuite, je m'attarderai sur la régénération du foie de la souris puisqu'il s'agit d'un cas de FCA très bien décrit. En raison du taux de régénération important des

cnidaires, plusieurs études se sont portées sur cette capacité chez ces animaux, dont l'un des modèles est l'hydre *Hydra vulgaris* (Pallas, 1766). Je finirai donc par la régénération de l'hydre afin d'appuyer et généraliser mon propos sur des animaux phylogénétiquement éloignés, et parce que l'un des modèles biologiques que j'ai étudié au cours de ma thèse est un cnidaire.

III.5.a. La régénération de la queue du têtard de Xenopus laevis

La régénération caspase-dépendante existe au stade larvaire chez les métazoaires et peut concerner des tissus qui seront pourtant absents au stade adulte, car détruits au cours de la métamorphose. C'est le cas du xénope, lors de la régénération de la queue du têtard suite à une d'ablation (Tseng et al., 2007). Il a été montré qu'après une blessure provoquée à l'extrémité postérieur de la queue, la présence d'apoptose, légèrement en retrait par rapport au site de coupure, est nécessaire pour induire la prolifération qui permet la réparation de la lésion (Tseng et al., 2007). En effet, lorsque les têtards sont exposés à des inhibiteurs de caspases (M50054 ou NS3694), le taux de réparation est diminué de 20 %. Étant donné que les inhibiteurs bloquent le site actif des caspases, cela suggère que c'est leur fonction de protéase qui est fondamentale pour promouvoir la prolifération. Ces observations sont corrélées avec des marquages de prolifération par anti-Phospho-Histone H3 qui montrent moins de divisions en présence des inhibiteurs de caspases, pouvant expliquer la différence de régénération avec le témoin. Outre ces effets, les cellules nerveuses sont malformées, leurs croissances moins rapides, et leurs organisations désordonnées en comparaison avec le contrôle et en raison de problèmes de migration (Tseng et al., 2007). Les cellules apoptotiques pourraient ainsi être à l'origine de migration comme de prolifération cellulaire chez ce modèle.

III.5.b. La régénération du cnidaire Hydra vulgaris dépend des cellules apoptotiques

Il a été montré que la régénération de la tête du polype du cnidaire *Hydra*, après induction d'une blessure, dépend d'un signal Wnt caspase-dépendant émis par des cellules en apoptose (Chera *et al.*, 2009).

Comme tous les cnidaires, l'hydre présente un stade de vie sessile, le polype, étant une simple colonne au bout de laquelle se trouve la bouche (hypostome) entourée des tentacules capturant les proies dont l'animal se nourrit. En cas d'ablation du polype par bissection, qui sépare ainsi la base du pied de l'hypostome, l'animal est capable de régénérer et de survivre. Immédiatement après

ablation, une réparation rapide se fait par morphallaxie, c'est-à-dire une réorganisation des tissus qui peuvent à nouveau se différencier. Cela est également observé chez le poisson *Danio rerio* (Gauron *et al.*, 2013). C'est seulement ensuite que la prolifération est observée, permettant la régénération.

La régénération de l'hydre nécessite l'activation de voies classiquement connues pour intervenir dans sa régulation, comme les voies Wnt ou MAPK/CREB (Chera *et al.*, 2009). Les marquages par anticorps anti-Wnt3 et anti- β -caténine (β -cat) effectués dans cette étude ont montré leur intervention sur le site lésé et surtout la translocation vers le noyau de la β cat., indiquant que la voie est activée. De plus, les hydres traitées par ARN interférence (RNAi) Wnt3 et β -cat ont perdu leur capacité de régénération. Des marquages de prolifération par BrdU (phase-S) ont confirmé la présence de cellules en division. Le plus remarquable est le fait que le signal Wnt, conformément aux observations, a pour origine les cellules en apoptose (Chera *et al.*, 2009). Ces cellules apoptotiques ont été mises en évidence grâce à des marquages TUNEL, ainsi que par la présence de fragments nucléaires visibles en DAPI (ou Hoechst), moyen indirect de localiser des corps apoptotiques et souvent utilisé dans la littérature (Yuan *et al.*, 2008).



Figure 19: Schéma illustrant le rôle de l'apoptose dans la régénération d' *Hydra vulgaris*. Les cellules en apoptose dans la région 1 induisent un signal Wnt3 après coupure provoquant l'activation de la voie β -cat. Cela conduit à une prolifération visible par la présence de la phase S au niveau des i-cells de la région 2. A partir de 4h post-amputation, les cellules en apoptose ont été éliminées par engouffrement et remplacées par des cellules endodermiques capables à leur tour d'induire un signal Wnt3. Modifiée d'après Chera *et al.*, 2009.

L'exposition à l'inhibiteur ubiquitaire de caspases Z-VAD-Fmk bloque l'apoptose mais de façon intéressante, ni l'accumulation de Wnt3 au niveau du site de blessure, ni la translocation β -cat n'ont été observées. Cette étude a donc montré que le Z-VAD-Fmk bloque la prolifération et par

conséquent la régénération de l'hydre, impliquant que le signal de prolifération est caspasedépendant et issu des cellules apoptotiques (Chera *et al.*, 2009).

De plus, l'ajout de Wnt3 chez les individus exposés au Z-VAD-Fmk restaure la translocation de β cat dans les noyaux et la prolifération a alors lieu (Chera *et al.*, 2009). L'ensemble de ces éléments montrent que les cellules en apoptose, *via* l'activité des caspases, induisent un signal Wnt3 à destination des cellules adjacentes, permettant la translocation de la β -cat du cytoplasme vers le noyau ce qui aboutit à un signal de prolifération (Figure 19). Cette prolifération va alors être à l'origine, et même être prépondérante, dans la régénération de la tête du polype de l'hydre.

III.5.c. La régénération du foie de souris est caspase-dépendante

Le foie des souris se régénère après ablation d'une partie de celui-ci (Sandgren *et al.*, 1991). Cette régénération dépend d'une prolifération induite par des cellules apoptotiques grâce au clivage d'iPLA2 par la caspase 3. Le clivage d'iPLA2 permet la production de lysophosphocholine, précurseur de la prostaglandine E2 (PGE2) alors capable d'induire de la prolifération (Figure 20) (Li *et al.*, 2010). Cette capacité de régénération du foie induite par des cellules apoptotiques a été nommée « *phoenix rising* ».

Il est généralement admis que des facteurs sont émis par des cellules sur le site de blessure, ce qui mobilise les cellules souches et permet une prolifération, une différenciation et par conséquent une régénération. Les cellules souches jouent un rôle crucial dans la régénération (Gurtner et al., 2008). La corrélation entre capacité de régénération et présence d'apoptose au niveau du foie suggère que les mêmes acteurs sont probablement impliqués aussi bien dans la prolifération que dans l'apoptose (Li et al., 2010). En raison de la place centrale des caspases dans la régulation de l'apoptose, les auteurs ont décidé de cibler cette famille multigénique et d'évaluer son rôle dans le cas de la régénération du foie. Les caspases -3 et -7 ont été choisies comme cibles, puisqu'elles sont systématiquement impliquées quel que soit la voie de signalisation apoptotique (extrinsèque ou intrinsèque) (Meier et al., 2000; NCCD-2018). Après une ablation de deux lobes du foie (sur quatre) chez des souris de type sauvage, des souris KO caspase 3 et KO caspase 7, les auteurs ont constaté un regain de masse du foie respectivement inférieur de 60 et 57 % par rapport au témoin sauvage. De plus, les marquages BrdU ont montré moitié moins de cellules positives en cas de KO d'une des deux caspases (Li et al., 2010). Il a été montré qu'iPLA2 augmente la synthèse d'acide arachidonique et de lysophosphocholine, précurseurs de la prostaglandine E2 (PGE2), une protéine capable d'induire de la prolifération (Goessling et al., 2009). Or, iPLA2 peut être activée par la caspase 3 par clivage (Zhao et al., 2006). Pour ces raisons, le taux de PGE2 entre cellules normales

et cellules KO (caspase -3 et -7) a été regardé, et une différence significative a été constatée avec une concentration plus faible chez les souris KO. Le rôle d'iPLA2 dans la prolifération fut confirmé par ARN interférence, mais surtout celui de la caspase 3 lors de son activation (Li *et al.*, 2010). Cette étude met en avant, chez un organisme phylogénétiquement éloigné des cnidaires, une fonction fondamentale des cellules en apoptose dans un mécanisme de régénération (Figure. 20).



Figure 20: Régénération induite par les cellules en apoptose chez la souris suite à une ablation d'une partie du foie (*« Phoenix Rising »*). Les caspases -3 et -7 sont activées dans les cellules apoptotiques présentes sur le site de blessure. Ces caspases clivent iPLA2, générant de l'acide arachidonique par la suite converti en PGH2. La PGE2 issue de la PGH2 promeut la prolifération et la régénération. Modifiée d'après Li *et al.*, 2010.

III.6. Synthèse sur le rôle constructif de l'apoptose

L'apoptose a été longtemps vue comme un mécanisme d'élimination de cellules, que l'on peut qualifier de destructif, intervenant chez l'ensemble des métazoaires et dans différents processus morphogénétiques comme la métamorphose ou encore l'embryogenèse. Cependant, durant ces 15 dernières années, l'émergence de nombreuses données a mis en évidence un rôle plus large des cellules apoptotiques dans la morphogénèse. Cette nouvelle vision, que nous avons nommé la fonction constructrice de l'apoptose (FCA) s'oppose, ou plus exactement complète, la fonction destructrice de l'apoptose (FDA).

En effet, la FCA s'illustre par les acteurs moléculaires émis par les cellules apoptotiques de manière caspases-dépendante et modifiant le comportement ou le destin des cellules adjacentes.

Plusieurs cas avérés de FCA ont été mis en évidence, notamment l'induction de mécanismes de survie ou encore de la prolifération. Les cas de migration et de différenciation sont suggérés plus que démontrés dans la littérature, puisque ces comportements peuvent être induits par une voie caspases-dépendante, mais n'ont pas encore été observés à partir de cellules apoptotiques.

Cette définition de la FCA englobe les processus décrits dans la littérature par les termes tels : « regenerative apoptosis », « mechanical remodelling », « phoenix rising », « eat-me signal », « come-and-get-me signal » ou encore « Mahakali effect ».

IV. BILAN SUR LES RÔLES MORPHOGÉNÉTIQUES DE L'APOPTOSE

L'apoptose est l'un des trois types historiques de mort cellulaire, impliqué dans divers processus morphogénétiques (*i.e.* métamorphose) et mis en évidence aussi bien chez les modèles classiques (*i.e.* Mammalia) que dans d'autres groupes de métazoaires (*i.e.* Cnidaria). Historiquement, l'apoptose a longtemps été vue comme un mécanisme ayant une fonction d'élimination et est principalement décrite comme un moyen de supprimer les cellules devenues inutiles. Cette fonction classique représente la vision prédominante (FDA).

Cependant, cette vision qui paraît aujourd'hui restrictive est de plus en plus remise en question en raison des travaux qui ont montré que les cellules en apoptose, au-delà d'une simple élimination, sont capables d'interagir avec les cellules adjacentes. Plusieurs mécanismes d'interactions ont été décrits, l'un basé sur la modification physique des tissus par la mise en place d'une force mécanique, l'autre par l'activation de voies moléculaires issues de la cellule en apoptose et à destination des cellules voisines grâce à l'activité des caspases, protéases centrales dans la régulation de ce mécanisme. L'induction de comportements ou de destins cellulaires (*i.e.* prolifération) par des signalisations moléculaires caspases-dépendante issues de cellules apoptotiques (FCA) a été mis en évidence chez plusieurs groupes de métazoaires, aussi bien chez des modèles classiques (*i.e. Drosophila*) que chez des animaux bien moins connus (*i.e.* Cnidaria).

Nous avons vu que la FCA a été clairement observée dans l'induction de certains comportements ou destins cellulaires (*i.e.* mécanisme de survie), alors qu'elle est pour le moment seulement suggérée pour d'autres processus car mis en évidence dans un contexte non apoptotique, mais dépendant de l'activité des caspases (*i.e.* migration).

Cet ensemble de connaissances montre que les caspases peuvent être impliquées dans des cadres apoptotiques et non apoptotiques, et qu'elles ne sont pas exclusivement impliquées dans la régulation de l'apoptose. J'ai présenté d'une part la FDA et d'autre part la FCA, mais ces deux fonctions ne sont pas exclusives. Les rôles morphogénétiques de l'apoptose apparaissent plus complexes et sont multiples, impliquant qu'ils doivent être considérés dans leur globalité et non pas appréhendés au travers d'une vision trop restrictive. La présence de ces fonctions chez différents groupes de métazoaires phylogénétiquement éloigné invite également à s'interroger sur un rôle plus généralisable de l'apoptose à une large échelle évolutive. Cette vision nécessite l'étude d'organismes non-modèles et conduit à s'intéresser à l'évolution des acteurs moléculaires qui sous-tendent les rôles morphogénétiques de l'apoptose, tout particulièrement la famille multigénique des caspases.

V. LA FAMILLE MULTIGÉNIQUE DES CASPASES

V.1 Mode de fonctionnement des caspases

Les cellules en apoptose présentent une séquence d'événements et des caractéristiques morphologiques conservées entre les métazoaires (Kerr *et al.*, 1972 ; Zmasek *et al.*, 2011). La famille multigénique des caspases (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) en constitue l'élément central dans la mesure où l'ensemble des caractéristiques morphologiques cellulaires de l'apoptose résulte de leur activité (Hengartner, 2000). Ces enzymes clivent spécifiquement les peptides après un résidu aspartate (Cohen *et al.*, 1997). De plus, de nombreux travaux montrent qu'elles sont aussi probablement les principales responsables du rôle constructif de l'apoptose (Lauber *et al.*, 2003 ; Chera *et al.*, 2009 ; Vriz *et al.*, 2015 ; Krasovec *et al.*, soumis).

V.1.a. Structure des caspases

Les caspases sont des protéines de poids moléculaire moyen (entre 32 et 53 kDa) mais sont toutes caractérisées par la présence d'un pro-domaine en position N-terminal, de taille variable (3-24 kDa), d'une grande sous-unité nommée P20 (17-21 kDa) et d'une petite sous-unité nommée P10 (10-13 kDa) (Figure 21) (Thornberry & Lazebnik, 1998 ; Nicholson, 1999 ; Reed *et al.*, 2004). Entre le pro-domaine et le P20 se trouve un résidu aspartate, noté Asp-X, de même qu'entre les domaines P20 et P10. Le site actif se trouve au sein du domaine P20, et est classiquement composé du pentapeptide QACXG. Chez les vertébrés, X est le plus fréquemment, soit un Q (glutamine) (il s'agit alors d'une caspase -8-10), soit un G (glycine) (il s'agit alors d'une caspase 9) ou un R (arginine) (il s'agit alors d'une caspase -1-2-3-4-5-7) (Cohen *et al.*, 1997). La différence de taille entre les caspases résulte de la variation de longueur du pro-domaine (3-24 kDa). En effet, celui-ci est classiquement court (nommé DD – *Death Domain*, environ 20 aa), chez les caspases -3 -6 et -7 des vertébrés. Les autres caspases des vertébrés possèdent des longs pro-domaines (environ 90 aa). Les caspases 8 et 10 des vertébrés possèdent chacune deux domaines DED (*Death-Effector Domain*) (Cohen *et al.*, 1997 ; Meier *et al.*, 2000 ; Fan *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2007). Ce cas de figure est le seul où des caspases peuvent avoir un pro-domaine constitué de

deux domaines DED (Figure 22). Les caspases -1 -2 -4 -5 -9 -11 et -12 de vertébrés possèdent toutes un pro-domaine CARD (*Caspase Activation and Recrutment Domain*).



Figure 21: Structure générale d'une caspase. Une caspase est composée d'un pro-domaine qui peut être court (DD – non représenté sur la figure) ou long (CARD ou DED). Le long domaine P20 (*Large*) contient le site actif de la protéine (classiquement QAC \underline{X} G). Il est suivi par un domaine plus court, le P10 (*Small*). Le pro-domaine est donc potentiellement différent alors que toutes les caspases possèdent le P20 et P10. Un résidu aspartate (Asp-X) est présent entre les domaines, c'est un site de clivage permettant l'activation (non figuré ici). Modifiée d'après Nicholson *et al.*, 1999.



Figure 22: Diversité comparée des caspases entre mammifères, nématode et drosophile. Les domaines P20 et P10 sont conservés et partagés, alors que le pro-domaine est variable. On remarque une même structure globale partagée entre ces différents organismes. Modifiée d'après Kumar *et al.*, 2007.

En dehors de l'embranchement des vertébrés, il existe des caspases avec soit un pro-domaine court, soit un CARD ou un DED (*i.e.* Mollusca, Cnidaria, Tunicata) (Terajima *et al.*, 2003 ; Lasi *et al.*, 2010 ; Estevez calvar *et al.*, 2013 ; Zmasek *et al.*, 2013), mais les relations d'orthologies avec celles des vertébrés sont rarement établies. Le nématode possède une caspase-CARD (*Ced-3*). La drosophile possède quant à elle sept caspases, dont une caspase-CARD et une caspase-DED (Figure 22) (Kumar *et al.*, 2007).

V.1.b. L'activation des caspases

Les pro-caspases sont des zymogènes inertes dont les modes d'activation sont relativement bien compris. L'activation se fait par clivage entre les domaines P20 et P10 ainsi qu'entre le pro-domaine et le P20 au niveau du résidu Asp-X. Le mécanisme de contrôle est principalement post-traductionnel, la présence des protéines ne déclenchant pas d'apoptose si elles sont inactives (Salvensen & Dixit, 1997). La présence d'un aspartate de façon systématique suggère qu'une auto-activation est possible puisque par définition les caspases sont des protéases à cystéines clivant au niveau d'un aspartate.

Trois mécanismes d'activation des caspases ont été décrits :

Une activation par une caspase identique. Ce processus est qualifié d'auto-activation. (Figure 23).

Les pro-caspases à long pro-domaine se regroupent au sein de complexes protéiques, ce qui induit une forte concentration de zymogènes. Ce regroupement se fait grâce à la présence, au niveau de la plateforme protéique, de protéines adaptatrices possédant des domaines soit DED soit CARD. C'est le cas des caspases -8 -10 et de la caspase 2. Grâce à ce regroupement de pro-caspases *via* leur pro-domaine sur la plateforme activatrice, elles vont se cliver les unes les autres et s'activer (Hengartner, 2000).

2) L'auto-activation est identique au cas précédent mais nécessite l'intervention du cytochrome c en plus de la protéine adaptatrice.

Cette particularité ne concerne que la pro-caspase 9 chez les vertébrés (Figure 23) (Hengartner, 2000).

3) L'activation d'une pro-caspase par une caspase active différente (Figure 23). Typiquement, les caspases -2 -8 -9 et -10 sont capables d'activer les caspases -3, -6 et -7 (Hengartner, 2000).

57

En raison des modalités d'activation des caspases, qui nécessitent un clivage et/ou un recrutement par une plateforme protéique, la régulation est essentiellement post-traductionnelle. Cependant, les caspases sont également régulées grâce à l'intervention d'inhibiteurs spécifiques, tels que les IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*) (Verhagen *et al.*, 2001). Ces derniers sont retrouvés chez tous les organismes chez qui leur présence a été recherchée. Il s'agit d'inhibiteurs qui agissent directement sur les caspases (Verhagen *et al.*, 2001).

V.1.c. L'inhibition des caspases par les inhibiteurs d'apoptose : les IAPs

Étant donné que **les IAPs interagissent directement avec les caspases**, il est important de les présenter et d'expliquer leur fonctionnement. J'utiliserai le terme de « famille » pour les IAPs, mais ce regroupement est fondé sur leurs fonctions, et non pas sur une origine commune attestée. Le terme de famille multigénique n'est donc pas adapté.

Les premiers membres décrits de cette famille l'ont été chez des virus (Crook *et al.*, 1993 ; Birnbaum *et al.*, 1994 ; Reed, 2000), tels CrmA chez le virus de la vaccine (Ray *et al.*, 1992) ou p35 chez un bacculovirus (Bump *et al.*, 1995). Des IAPs ont ensuite été mis en évidence chez l'homme, avec sept membres décrits (Tschopp *et al.*, 1998). Actuellement, sept membres sont connus chez les mammifères et quatre chez la drosophile (Verhagen *et al.*, 2001) ainsi que deux chez *C. elegans*. Il s'agit, chez les mammifères, de Birc-1 (ou Niap), Birc-2 (ou Mihp / Hiap-2), Birc-3 (ou Mihc / Hiap-1), Birc-4 (ou Xiap / Miha), Birc-5 (ou Survivin), Birc-6 (ou Bruce) et enfin Birc-7 (ou Livin / Ml-iap / Kiap). En raison des nombreuses dénominations de chacune des IAPs, on retiendra les noms de Birc -1 à -7. Les quatre de la drosophile sont dIap-1, dIap-2, dBruce et Deterin. Le nématode possède CeBirp-1 et -2 (Verhagen *et al.*, 2001). Cette famille a également été mise en évidence chez des modèles appartenant à d'autres groupes phylogénétiques, comme *Ciona intestinalis* (Terajima *et al.*, 2003) ou le mollusque *Ostrea edulis* (Morga *et al.*, 2012).

Les IAPs sont tous dotés de 1, 2 ou 3 domaines BIR (*Bacculovirus Iap Repeat*) et certains, Birc-2 et -3, ont également un domaine CARD (Verhagen *et al.*, 2001).

Le fonctionnement d'inhibition des IAPs se fait part **interactions physiques** avec les caspases. **Les domaines BIR se lient au site actif de la caspase**, inhibant ainsi sa capacité de clivage. Par exemple, Birc-4 se lie *via* son domaine BIR-2 aux caspases -3 et -7 bloquant leur site actif pentapeptidique, alors que son domaine BIR-3 est responsable de sa capacité à inhiber la caspase 9 (Deveraux *et al.*, 1997, 1999 ; Roy *et al.*, 1997). D'une manière générale, les IAPs agissent de façon spécifique, n'ayant une action que sur une ou quelques caspases (aucun cas n'est documenté ou un IAPs semble capable d'inhiber toutes les caspases). Ces protéines peuvent bloquer toutes les voies



Figure 23: Représentation schématique des trois modes d'activation des caspases chez les mammifères. (**a**), une caspase déjà active, par clivage du résidu aspartate, peut activer une pro-caspase différente. (**b**), une plateforme protéique recrute un type de caspase *via* le pro-domaine. La concentration de pro-caspases qui en résulte aboutit à une auto-activation entre elles. (**c**), les pro-caspases 9 sont également regroupées autour d'une plateforme composée d'Apaf-1 mais également du cytochrome c, par opposition au cas **b**. Modifiée d'après Hengartner, 2000.

Chez la drosophile, l'importance de ces gènes a été montrée grâce à des approches de perte de fonction montrant que les IAPs sont nécessaires pour le développement des yeux. Il a également été observé qu'une surexpression de DIAP2 bloque l'apoptose (Hay *et al.*, 1995).

L'importance des IAPs est confirmée par le fait que certaines pathologies sont liées à des problèmes d'expression de certains gènes constituant cette famille (Agostini *et al.*, 2011).

V.2. Les groupes fonctionnels des caspases

Bien que des caspases interviennent systématiquement (et par définition) à différents niveaux de la régulation apoptotique, tous les membres de cette famille multigénique ne sont pas forcément impliqués dans la régulation et l'exécution de l'apoptose. Ces molécules peuvent ainsi être divisées en **deux groupes fonctionnels** (Figure 24) (Fan *et al.*, 2005 ; Shalini *et al.*, 2015).

Celles qui n'interviennent pas dans l'apoptose mais qui sont impliquées dans le système immunitaire sont **les caspases inflammatoires.** Chez les mammifères, ce sont les caspases-1, -4, -5, -11 et -12). Elles participent notamment à la maturation des cytokines. Toutes les caspases inflammatoires possèdent un pro-domaine CARD (Fan *et al.*, 2005 ; Martinon & Tschopp, 2007).

Le second groupe comprend les caspases qui interviennent dans l'apoptose et sont divisées en deux catégories en fonction des domaines protéiques qu'elles possèdent et de leur niveau d'intervention dans les voies de régulation (Figure 24) (Fan *et al.*, 2005 ; Elmore *et al.*, 2007). Les caspases apoptotiques dites initiatrices interviennent en amont dans les voies de signalisation, et présentent des pro-domaines longs. Les caspases-8 et -10 possèdent chacune deux pro-domaines DED, alors que les caspases-2 et -9 ont chacune un pro-domaine CARD (comme les caspases inflammatoires). Les caspases initiatrices interviennent très tôt dans la signalisation apoptotique et activent les caspases exécutrices. De plus, contrairement à ces dernières qui sont communes à toutes les voies de signalisation, les caspases initiatrices sont spécifiques à une voie de signalisation apoptotique. Chaque voie de signalisation est donc caractérisée par l'intervention de caspases initiatrices spécifiques chez les mammifères.

Les **caspases apoptotiques exécutrices** n'ont pas de long pro-domaine. Elles sont au nombre de trois chez les vertébrés, à savoir les caspases -3, -6 et -7. Les caspases exécutrices sont celles qui exécutent l'apoptose et sont à l'origine des caractères morphologiques, en clivant leurs substrats cellulaires. Elles sont communes à tous les voies de signalisation apoptotiques décrites chez les mammifères.



Figure 24: Classification des caspases de mammifères en fonction des groupes fonctionnels. Les caspases inflammatoires (1, 4, 5, 11, 12) possèdent toutes un pro-domaine CARD. Les caspases apoptotiques sont divisées en deux. Les initiatrices qui interviennent en amont de la signalisation apoptotique possèdent un long pro-domaine. On remarque que les caspases-8 et -10 ont deux domaines DED. Les caspases exécutrices (3, 6, 7) ont un pro-domaine court et interviennent en fin de régulation. Modifiée d'après Shalini *et al.*, 2015.

V.2.a. Les caspases inflammatoires

L'activité de clivage des caspases permet l'exécution de l'apoptose par coupure des différents constituants cellulaires, tel l'ADN ou les filaments d'actines. C'est cette capacité de clivage qui fait que les caspases interviennent dans des processus cellulaires autres que l'apoptose. Ainsi j'aborde dans cette partie les caspases inflammatoires, qui n'ont été que brièvement évoquées pour le moment.

Ce point sur les caspases non apoptotiques est important car il permettra d'avoir une vue d'ensemble sur cette famille multigénique, dont la classification sur la base de groupes fonctionnels doit être relativisée. Leur fonction, telle qu'elle est décrite, pourrait se discuter comme une forme de FCA dans la mesure où la cellule n'est pas en apoptose mais influe sur les cellules adjacentes par l'émission d'un signal moléculaire de manière caspase-dépendante.

Les caspases inflammatoires, comme leurs noms l'indiquent, jouent un rôle dans la réponse inflammatoire du système immunitaire chez les mammifères (sachant que tous les modèles sont des euthériens, on ne peut généraliser qu'avec prudence pour l'ensemble des mammifères) (Thornberry *et al.*, 1992; Ghayur *et al.*, 1997). Elles sont au nombre de 4 chez les mammifères, bien caractérisées sur la base d'une bibliographie importante.

Chez le primate *Homo sapiens* (Linnaeus, 1758), entrent dans ce groupe les caspase -1, -4, -5 et -12 (Shalini *et al.*, 2015). La souris ne possède pas de caspase 4, mais une caspase 11 qui est considérée comme son « homologue » dans la littérature. Il en est de même pour la caspase 13 des *bovinae* (shalini *et al.*, 2015), du moins si l'on généralise le cas de *Bos taurus* (Linnaeus, 1758). D'autres caspases existent, mais leurs fonctions ne sont pas connues et peu de documentations existent à leurs sujets comme les caspases-16 (Mammalia), -17 (Vertebrata Osteichthyes) et -18 (Vertebrata Tetrapoda) (Eckhart *et al.*, 2008).

La première description d'un rôle non apoptotique concerne la caspase 1. Elle intervient dans la maturation de certaines protéines de la famille des cytokines, l'interleukine 1B (II-1B) et l'interleukine 18 (II-18) (Thornberry *et al.*, 1992 ; Ghayur *et al.*, 1997). Ces cytokines proinflammatoires produites par les macrophages et monocytes sont présentes dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur inactif (pro II-1B, ou P35) et sont activées *via* leur clivage protéolytique par la caspase 1 au niveau de l'Asp-116. Cette activation permet le recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles et assure le bon déroulement de la réaction immunitaire. Le rôle central de la caspase 1 est confirmé par les problèmes de maturation des interleukines rencontrés chez les souris mutantes (KO pour la caspase 1) ainsi que par l'absence de réponse inflammatoire lorsque l'on tente de la provoquer artificiellement (Siegmund, 2002). Bien que le rôle de la caspase 1 soit relativement bien documenté, on sait qu'il y a intervention d'autres caspases telles que Il caspase-5 chez l'homme ou 11 chez la souris (Shalini *et al.*, 2015).

L'intervention des caspases inflammatoires se fait à travers un large complexe protéique, **l'inflammasome** (Martinon *et al.*, 2002). La formation de ce complexe peut démarrer suite à la reconnaissance de différents signaux provenant d'agents pathogènes, tels que les lipopolysaccharides, détectés par des récepteurs membranaires cytoplasmiques. Les récepteurs NLRP1 (aussi nommé NALP1) et NLRC4 ont la particularité de posséder un domaine CARD permettant le recrutement des caspases-1 et -5 (Latz *et al.*, 2013).

L'inflammasome, formé entre autres de ces récepteurs, sert de plateforme protéique pour recruter les caspases inflammatoires cibles. La proximité et le regroupement de pro-caspase 1 va permettre leur auto-activation (conformément aux mécanismes d'activations connus ; l'activation est donc similaire

à celle de certaines caspases apoptotiques initiatrices). Le clivage des interleukines conduit à la réponse immunitaire, clivage qui se fait au niveau d'un résidu aspartate, comme pour les substrats cellulaires des caspases apoptotiques.

V.2.b. Les caspases apoptotiques

Les voies de signalisation apoptotique ont été décrites indépendamment chez les mammifères, le nématode *Caenorhabditis elegans* (modèle historique dans la caractérisation des acteurs moléculaires) et la drosophile *Drosophila melanogaster*. C'est sur la base d'une ressemblance globale, de similarité de séquences, voire de considérations fonctionnelles, que les différents acteurs qui interviennent dans les voies de signalisation entre ces trois espèces ont été considérés comme homologues. La généralisation faite à partir de ces modèles aboutit à une vision gradiste de l'évolution des voies de signalisation apoptotique, simples chez les « invertébrés » (sic) en opposition aux mammifères, « organismes supérieurs » (notion qui, bien évidemment, n'a pas lieu d'être). Pour ces raisons, les voies de signalisations apoptotiques sont considérées *de facto* comme conservées à l'échelle des métazoaires. La présence d'acteurs des voies apoptotiques identifiée par similarité de séquences chez d'autres groupes de métazoaires (*i.e.* Cnidaria, Spongia, Mollusca) conforte cette hypothèse (Zmasek *et al.*, 2013 ; Shalini *et al.*, 2014 ; Romero *et al.*, 2015).

Ces postulats d'homologies effacent les différences qui existent entre ces modèles d'une part, et entretiennent d'autre part l'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation apoptotiques sont conservées chez les animaux. Cependant, l'absence ou presque d'analyses phylogénétiques dans la littérature oblitère toutes propositions de scénario évolutif. Avant de discuter de la conservation des voies de signalisation entre groupes il paraît indispensable de réaliser des analyses phylogénétiques. Dans cette partie, je vais donc décrire ce qui est connu chez les modèles classiques, puis élargir mon propos à partir des connaissances issues d'autre espèces, ce qui me permettra de prendre position quant à la vision qui prédomine dans la littérature.

1) La voie de signalisation intrinsèque

La voie de signalisation intrinsèque est également appelée voie mitochondriale, puisqu'elle fait intervenir, comme son nom l'indique, la mitochondrie qui est au centre de la signalisation (Figure 25). « The NCCD proposes to define intrinsic apoptosis as a form of RCD initiated by perturbations of the intracellular or extracellular microenvironment, demarcated by MOMP and precipitated by executioner caspases, mainly CASP3. »

La voie mitochondriale fait classiquement intervenir trois types d'acteurs. Elle est présente chez les vertébrés, le nématode et la drosophile et résulte de stress induits notamment par les ROS (*Reactive Oxygen Species*), une hypoxie, une dérégulation des facteurs de croissances ou autres perturbations intra- ou extracellulaires (Hengartner, 2000 ; Meier *et al.*, 2000 ; Galluzzi *et al.*, 2018). Avant d'entrer dans le détail de chaque modèle, je présente le schéma consensuel composé de trois phases, avec trois types d'acteurs (Hengartner, 2000 ; Reed, 2000 ; Fan *et al.*, 2005 ; Tait & Green, 2010 ; Fuch & Steller, 2015), qui en s'appuyant sur la chronologie des événements est le suivant :

- La voie mitochondriale implique la famille multigénique des *Bcl-2* qui influe sur la mitochondrie et sa capacité à déclencher la signalisation apoptotique. Les protéines Bcl-2, qui possèdent toutes entre 1 et 4 domaines BH (*Bcl-2 Homologie Domain*), sont soit pro-apoptotiques soit anti-apoptotiques. Les pro-apoptotiques modifient le potentiel de membrane de la mitochondrie, aboutissant à une perméabilisation de celle-ci. Un groupe particulier de *Bcl-2*, les BH3-only (gènes ne possédant qu'un seul domaine BH3), sont des pro-apoptotiques inhibiteurs des membres de la famille anti-apoptotiques.
- 2) Sous l'influence des protéines Bcl-2 (déséquilibre entre les pro- et anti-apoptotiques), la modification du potentiel de membrane de la mitochondrie (MOMP *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) peut conduire au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme qui formera un complexe avec Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor-1*), nommé « apoptosome ».
- 3) L'apoptosome permet d'activer la pro-caspase initiatrice spécifique de la voie mitochondriale : la caspase initiatrice 9. Elle possède le pro-domaine CARD qui permet l'interaction avec Apaf-1, constituant du complexe apoptosome. De façon classique, la caspase initiatrice, sous sa forme active, clive les pro-caspases exécutrices (3, 6 et 7), et l'apoptose est exécutée par ces dernières comme pour la voie extrinsèque.

Ces trois étapes seront maintenant détaillées, pour rendre compte des similitudes et des différences entre les modèles.

Chez le nématode, l'unique voie de signalisation existante est la voie mitochondriale (Figure 25). Historiquement, c'est chez Caenorhabditis elegans que la signalisation de la mort cellulaire programmée par apoptose a été identifiée puis étudiée pour la première fois (Ellis & Horvitz, 1986; Oberst, 2008; Oberst et al., 2008). Par l'étude de mutants, plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose ont été découverts et nommés par l'acronyme ced (Cell Death Defective) ou egl (Egg Laying Defective). Il s'agit de ced-3, ced-4, ced-9, et egl-1. Ced-3 est une caspase possédant un domaine CARD, et elle est la seule à intervenir de facon certaine dans la régulation de l'apoptose parmi les quatre caspases identifiées chez le nématode (respectivement Ced-3, Csp-1, Csp-2 et Csp-3). L'intervention de Ced-3 dans la voie mitochondriale et la présence d'un pro-domaine CARD est l'argument qui la désigne de facto comme homologue de la caspase 9 des vertébrés dans la littérature. Ced-4 est considérée comme étant l'équivalent d'Apaf-1, et interagit donc avec Ced-3 via leurs domaines CARD respectifs, l'ensemble composant, comme chez les vertébrés, l'apoptosome. Egl-1 et Ced-9 sont deux membres de la famille Bcl-2, et comportent respectivement une BH3-only pro-apoptotique, et un anti-apoptotique avec comme chez les vertébrés 4 domaines BH. L'interaction de ces acteurs définit la voie mitochondriale du nématode (Hengartner, 2000; Meier et al., 2000; Fuch & Steller, 2015).

La protéine Egl-1 est un inhibiteur de Ced-9, elle-même inhibiteur de Ced-4. Ced-9 séquestre Ced-3 à la membrane de la mitochondrie, qui sert alors essentiellement de support physique. Ced-4 est libérée dans le cytoplasme sous l'effet d'Egl-1, et forme avec la caspase centrale de la voie, Ced-3, le complexe qui permettra l'activation de cette dernière. En revanche, **il n'y a pas relargage du cytochrome c**, et Ced-4 (équivalant d'Apaf-1 qui interagit avec le cytochrome c et la caspase 9 chez les vertébrés) ne possède pas les domaines répétés WD qui normalement permettent l'interaction avec celui-ci. La présence de Ced-4 suffit pour la formation du complexe (Inohara *et al.,* 1998 ; Hu *et al.,* 1999). **Il n'y a pas non plus de MOMP**. Le rôle de la mitochondrie, dans cette voie mitochondriale, est donc différent du cas des vertébrés. Sa seule implication est que Ced-9 doit y être physiquement accrochée pour interagir avec Ced-4. Elle sert donc uniquement de structure d'ancrage.

Une fois active, **Ced-3 jouera également le rôle d'une caspase exécutrice** induisant le déroulement de l'apoptose. On notera qu'il n'y a donc que cette caspase (avec un long pro-domaine CARD), qui joue simultanément le rôle des caspases dites exécutrices (caspases possédant un court pro-domaine DD chez la drosophile ou les vertébrés) (Hengartner, 2000 ; Meier *et al.*, 2000 ; Fuch & Steller, 2015).

Notons qu'il n'y a pas d'IAPs chez le nématode. Il est important de souligner également que 3 autres caspases ont été identifiées, respectivement Csp-1, Csp-2 et Csp-3, mais leurs rôles ne sont peu/voir pas connus. De plus, les séquences sont très divergentes des autres caspases classiquement

reconnues (Lamkanfi *et al.,* 2002). Je reviendrai plus tard sur leurs cas, qu'il sera intéressant de discuter, même succinctement, à la lumière d'analyses phylogénétiques.

Par conséquent, la voie mitochondriale du nématode est caractérisée par la présence de deux membres Bcl-2, d'un équivalent fonctionnel d'Apaf-1, de l'absence de MOMP et d'une activation de Ced-3 qui ne nécessite pas de cytochrome c ainsi que l'absence de caspases exécutrices.

Chez les mammifères (Figure 25) (souris / homme) la famille de gènes *Bcl*-2 présente 12 membres (Youle *et al.*, 2008). Les protéines correspondantes possèdent toutes au moins le domaine BH3. Les membres de cette famille possédant uniquement le BH3 (commun) sont regroupés au sein des BH3only, toutes pro-apoptotiques. Les autres membres de la famille sont caractérisés par la présence de domaines BH supplémentaires. Les anti-apoptotiques, dont le principal membre est Bcl-xl, possèdent quatre domaines BH. Les pro-apoptotiques que sont Bax, Bok (*bcl-2-related ovarian killer*) et Bak (*Bcl2 antagonist/killer*) ont, quant-à-elles, trois domaines BH (Tait & green, 2010). Cette famille influe sur le potentiel de membrane de la mitochondrie, potentiel qui résulte d'une balance entre anti- et pro-apoptotiques (Tait & Green, 2010).

Les pro-apoptotiques interagissent physiquement avec la mitochondrie, et provoquent une perméabilisation de sa membrane provoquant le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Cohen *et al.*, 1997; Fuch & Steller, 2015). L'apoptosome sera alors formé d'Apaf-1, du cytochrome c et de la pro-caspase 9 (Meier *et al.*, 2000). L'intervention du cytochrome c est fondamentale et fait de la MOMP un élément indispensable chez les mammifères. Les pro-caspases 9 s'activent, il en résulte, classiquement, une activation des caspases exécutrices, en particulier la caspase 3 (Hengartner, 2000 ; Fan *et al.*, 2005 ; Tait & Green, 2010 ; Fuch & Steller, 2015).

Chez la drosophile, la voie de signalisation mitochondriale est la seule voie mise en évidence (Figure 25). La drosophile est devenue un organisme majeur dans l'étude de la mort cellulaire programmée, avec l'identification en 1994 des premiers gènes impliqués dans la machinerie apoptotique. La drosophile possède davantage de gènes impliqués dans la signalisation apoptotique que le nématode pourtant phylogénétiquement proche (Ecdysozoa). Deux gènes pro-apoptotiques de la famille *Bcl-2* ont été identifiés, *debcl* et *buffy*, ainsi que le gène *dark* (= *ark*) qui est l'équivalent fonctionnel de Apaf-1 et de Ced-4 (ces trois gènes sont considérés orthologues dans la littérature). Concernant les caspases, six membres ont été répertoriées dont l'une possédant un pro-domaine CARD (Dronc) et une seconde ayant un pro-domaine DED (Dredd). Les quatre autres caspases sont considérées comme étant des caspases (potentiellement) exécutrices en raison de l'absence de long pro-domaine DED ou bien CARD. Il s'agit des protéines Ice, Dcp1, Dcp2 et

Decay (Dorstyn *et al.*, 1999 ; Adrain & Martin, 2001 ; Doumanis *et al.*, 2001 ; Harvey *et al.*, 2001). La famille des IAPs est représentée par trois gènes dénommés diap-1 (*Death-associated inhibitor of apoptosis 1*), diap-2 ainsi que la détérine. **Par ailleurs, trois gènes pro-apoptotiques spécifiques de la drosophile (sans équivalent identifiés chez d'autres espèces) ont été mis en évidence :** *reaper, grim et hid.* **Les protéines correspondantes ont la particularité d'être des inhibiteurs des trois IAPs.**

L'interaction de l'ensemble de ces acteurs définit la voie mitochondriale de la drosophile (Hengartner, 2000 ; Koumar & Doumanis, 2000 ; Meier *et al.*, 2000 ; Fuch & Steller, 2015).

Les IAPs, en particulier Diap-1, sont des inhibiteurs qui maintiennent une inhibition permanente sur la caspase Dronc par une expression constante dans les cellules de la drosophile. Contrairement aux deux autres voies mitochondriales décrites (celles des mammifères et du nématode), chez la drosophile son déclenchement nécessite donc une levée d'inhibition. Ce sont Reaper, Grim et Hid qui ont cette fonction et le blocage des IAPs permet de lever l'inhibition que ces dernieres exercent sur la caspase Dronc. L'activation de cette dernière, par Dark, est alors possible et permet le déroulement de la suite de la signalisation. Il n'y a pas de MOMP au cours du processus, et l'intervention du cytochrome c n'est pas nécessaire. Il semblerait, mais cela est encore débattu, que la mitochondrie puisse servir de support physique (comme chez le nématode pour la protéine Ced-9) pour les antagonistes des IAPs (Hid, Reaper et Grim) et non pas les Bcl-2 (Fuchs & Steller, 2015). Le rôle de la mitochondrie n'étant pas encore clair, c'est davantage la présence des homologues putatifs de la caspase 9 (Dronc) et d'Apaf-1 (Dark) qui ont conduit à considérer la voie de signalisation de la drosophile comme une voie mitochondriale. De façon étonnante, il semblerait que la voie de signalisation puisse se passer des protéines de la famille Bcl-2 (Debcl et Buffy) dont le rôle est toujours débattu, raison pour laquelle je n'en ai pas parlé.

Les similarités de séquences et les similarités fonctionnelles ont conduit à considérer les voies mitochondriales des mammifères, de la drosophile et du nématode comme homologues. Un schéma préétabli de la voie mitochondriale et centré sur les mammifères a alors servi de base. Pourtant, des différences existent entre ces trois modèles, et ne sont pas discutées. Les conséquences évolutives potentielles qu'elles impliquent sont fondamentales, d'autant plus que l'origine évolutive commune des acteurs apoptotiques entre ces modèles classiques n'est pas attestée.



Figure 25: Schématisation des signalisations apoptotiques de références, c'est-à-dire les voies mitochondriales présentent chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et les mammifères, ainsi que la voie des récepteurs de mort des mammifères.

La description de la voie mitochondriale et la comparaison entre mammifères, nématode et drosophile mettent en lumière des différences fondamentales.

- Chez les mammifères, les membres de la famille Bcl-2 sont nombreux (supérieur à 10 ; *i.e* 12 chez l'homme), et comprennent des anti- et des -pro-apoptotiques. Chez la drosophile, deux Bcl-2 pro-apoptotiques sont identifiés, et un seul anti-apoptotique chez le nématode.
- 2) Chez les mammifères, les Bcl-2 permettent une perméabilisation de la membrane de la mitochondrie conduisant au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Chez la drosophile et le nématode, le potentiel de membrane mitochondriale n'est pas modifié, il n'y a pas de relargage du cytochrome c. La mitochondrie sert de support physique pour le Bcl-2 du nématode, mais son rôle n'est pas clair chez la drosophile.

- La drosophile possède trois inhibiteurs des IAPs (*IAP antagonists*), sans équivalents découverts chez les autres espèces. Ils permettent une levée d'inhibition en bloquant les IAPs, fonctionnement unique à la drosophile.
- 4) L'activation de la caspase 9 des mammifères nécessite, en plus de la protéine activatrice Apaf-1, un relargage du cytochrome c par la mitochondrie. Chez la drosophile et le nématode, la protéine activatrice suffit, le cytochrome c n'ayant pas de rôle avéré dans la signalisation apoptotique.

L'idée d'une conservation de la voie mitochondriale chez les métazoaires est largement acceptée. Cette idée sans doute fausse, au moins partiellement, repose sur le fait que les différents acteurs identifiés ont été considérés comme identiques voire homologues. Je tiens à souligner également le fait que, dans la définition de la voie de signalisation mitochondriale du NCCD-2018, la MOMP fait partie intégrante des critères qui la caractérise, ce qui est extrêmement restrictif car exclut de fait les ecdysozoaires : le cas de la drosophile et du nématode, pourtant des modèles historiques et phares dans la découverte du fonctionnement des voies apoptotiques, n'est pas évoqué.

Face à cette vision centrée sur les mammifères, et en raison des différences remarquables entre les trois modèles classiques, mais aussi compte tenu de la quasi-absence d'analyses phylogénétiques dans la littérature, la question de l'homologie des acteurs et donc de l'ensemble de la voie mitochondriale entre mammifères, nématode et drosophile se pose. Déterminer ces relations phylogénétiques est un prérequis, jamais réellement envisagé, permettant d'analyser de façon pertinente l'évolution des voies mitochondriales et vraisemblablement de l'apoptose chez les animaux.

2) La voie de signalisation extrinsèque

La voie de signalisation extrinsèque est également appelée voie des récepteurs de mort puisqu'elle fait intervenir, comme son nom l'indique, des récepteurs transmembranaires. *Via* ces récepteurs, la voie est déclenchée par des signaux externes à la cellule. Cette voie fait intervenir les caspases à pro-domaine DED (caspase-DED) (Figure 25). « We propose to define extrinsic apoptosis as a type of RCD initiated by perturbations of the extracellular micro-environment that are detected by plasma membrane receptors, propagated by CASP8 (with the optional involvement of MOMP), and precipitated by executioner caspases, mainly CASP3. »

Elle est très bien décrite chez les mammifères, mais peu d'éléments sont connus chez d'autres groupes. Pour ces raisons, la voie extrinsèque peut être synthétisée en s'appuyant sur les travaux issus de la souris et l'homme (Cohen., 1997 ; Meier *et al.*, 2000 ; Hengartner, 2000 ; Reed., 2000 ; Fan *et al.*, 2005 ; Elmar *et al.*, 2007 ; Fuchs & Steller, 2015). Elle peut être divisée en plusieurs étapes successives :

- Les récepteurs de mort transmembranaires (*i.e.* CD95) sont activés par la présence de ligands spécifiques extra-cellulaires (*i.e.* CD95L).
- L'activation des récepteurs induit le recrutement de protéines dites activatrices (ou adaptatrices), soit FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*) soit TRADD (*TNFRSF1A-associated via death domain*).
- 3) FADD et TRADD possèdent des domaines DED qui vont recruter respectivement les pro-caspases -8 ou -10. Ce sont les caspases initiatrices -8 et -10 qui sont spécifiques de cette voie. Elles sont également les deux seules qui possèdent les pro-domaines DED.
- 4) Un complexe est ainsi formé, le DISC, composé de récepteurs de mort activés par le ligand correspondant (*i.e.* CD95 activé par CD95L), de protéines activatrices (soit FADD soit TRADD), et d'une caspase ayant un pro-domaine DED (caspase-DED - soit 8 soit 10).
- 5) La proximité des pro-caspases au sein du DISC permet leurs auto-activations, conformément aux modes d'activation décrits précédemment.
- 6) Les caspases initiatrices maintenant activées vont cliver les pro-caspases exécutrices -3, -6 et -7, donnant les caspases-3, 6 et 7 qui vont elles-mêmes cliver les substrats et provoquer les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. C'est surtout la caspase exécutrice 3, et dans une moindre mesure la 7, qui seront activées (Galluzzi *et al.*, 2018).

La voie de régulation extrinsèque est ainsi bien décrite chez les mammifères, mais quelques données existent chez d'autres groupes puisque des acteurs de cette voie ont été identifiés en dehors des mammifères. L'hypothèse qu'elle soit présente à une plus large échelle évolutive est donc probable. Cependant, la détermination de ces acteurs potentiels (*i.e.* caspase 8, récepteurs de morts) est basée sur des similarités de séquences, et les relations d'homologies ne sont donc pas connues.

On peut noter cependant que des caspases possédants un domaine DED ont été mises en évidence notamment chez des cnidaires, des mollusques, la drosophile (la caspase Dredd) ou encore des urochordés (Terajima *et al.*, 2003 ; Lasi *et al.*, 2010 ; Shalini *et al.*, 2014 ; Sakamaki *et al.*, 2015).

Il est important de noter que les caspases -8 et -10 ont deux pro-domaines DED. Cela n'est pas toujours le cas, puisque des espèces, comme l'huître japonaise *Crassostrea gigas (Mollusca)*, ont des caspases avec deux pro-domaines DED, et d'autres caspases avec un seul (recherches personnelles). Cette curieuse différence, qui ne concerne pas que cette espèce, est peu/pas discutée dans les publications. De plus, la caspase de la drosophile Dredd est considérée comme initiatrice et homologue de la caspase 8. Pourtant, son pro-domaine est assez différent de celui des vertébrés et ceci n'est pas toujours pris en considération dans la littérature. Le manque d'analyses phylogénétiques exhaustives invite à utiliser le terme d'« homologie » (couramment employé) avec prudence. La présence du complexe FADD est également attestée chez la drosophile, mais le même problème se pose, à savoir une détermination basée sur une similarité de séquence. De plus, la caspase Dredd ne semble pas impliquée dans l'apoptose, mais dans le système immunitaire (Shalini *et al.,* 2015). Chez le nématode, il n'existe pas de caspase avec un pro-domaine DED, et aucune étude ne met en évidence l'existence de la voie extrinsèque.

Pour comprendre l'évolution de la voie de signalisation extrinsèque, il est nécessaire de faire des analyses phylogénétiques afin de déterminer si les acteurs identifiés entre les espèces sont homologues ou non. Ensuite, des études fonctionnelles doivent être effectuées sur des modèles non mammaliens pour pouvoir comprendre le fonctionnement de cette voie de signalisation à une plus large échelle évolutive.

3) Une voie de signalisation dépendante de la caspase 2

La caspase 2 est la caspase initiatrice de la voie dépendante de p53 décrite chez les mammifères, en réponse à des dommages sur l'ADN (Figure 26) (Lassus *et al.*, 2002). Par rapport aux voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque, celle-ci est moins étudiée, moins généralisable et par conséquent souvent mise de côté dans les revues de généralisation sur l'apoptose. À l'inverse des voies extrinsèque et intrinsèque très bien décrites chez les mammifères, la place de la voie dépendante de la caspase 2 est toujours controversée (Kumar *et al.*, 2007). Le fait qu'elle ne soit pas ou peu évoquée dans les rapports du NCCD est particulièrement signifiant. Elle fait intervenir la caspase 2 qui possède un pro-domaine CARD (comme la caspase 9 et les caspases inflammatoires). Cette voie résulte d'une réponse à des dommages sur l'ADN, qui
conduisent à l'activation de PIDD (*p53-induced death domain*), formant avec RAIDD (*RIP-associated Ich-1/Ced-3 homologous protein with a death domain*) un complexe protéique, le PIDDosome (Duan & Dixit, 1997; Lin *et al.*, 2000; Tinel & Tschopp, 2004). Ce complexe protéique va recruter les pro-caspases 2 conduisant à leurs auto-activations. En clivant Mdm2 (un inhibiteur connu de p53), la caspase 2 va stabiliser le niveau d'expression de p53 (Haupt *et al.*, 2003).

Cette caspase initiatrice est particulière pour plusieurs raisons :

- Unique caspase présente dans le noyau, elle peut également jouer le rôle d'une exécutrice en participant à l'exécution de l'apoptose (*i.e.* en clivant la protéine Golgin-160 conduisant à la dégradation du golgi) (Degterev *et al.*, 2003 ; Roos & Kaina, 2006).
- Elle peut déclencher, de façon détournée, la voie mitochondriale en modifiant le MOMP. C'est par l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qu'elle peut influer sur le potentiel de membrane aboutissant au relargage du cytochrome c (Fan *et al.*, 2005 ; Zhivotovsky *et al.*, 2005 ; Bonzon *et al.*, 2006).
- 3) Elle peut déclencher, de façon détournée, la voie des récepteurs de mort en interagissant avec le DISC et déclencher l'activation des pro-caspases -8 et -10 (Lavrik *et al.*, 2006).

La caspases 2 est par conséquent une caspase initiatrice qui peut aussi être exécutrice et capable de déclencher les deux voies apoptotiques classiques chez les mammifères (extrinsèque – intrinsèque). Elle se place donc en amont des autres caspases initiatrices, dans la mesure où elle représente l'unique cas d'une caspase initiatrice pouvant activer une autre caspase initiatrice différente (Figure 26). Elle dépend également de p53. En dehors des mammifères, sa présence est proposée sur la base d'identifications par similarités de séquences, ou bien *via* des analyses phylogénétiques présentant des biais (que j'évoquerai ultérieurement), ne permettant pas de connaître les relations d'orthologies de ces caspases. Certaines caspases identifiées comme étant la caspase 2 interviennent dans la régulation de l'apoptose chez des espèces non mammaliennes (*i.e.* le mollusque *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819)) (Yang *et al.*, 2015).

La caspase 2 est une caspase CARD particulière, dépendante de p53, et capable d'activer les autres caspases initiatrices mais aussi de se comporter comme une caspase exécutrice.

V.2.c. Synthèse sur les voies de signalisation apoptotiques

La voie extrinsèque est peu décrite hors des mammifères. La raison principale est qu'elle

n'est pas présente chez les deux modèles historiquement fondamentaux que sont la drosophile et le nématode. En revanche, des caspases possédant des domaines DED, ainsi que d'autres acteurs de la voie comme les FADD, sont présents chez d'autres espèces (*i.e. Branchiostoma* (Cephalochordata), *Crassostrea* (Mollusca)) (Kiss *et al.*, 2010 ; Yuan *et al.*, 2010 ; Zmasek *et al.*, 2013). Cependant, l'orthologie entre ces gènes doit être vérifiée par analyse phylogénétique. De plus, le manque de données expérimentales hors des mammifères ne permet guère d'émettre d'hypothèses sur l'évolution de cette voie de signalisation.

La caspase 2 est impliquée dans une voie spécifique aux mammifères et semble être capable de déclencher les voies extrinsèque comme intrinsèque. Des caspases-CARD sont également présentes chez d'autres organismes (Srivastava *et al.*, 2010 ; Zmasek *et al.*, 2013 ; Romero *et al.*, 2015), mais il n'est pas possible de connaître les orthologues de la caspase 2 chez ces derniers.

La voie mitochondriale est très bien décrite chez les mammifères, la drosophile et le nématode mais il est nécessaire d'établir les relations évolutives entre ses acteurs pour pouvoir discuter de sa conservation. Les différences existantes entre les modèles classiques pourront être discutées avec plus de pertinence si les relations phylogénétiques entre l'ensemble des acteurs (gènes) sont clairement établies.

Ces données montrent que l'étude de nouveaux modèles, hors des mammifères et des ecdysozoaires, est indispensable. La définition de l'apoptose au travers des voies de signalisation apoptotique à partir des seuls mammifères, comme le fait le NCCD, exclut de fait les autres métazoaires. Cette définition, faisant des mammifères « une norme», laisse croire également qu'elle est généralisable, ce qui laisse penser que les acteurs sont orthologues et les voies conservées. Pourtant, ce n'est pas le cas au vu des éléments précédemment soulignés dans ce chapitre. La vision d'une voie mitochondriale homologue semble peu soutenable, et il serait plus pertinent de parler de plusieurs voies de signalisation entre les modèles classiques. Réaliser des analyses phylogénétiques est fondamentale pour déterminer les relations d'orthologies, sans quoi il sera impossible de discuter de la conservation <u>des voies</u> mitochondriales entre les espèces.

Cependant, il convient d'abord de faire un point sur l'évolution des caspases telle qu'elle est présentée dans la littérature.



Figure 26: La voie de signalisation apoptotique dépendante de la caspase 2 peut déclencher les deux voies classiques de signalisation, intrinsèque et extrinsèque. La caspase 2 active peut également jouer le rôle de caspase exécutrice. Modifiée d'après Fernald & Kurokawa, 2013.

VI. L'ÉVOLUTION DES CASPASES

Afin de pouvoir aborder l'histoire évolutive des caspases, il convient de définir clairement les termes décrivant l'évolution des gènes. La notion d'homologie renvoie à une origine évolutive commune. Celle-ci peut être de deux types. La paralogie correspond à une origine commune issue d'une duplication, par exemple du gène ou du génome, chez une même espèce ou un clade. L'orthologie correspond à une origine commune issue d'une séquence ancestrale hypothétique présente chez l'ancêtre commun. En d'autres termes, il s'agit de gènes présents dans différentes espèces, qui ont une origine identique provenant d'une spéciation. Afin de définir ces relations d'homologies, la méthode qui doit être utilisée est une approche fondée sur des analyses phylogénétiques des gènes.

Par conséquent, un alignement par BLAST ne permet pas de définir les relations d'orthologies. En revanche, un tel alignement peut conduire à postuler sur les relations évolutives à partir de similarités de séquences. Si des gènes ont des séquences très voisines, il est possible et tentant d'émettre l'hypothèse qu'ils ont une origine commune, mais cela résulte d'un pari hasardeux !

Le même raisonnement s'applique pour des gènes remplissant une même fonction. Les relations évolutives basées sur la fonction posent le problème des convergences, qui peut être d'autant plus épineux dans une famille multigénique où beaucoup de gènes se ressemblent et possèdent les mêmes domaines. Aussi, pour ces mêmes raisons, on ne peut pas écarter des redondances de fonctions éventuelles.

De plus, une famille multigénique comprend par définition de nombreux membres, avec des différences potentielles entre les espèces en raison de pertes ou de duplications s'étant accumulées au cours de l'évolution, ce qui brouille le signal phylogénétique.

L'analyse des topologies nécessite également l'emploi de termes bien définis dans la présentation et la discussion des groupes de séquences, qu'il est nécessaire de présenter.

Un groupe monophylétique (ou clade) est un groupe contenant absolument tous les descendants, et seulement les descendants, d'un ancêtre commun hypothétique (*i.e.* les mammifères sont un groupe monophylétique).

Un groupe paraphylétique est un groupe comprenant uniquement des séquences/espèces issues d'un ancêtre commun hypothétique, mais qui n'en contient pas tous les descendants (*i.e.* les dinosaures, si l'on exclut les oiseaux, sont un groupe paraphylétique).

Un groupe polyphylétique contient des séquences/espèces provenant de différents ancêtres hypothétiques, impliquant que l'ancêtre commun le plus récent est exclu du groupe (*i.e.* les

75

« poissons » sont un groupe polyphylétique).

In fine, la seule façon pertinente de comparer des voies de signalisation est de se fonder avant tout sur des gènes démontrés comme étant orthologues c'est-à-dire issus de spéciation.

VI.1. Les relations qui font consensus dans la littérature

VI.1.a. Les biais dans les analyses

Concernant les caspases, ce sont les similarités de séquences, les domaines et les fonctions qui sont au centre de l'analyse pour déterminer les relations évolutives. Les termes d'homologie, paralogie et orthologie sont trop souvent utilisés de manière arbitraire alors qu'ils impliquent des événements évolutifs bien caractérisés, dont on ne peut rendre compte qu'à travers des analyses phylogénétiques.

Ce sont ces raisons qui font que la famille multigénique des caspases est considérée comme très conservée, ainsi que les voies de signalisation apoptotiques associées. Cependant, pour discuter de l'évolution des caspases, il convient de déterminer le type d'origine des séquences, et de mettre en évidence des groupes monophylétiques, c'est à dire des groupes contenant tous les représentants, et les seuls représentants, issus d'une séquence ancestrale hypothétique commune. Des gènes formant un groupe monophylétique auront alors, par définition, une origine commune et seront dit homologues. Dans un second temps on pourra déterminer si cette homologie est une paralogie ou une orthologie. Pour réaliser ce travail, il est indispensable de faire des analyses phylogénétiques, ce qui n'est pas très courant dans la littérature concernant l'apoptose. Il en existe pourtant, mais elles sont rarement le sujet de discussion principale et ont généralement pour vocation de compléter une étude ou une synthèse sur les caspases, sans en être le centre de l'analyse. Elles présentent également certains biais qu'il est nécessaire de présenter.

Les phylogénies n'intègrent bien souvent que des séquences de vertébrés, ce qui donne des informations quant à leurs relations évolutives propres, mais à l'exception des gènes du nématode et de la drosophile, les autres groupes sont absents. Cependant, des analyses comportant des séquences non-vertébrés issues de travaux portant sur des modèles non classiques existent et certaines ont pour mérite de suggérer qu'une vision vertébro-centrique pose problème, nous y reviendrons (Chapitre III) (Moya *et al.*, 2016).

Beaucoup d'arbres ne sont pas racinés, ce qui pose un problème de lecture de la topologie puisque la racine permet de polariser l'arbre et donc de discuter de l'évolution des caractères. La racine, extérieure au groupe d'intérêt, sert de référence pour le groupe analysé (*i.e.* pour réaliser une phylogénie des mammifères placentaires, il est possible de prendre un mammifère marsupial en guise de groupe externe – le groupe d'intérêt, les placentaires, sera alors monophylétique).

De plus, les topologies proposées dans la littérature fournissent des informations, mais celles-ci ne sont que rarement discutées au travers des incohérences qu'elles peuvent éventuellement mettre en lumière.

Enfin, les caspases sont des protéines possédant des séquences relativement courtes (*i.e.* la caspase 9 de l'homme (NCBI – id. BAA82697.1) comprend 416 acides aminés (aa) sachant qu'elle possède un long pro-domaine CARD), ce qui limite la quantité d'informations disponibles supportant l'analyse. En effet, pour pouvoir déterminer des relations évolutives entre gènes, il est important que la quantité d'informations phylogénétiques soit *a minima* proportionnelle au nombre de séquences analysées. Or, pour les caspases, si l'on garde uniquement les domaines communs (P20 et P10) et que l'on supprime le « bruit de fond » (morceaux de séquences très divergentes) et les pro-domaines non partagés, l'alignement final disponible pour l'analyse se limite approximativement à 150 acides aminés.

Pourtant, exception faite du nématode et de la drosophile, le nombre de caspases caractérisé pour un même organisme est d'environ 10 ou plus (Lasi *et al.*, 2010 ; Terajima *et al.*, 2003, Robertson *et al.*, 2006 ; données personnelles). Cela implique que, si l'on souhaite faire une analyse avec toutes les caspases provenant d'organismes représentant l'ensemble des métazoaires, le nombre de séquences devient très vite trop élevé par rapport à l'information phylogénétique disponible. En effet, pour avoir un échantillonnage représentatif de la diversité taxonomique des métazoaires, il est important, au moins dans un premier temps, d'avoir deux ou trois espèces par phylums (*i.e.* 2 espèces de vertébrés – urochordés – échinodermes – mollusques – nématodes – insectes – cnidaires). Il en résulte un échantillonnage comprenant, dans cet exemple, 14 espèces. Avec une moyenne (basse) de 12 caspases par espèces (l'oursin déjà en possède 29), 168 séquences doivent être alignées.

Dans ce cas, le nombre de séquences (168) est supérieur à la longueur de l'alignement (150 aa) et a fortiori au nombre de sites informatifs. Ainsi, trop peu d'information phylogénétique est disponible pour permettre une analyse pertinente. Il faut donc cibler les espèces et les séquences, et faire des choix par rapport à la question posée. Je n'ai jamais vu, au travers de mes lectures, de discussion sur ce point. Il est important de le garder en mémoire, puisque j'y reviendrai dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

VI.1.b. L'exemple d'une phylogénie des caspases faisant référence

La phylogénie de Lamkanfi *et al.* (2002) fait généralement référence dans la littérature concernant la diversification des caspases et sert souvent de base pour présenter l'évolution des caspases dans les grandes revues qui y sont consacrées (Figure 27). Elle s'appuie sur l'analyse de caspases de vertébrés (inflammatoires, exécutrices, initiatrices) et sur celles de *Drosophila* et *Caenorhabditis*. Etant un cas de figure assez emblématique, je me permettrais un certain nombre de remarques liminaires concernant cette approche :

Les alignements intègrent les séquences protéiques des domaines P20 et P10. La longueur de l'alignement n'est pas donné, mais d'après les informations fournies et mes connaissances sur les caspases, on peut postuler que celui-ci avoisine les 150 aa (nb : déduction qui implique que le lecteur soit déjà bien au fait de la structure protéique des différentes caspases !). De façon globale, très peu d'informations méthodologiques sont fournies dans ce travail et grâce à la légende de la phylogénie, on saura que l'alignement est réalisé avec le programme ClustalX. Les auteurs écrivent *« The phylogenetic tree presented in Figure 1B is based on the amino acid sequences containing the p20 and p10 units, referred to as p30 caspase ».*

La méthode utilisée n'est donc pas précisée dans l'article, même si on se doute qu'une méthode de distance a été utilisée. Aucune information sur le soutien des nœuds n'est disponible et ce point n'est absolument pas évoqué. Il n'y a pas de groupes externes, cette notion n'est pas abordée.

Les résultats obtenus sont par conséquent totalement discutables. Cependant, une présentation des résultats des auteurs est nécessaire.

Grâce à cette analyse, les auteurs ont défini trois groupes parmi les caspases analysées. Ces trois « clusters » (notion peu classique et non définie par les auteurs !) ne correspondent pas tout-à-fait aux groupes fonctionnels classiquement proposés. Les termes usuels, à savoir la monophylie, la paraphylie ou la polyphylie, ou un clade, ne sont pas évoqués ici.

Le cluster 1 comprend les caspases inflammatoires des vertébrés, ainsi que la caspase 2 et les trois caspases de *Caenorhabditis elegans* utilisées dans cette étude (Ced-3, Csp-1 et Csp-2 – la Csp-3 n'est pas proposée dans l'étude car pas encore découverte). On a donc une caspase apoptotique initiatrice (la 2) regroupée avec des non-apoptotiques (les inflammatoires) et les séquences de nématode.

Le cluster 2 comprend les caspases exécutrices, comportant celles des vertébrés (3, 6 et 7) et de la drosophile (Strica, Damm, Decay, Dcp-1 et Drice). Les exécutrices, ou plus largement les caspases n'ayant pas de longs pro-domaines, sont ici monophylétiques.

Le cluster 3 contient les caspases -8, -9 et -10 des vertébrés ainsi que Dronc et Dredd de la drosophile. Ce groupe comprend uniquement des caspases initiatrices (mais pas toutes); en revanche, ces séquences n'ont pas le même pro-domaine, puisqu'on y retrouve des caspases-CARD et des caspases-DED. On remarque la présence de Dredd avec les caspases -8 et -10 ainsi que Dronc avec les caspases 9 de vertébrés.

Concernant le cluster 1, les auteurs soulignent que « *The* C. *elegans CED-3 is the godfather of the caspase family* ». Cette formulation pose problème puisqu'une séquence actuelle ne peut pas être ancestrale. Il convient en revanche de parler d'une séquence ancestrale hypothétique commune à l'ensemble de la famille. Cette formulation illustre également une vision gradiste qui stipule qu'un « invertébré » possède forcément une séquence « primitive », notion qui n'a pas de sens en évolution. De plus, Ced-3 n'est pas dans le cluster 3 comme on aurait pu s'y attendre étant donné qu'elle est considérée comme une caspase 9. Ce point aurait dû soulever des interrogations sur les relations d'homologies classiquement reconnues dans la littérature, et sur les notions de convergence et de conservation des voies de signalisation. Mise à part la position de Ced-3 dans l'arbre relevé par les auteurs, les implications évolutives ne sont pas abordées.

Au sujet des Casp-1 et Casp-2, les auteurs notent « *In the nematode the apparent lack of short prodomain caspases is bypassed by alternative splicing of CSP-1 and -2. However, protease activity has only been reported for CED-3 and CSP-1 »*. Un long pro-domaine est présent, mais non fonctionnel et n'est plus reconnaissable en tant que CARD. Bien que les auteurs semblent mettre en évidence ce point, il ne le discute pas. Pourtant, peut-on alors, lorsqu'une caspase est décrite chez une espèce de non-vertébré, la considérer automatiquement comme caspase exécutrice si elle ne possède pas de pro-domaine reconnaissable?

Concernant le cluster 2, les séquences de vertébrés forment des groupes monophylétiques, attestant des relations d'homologies considérées. Il est en revanche surprenant que les caspases d'ecdysozoaires ne forment pas, au moins, un ensemble de séquences sœurs. Cette topologie indique des origines potentielles différentes entre les caspases de drosophile et de nématode. Les discussions sur l'homologie des voies ne sont pas abordées. On soulignera, qu'il est bien connu que les séquences de *Caenorhabditis elegans* conduisent à des attractions de longues branches (LBA) assez problématiques dans les analyses phylogénétiques de façon générale.

Concernant le cluster 3, les auteurs s'interrogent sur l'évolution des pro-domaines, « *it* can be argued that the DED motif has evolved later, reflecting a demand for specific recruitment in receptor complexes. This may correlate with the origin of a dichotomy between extrinsic and intrinsic apoptotic cell death pathways ». Le fait que Ced-3 ne soit pas groupé avec « les autres caspases 9 », et que par conséquent Ced-3 et Dronc ne sont pas séquences sœurs, n'est pas discuté,

malgré les interrogations que cela soulève.

Au cours de la discussion, les auteurs profitent de la présentation du cluster 3 pour souligner le fait qu'Apaf-1, Ced-4 et Dark sont homologues. Les auteurs citent Duan & Dixit (1997) qui montrent dans leurs travaux des similarités fortes au niveau de la séquence protéique de ces trois gènes. Lamkanfi *et al.*, (2002), en citant Duan & Dixit (1997), affirment « *their corresponding Apaf-1 orthologues, called DARK/dAPAF-1/HAC-1 in D. melanogaster* » et poursuivent plus loin « *The apoptosome complex formed in the nematode is peculiar since CED-4, the functional homologue of Apaf-1* ».

Cette situation est particulièrement évocatrice : Lamkanfi *et al.* (2002) considèrent par défaut ces gènes comme orthologues, en s'appuyant sur des études dépourvues d'analyses phylogénétiques, ou seules les similarités de séquences ont été regardées.

Au vu des problèmes présentés ci-dessus, il apparaît évident que les relations évolutives à grande échelle entre les caspases doivent être reconsidérées. Toutefois, dans le cas des vertébrés ces relations semblent bien mieux étayées. Ainsi, les travaux de Moya *et al.*, 2016, ainsi que mes propres analyses, confortent un certains nombre de points. Les caspases exécutrices 3, 6 et 7 sont toujours monophylétiques, avec les 3 et 7 qui sont des paralogues. Il en est de même pour les caspases 8 et 10, toujours séquences sœurs et donc paralogues. Le fait que les séquences des caspases 9 forment un groupe monophylétique montre que leur nomenclature usuelle est pertinente. De même, les caspases inflammatoires et la caspase 2 ont vraisemblablement une origine commune car elles forment un groupe monophylétique. On peut donc dire que, concernant les vertébrés, les prédictions faites à partir des similarités de séquences semblent globalement confirmées par des analyses phylogénétiques plus poussées ainsi que par mes propres résultats. En revanche, les relations à plus grandes échelles entre ces différents groupes demeurent variables.

Étant donné que les caspases de vertébrés sont bien connues, il est facile et tentant de s'y référer. Ainsi, une fois les relations d'orthologies bien établies entre des gènes de vertébrés et ceux d'une autre espèce d'intérêt, on pourra tester l'hypothèse de fonctionnalités similaires, par exemple, en postulant que ces gènes appartiennent à la même voie de signalisation. Il faut cependant être prudent sur ce postulat, qui n'est qu'un outil de travail, car les cas de divergences fonctionnelles sont nombreux, y compris dans le cas de gènes orthologues (et *a fortiori* dans le cas de gènes paralogues).



Figure 27: Analyse phylogénétique regroupant les caspases de vertébrés, de la drosophile (Dronc, Strica, Damm, Decay, Dcp-1, Drice, Dredd) et du nématode (Ced-3, Csp-1, Csp-2) réalisée à partir des séquences protéiques des domaines P20 et P10, avec un alignement par Clustal-X. *Danio rerio* (z), *Xenopus laevis* (x), *Gallus gallus* (g), *Mus musculus* (m), *Homo sapiens* (h). Les méthodologies utilisée ne sont pas précisées. Modifiée d'après Lamkanfi *et al.*, 2002.

VI.2. Des données émergentes chez des modèles non classiques

Grâce aux modèles classiques, nous avons des connaissances approfondies sur la régulation de l'apoptose. A partir de ces connaissances, il est maintenant nécessaire de vérifier les relations phylogénétiques entre les différents acteurs de ces voies, mais aussi de prendre en compte les données émergentes chez d'autres organismes pour discuter avec plus de recul sur l'évolution des voies de signalisation apoptotiques.

Les études portant sur des génomes et transcriptomes ont mises en évidence la présence d'acteurs impliqués dans la régulation de l'apoptose chez plusieurs espèces (Zmasek *et al.*, 2007) telles *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinodermata) (Sodergren *et al.*, 2006, Robertson *et al.*, 2006), *Branchiostoma floridae* (Cephalochordata) (Zmasek *et al.*, 2007 ; Yuan *et al.*, 2010), *Ciona intestinalis* (Tunicata) (Terajima *et al.*, 2003), *Crassostrea gigas* (Mollusca) (Zhang & Zhang, 2011 ; Romero *et al.*, 2015), *Nematostella vectensis* (Cnidaria) (Darling *et al.*, 2005 ; Zmasek *et al.*, 2007), *Hydra viridis* (Cnidaria) (Lasi *et al.*, 2010a-b) ou *Amphimedon queenslandica* (Porifera) (Srivastava *et al.*, 2010). Le nombre très variable de gènes identifiés chez ces modèles montre une histoire évolutive complexe mais également une diversité insoupçonnée, soulignant que le seul groupe des vertébrés ne peut servir de référence à l'étude de l'apoptose chez les métazoaires. A titre d'exemple, l'oursin possède 29 caspases (voire 42 pour certains auteurs?) et 4 Apaf-1, l'amphioxus possède 2 FADD, la cione n'a que 3 Bcl-2, l'hydre possède 12 caspases tandis qu'un autre cnidaire, *Nematostella*, en possède 15. Les études sur les mollusques tendent à confirmer ces variations entre espèces (Romero *et al.*, 2015).

En prenant en compte les données récentes, Zmasek *et al.* (2013) ont répertorié sur une phylogénie des espèces à l'échelle des métazoaires les présences et absences des gènes potentiellement impliqués dans la machinerie apoptotique ainsi que leur diversité (Figure 28). En appliquant le principe de parcimonie, les auteurs insistent sur le fait que **la machinerie apoptotique chez l'ancêtre commun des métazoaires présentait tout aussi bien des membres de la famille Bcl-2 que des caspases, des protéines activatrices contenant des domaines CARD ou encore des domaines DED ainsi que des récepteurs de mort (Figure 28). De plus, la diversité de composition de ces familles multigéniques suggère que chaque famille soit représentée par plusieurs gènes chez le dernier ancêtre commun des métazoaires. Ces travaux, combinés aux données émergentes hors des modèles biologiques classiques, constituent un fort argument pour montrer la nécessité d'explorer en détail la machinerie apoptotique chez les métazoaires, son évolution, et par conséquent les fonctions morphogénétiques de l'apoptose (qui découlent des caspases) à une large échelle évolutive.**

L'apoptose est considérée comme essentielle à l'apparition de la multicellularité chez les métazoaires dans l'ensemble des travaux qui abordent cette question (Zmasek *et al.*, 2007, 2013). En effet, la capacité à moduler le nombre de cellules est considérée comme un prérequis pour pouvoir gérer un grand nombre de cellules, le développement et l'organisation des tissus inhérents à la multicellularité. Ainsi, des travaux sur des groupes comme des cnidaires, des lophotrochozoaires ou des chordés non-vertébrés ouvrent des perspectives d'études, de réflexions et de discussions cruciales. On remarque également dans la littérature de plus en plus de travaux sur la machinerie apoptotique qui s'écartent d'une vision exclusivement basée sur les vertébrés. Cela prévient les risques de désigner des relations « d'homologies forcées » avec les vertébrés parfois difficiles à argumenter. Les caspases d'insectes ont par exemple été nommées caspases -1 à -7, sans désigner de relation avec celles des mammifères suite à une analyse phylogénétique (Courtiade *et al.*, 2011). De même, des relations d'homologie entre séquences de vertébrés et celles du cnidaire *Acropora millepora* ont été proposées (notamment de la famille Bcl-2), mais les auteurs ont habilement nommé un groupe de caspases spécifique à *Acropora* Caspase-X (Moya *et al.*, 2016).

VI.3. Synthèse sur l'évolution des acteurs apoptotiques

Les études des voies de signalisation de l'apoptose se sont concentrées, jusqu'au début des années 2000, sur les mammifères ainsi que les deux modèles biologiques classiques que sont la drosophile et le nématode. Les descriptions exhaustives effectuées sur ces organismes ont permis un haut degré de compréhension des voies apoptotiques chez ces derniers. Cependant, la vision de l'évolution des acteurs apoptotiques, en particulier des caspases, a été largement biaisée, induisant un consensus que l'on peut malheureusement qualifier de gradiste, et qui présente les non-vertébrés comme possédant des voies de régulation très simples par opposition aux vertébrés (*i.e.* mammifères) au contraire caractérisés par un système de régulation complexe. Grâce aux études fondées sur d'autres groupes de métazoaires (Cnidaria, Mollusca, Echinodermata , etc.), il est de plus en plus reconnu que l'évolution des gènes régulant l'apoptose doit être reconsidérée. Il en découle des interrogations sur l'homologie des voies de signalisation apoptotique.

De plus, les travaux accumulés sur les modèles classiques présentent des différences fondamentales montrant qu'il n'est pas toujours possible de se baser sur le modèle des mammifères d'une part, et que l'idée même de conservation de la voie mitochondriale doit notamment être discutée.

Les problèmes soulevés par l'homologie des voies apoptotiques de signalisation (V.2.c. Synthèse), notamment en raison des relations évolutives mal définies, s'expliquent surtout en raison

de la faiblesse des analyses phylogénétiques présentes dans la littérature. Les homologies établies par similarités de séquences et les analyses phylogénétiques existantes rendent nécessaires une étude approfondie sur l'évolution des caspases à partir d'analyses phylogénétiques afin d'identifier les gènes orthologues. Une discussion sur l'évolution des voies de signalisation apoptotiques sera possible uniquement après ce travail.



Figure 28: Distribution des acquisitions des principaux acteurs apoptotiques sur une phylogénie des métazoaires. Modifiée d'après Zmasek *et al.*, 2013.

PROBLÉMATIQUE

De plus en plus d'études mettent en évidence des rôles non destructifs de l'apoptose, témoignant de capacités particulières, par lesquelles les cellules apoptotiques peuvent induire des signaux moléculaires qui influent sur le comportement des cellules adjacentes. Décrites chez de nombreuses espèces (*i.e. Drosophila, Hydra, Mus, Xenopus*) et promouvant différents comportements et/ou destins cellulaires (*i.e.* prolifération, différenciation, migration, survie), ces capacités ont été nommées de manières différentes selon les auteurs, mais aucun concept global n'a émergé de l'ensemble de ces travaux.

Cependant, ils semblent pouvoir être synthétisés au sein d'une même fonction globale qui paraît être à l'origine de ces différents comportements et/ou destins cellulaires. Nous la nommerons ici la fonction constructrice de l'apoptose (FCA). La FCA parait être une fonction de l'apoptose qui s'additionne à la fonction classiquement décrite de suppression de cellules ou structures surnuméraires, autrement dit, une fonction destructrice (FDA).

De manière intéressante, plusieurs éléments interrogent sur la machinerie moléculaire qui sous-tend ces deux fonctions. Par exemple, il a été largement démontré que la FDA est régulée par la famille multigénique des caspases. De la même manière, des travaux préliminaires concernant la FCA semblent démontrer que ces protéases ont aussi une position centrale dans la régulation de cette dernière. Ainsi l'étude de cette famille multigénique et de son histoire est essentielle à une meilleure compréhension des relations entre FDA et FCA.

En effet, la présence à l'échelle des métazoaires de la FDA, mais aussi l'existence de la FCA qui est observée chez de plus en plus de taxons, impliquent une évolution possiblement liée entre ces deux fonctions. Or, ce sont les caspases qui semblent impliquées de façon commune dans la régulation de ces deux fonctions. Cependant, l'évolution des caspases et des voies de signalisation apoptotiques qu'elles régulent est appréhendée à travers le prisme de modèles biologiques classiques (drosophile, nématode, mammifère), ce qui biaise les inférences évolutives faites à l'échelle des métazoaires. Cela impose de revoir leur évolution, afin de discuter ensuite de l'évolution des fonctions morphogénétiques de l'apoptose à une échelle évolutive large.

Trois questions principales découlent de ce corpus d'idées tentant de synthétiser l'état de l'art sur l'apoptose :

1) La fonction constructrice de l'apoptose est-elle une fonction à part entière ?

2) L'apoptose constructrice est-elle ancestrale ou convergente ?

3) Les fonctions morphogénétiques de l'apoptose dépendent-elle de la même machinerie moléculaire ?

Pour tenter de répondre à ces questions, une vision globale à une large échelle évolutive est nécessaire, ainsi que des études sur plusieurs modèles de métazoaires dans différents contextes morphogénétiques. Afin de commencer à apporter des éléments de réponses et de réflexions, j'ai travaillé, dans le cadre de ma thèse, sur la métamorphose. Ce processus morphogénétique est caractérisé par la concomitance de plusieurs comportements et destins cellulaires, dont fait partie l'apoptose. La métamorphose est donc un cadre idéal pour étudier l'apoptose constructrice. Pour ces études, j'ai utilisé deux modèles de métazoaires distants phylogénétiquement, le cnidaire *Clytia hemisphaerica* (Chapitre I) et le tunicier *Ciona intestinalis* (Chapitre II et III).

J'ai commencé à développer l'étude de **la métamorphose du cnidaire** *Clytia hemisphaerica* au niveau morphologique, cellulaire et moléculaire, pour en faire un modèle d'étude de la FCA dans la mesure où cette dernière, comme la FDA, a souvent été observée dans cet embranchement. De plus, en tant que groupe-frère des bilatériens, les cnidaires ont une position phylogénétique de choix pour explorer l'évolution des fonctions morphogénétiques de l'apoptose.

Pour ce faire j'ai adressé trois questions principales (Chapitre I, page 111) :

- Quels sont les comportements et destins cellulaires présents lors de la métamorphose de la larve planula de *Clytia*?

- Se déroulent-ils de manière concomitante avec de l'apoptose ?

- Y-a-t-il de la FCA au cours de la métamorphose de la larve planula ?

Je me suis aussi intéressé à la métamorphose de **l'ascidie** *Ciona intestinalis* qui présente pendant la régression caudale (un événement de la métamorphose) un profil apoptotique bien caractérisé qui a l'avantage fondamental d'être prédictible spatialement et temporellement. De plus, des résultats préliminaires suggèrent la présence de FCA au cours de ce processus pendant lequel des tissus migrent de manière apoptose-dépendant. Je me suis donc focalisé sur ces comportements cellulaires en adressant les questions suivantes (<u>Chapitre II, page 145)</u> :

- La migration des tissus observée dans un contexte apoptotique est-elle de la FCA ?

- Quelle est la machinerie moléculaire impliquée dans le contrôle de ces migrations ?

Enfin, j'ai conduit des **analyses phylogénétiques** portant sur les gènes impliqués dans la machinerie apoptotique (*i.e.* caspases), couplées à des expérimentations sur *Ciona intestinalis* afin de mieux percevoir l'évolution de la signalisation apoptotique. J'ai notamment essayé de répondre à deux questions (<u>Chapitre III, page 193</u>) :

- Les voies de signalisation apoptotiques sont-elles conservées ?

- La machinerie moléculaire intervenant dans la FCA et la FDA est-elle identique ?

L'ensemble de mes travaux ont permis de montrer la présence d'apoptose au cours de la métamorphose de *Clytia*, de façon concomitante avec de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire.

J'ai également pu montrer que la migration des PGC au cours de la régression caudale de *Ciona* semble se produire par de la FCA.

Enfin, j'ai mis en évidence que les voies de signalisation apoptotiques mitochondriales sont convergentes et non pas conservées à l'échelle des métazoaires.

MODÈLES BIOLOGIQUES

I. L'ASCIDIE CIONA INTESTINALIS (LINNAEUS, 1767)

I.1. Présentation générale

L'ascidie *Ciona intestinalis* est un organisme marin cosmopolite appartenant au groupe des tuniciers (Cionidae Phlebobranchia, Tunicata, Chordata, Deuterostomia, Bilateria, Metazoa). Les termes Tunicata (Lamarck, 1816) et Urochordata (Haeckel, 1874) sont synonymes, impliquant que, usuellement, le terme antérieur (Tunicata) doit primer sur le second.

La cione fut nommée initialement *Ascidia intestinalis* par Carl Von Linné (1767), et ce n'est qu'en 1822 que le genre *Ciona* est utilisé pour la première fois (Fleming, 1822). *Ciona intestinalis* est une ascidie fixée et solitaire (Figure 29) récupérant par filtration de l'eau les algues et particules organiques en suspensions dont elle se nourrit. Hermaphrodite, elle se reproduit de façon sexuée par relargage des gamètes dans le milieu. La fécondation externe puis le développement donne une larve nageante de type « têtard » qui se fixe puis se métamorphose en un individu juvénile (Figure 30). Son cycle de vie est donc caractérisé par l'alternance de deux phases, l'une benthique et l'autre pélagique (Satoh, 1994-2014).

Cette espèce est le premier modèle expérimental en embryologie, étudié depuis la fin du 19^{ème} siècle, notamment au sujet de la recombinaison des blastomères (Chabry, 1887). C'est aussi le premier animal chez qui l'embryogenèse a été bien décrite puisque le lignage cellulaire, de la fécondation à la gastrulation, est clairement caractérisé au début du 20^{ème} siècle (Conklin, 1905).

Ces travaux ont d'ailleurs été à l'origine de l'étude de la différenciation des tissus qui forment la larve (Ortolani *et al.*, 1955).



Figure 29: Anatomie d'un individu adulte Ciona intestinalis.

Ciona intestinalis possède un génome séquencé et annoté depuis 2002 (Dehal *et al.*, 2002 ; Sasakura *et al.*, 2003 ; Chiba *et al.*, 2003), de 159 Megabases (Mb) dont 117 Megabases de séquences non répétées, 18 Mb de séquences répétées de type ARNr ou ARNt, et 17 Mb d'éléments transposables. Le génome, particulièrement riche en AT (65%), comprend environ 16 000 gènes répartis sur 14 chromosomes (Simmen *et al.*, 1998). Les séquences de *Ciona*, comme celles des autres urochordés, montrent une forte divergence avec les autres deutérostomiens, témoignant d'une évolution rapide. Le genre *Ciona* comprend deux espèces cryptiques que sont *Ciona intestinalis* type A et *Ciona intestinalis* type B (Zhan *et al.*, 2010). La comparaison de ces « deux types », au niveau morphologique (Brunetti *et al.*, 2015 ; Pennati *et al.*, 2015), a permis de montrer que *Ciona intestinalis* type A est en réalité l'espèce *Ciona robusta (Hoshino & Nishikawa, 1967* ; Michibata, 1984). La dénomination par les types A et B n'est donc plus maintenue, au profit des noms d'espèces *Ciona intestinalis* (anciennement *Ciona intestinalis* type B) et *Ciona robusta* (anciennement *Ciona intestinalis* type A) (Gissi *et al.*, 2017). Avant cette clarification, une confusion existait dans la littérature, aboutissant à des études dans lesquelles les deux espèces étaient utilisées simultanément. Dans le cadre de cette thèse, il s'agit bien de *Ciona intestinalis* qui est étudiée. En revanche, le génome qui a été séquencé correspond à *Ciona robusta*, et c'est donc sur ce dernier que j'ai dû m'appuyer pour mon travail.

Cependant, la proximité phylogénétique de ces deux espèces (considérées comme espèces-sœurs) fait que cette confusion n'est pas réellement problématique pour la plupart des études. On se doit de garder ce fait à l'esprit et ainsi éviter des interprétations abusives.



Cycle de vie de Ciona intestinalis

Figure 30: Cycle de vie de *Ciona intestinalis* (Tunicata). L'adulte est sessile. La fécondation externe donne une larve nageante de type têtard, qui après fixation au substrat commence une métamorphose donnant un individu juvénile.

I.2. Evolution et position phylogénétique

I.2.a. Histoire et caractéristiques des tuniciers

Les tuniciers (ou urochordés) sont des métazoaires bilatériens appartenant au groupe des deutérostomiens. Ils sont groupe-frère des vertébrés avec qui ils forment le clade des Olfactores (Delsuc *et al.*, 2006). Les tuniciers sont un groupe diversifié comprenant environ 2900 espèces, avec des individus adultes fixés, planctoniques, coloniaux ou encore solitaires (Swalla *et al.*, 2000 ; Shenkar & Swalla, 2011 ; Appeltans *et al.*, 2012 ; Satoh, 2014).

Ils se retrouvent dans le registre fossile, et le premier représentant avéré est *Shankouclava shankpuense* (Chen, 2003) daté de 524 millions d'années (Ma) (Cambrien – Terreneuvien - Étage 2 ; République Populaire de Chine) (Chen *et al.*, 2003). Certains représentants potentiels plus anciens ont été découverts, comme *Yarnemia ascidiformis* (Chistyakov, 1984) daté de 550 Ma (Ediacarien ; Fédération de Russie) (Chistyakov *et al.*, 1984) ou *Burykhia hunti* (Fedonkin, 2012) daté de 555 Ma (Ediacarien ; Fédération de Russie) (Fedonkin *et al.*, 2012).

Les synapomorphies du groupe sont, entre autres, la présence d'une tunique, enveloppe composée de tunicine (polysaccharide proche, et sans doute homologue à la cellulose) entourant l'animal et le protégeant de l'extérieur (Matthysse *et al.*, 2004 ; Satoh, 1994-2014). Celle-ci possède des propriétés antibactériennes et antifongiques, accentuant le rôle de protection physique qu'elle confère à l'animal. Les urochordés possèdent également une notochorde localisée uniquement dans la partie postérieure de l'organisme sous sa forme larvaire (origine du terme Urochordata). De plus, alors que tous les chordés possèdent des somites (formant les muscles branchiomériques de part et d'autres de la chorde), ceux-ci ont été secondairement perdus chez les tuniciers (Lecointre & Le Guyader, 2018). La phylogénie moléculaire atteste également de la monophylie du groupe (Swalla *et al.*, 2000 ; Delsuc *et al.*, 2006 ; 2018).

I.2.b. Phylogénie

La phylogénie des tuniciers est toujours débattue, et plusieurs topologies existent dans la littérature (Tatian *et al.*, 2011 ; Satoh, 2014 ; Delsuc *et al.*, 2018 ; Kocot *et al.*, 2018). De façon générale, les débats sur les relations phylogénétiques des tuniciers ont pour origine la difficulté à retracer l'histoire évolutive des espèces en raison des convergences et variations existantes dans leurs cycles de vie (*i.e.* mode de vie solitaire ou coloniale), des pertes secondaires, et une évolution

très rapide des séquences génomiques induisant des attractions de longues branches dans les analyses phylogénétiques (Satoh, 2014). Les phylogénies moléculaires les plus récentes présentent cinq groupes majeurs (Delsuc *et al.*, 2018; Kocot *et al.*, 2018) avec des discussions sur la monophylie ou la paraphylie d'un groupe en particulier sur lequel je reviendrai, les Phlebobranchia (Figure 31).



Figure 31: Phylogénies moléculaires des tuniciers réalisées par une approche en inférence bayésienne. **A**, Topologie consensuelle issue d'analyses par inférences bayésiennes avec valeurs de bootstrap (RAxML et IQ-TREE) de RCFV_50, RCFV_100, RCFV_200, RCFV_500. **B**, Topologie consensuelle issue d'analyses par inférences bayésiennes avec valeurs de bootstrap (RAxML et IQ-TREE) de LB_50, LB_100, LB_200, LB_500. Les Phlebobranchia sont monophylétiques (A) ou paraphylétiques (B) suivant la topologie. Modifiée d'après Kocot *et al.*, 2018.

La majorité des travaux récents sur la phylogénie des tuniciers montrent que les appendiculaires sont la première branche se séparant du reste du groupe (Delsuc *et al.*, 2008 - 2018 ; Kocot *et al.*, 2018). Il s'agit d'organismes pélagiques nageant dont le stade adulte prédominant est une forme de têtard. Le représentant le mieux connu de ce groupe est *Oikopleura dioika* (Fol, 1972). Les quatre autres groupes (Phlebobranchia – Aplousobranchia – Thaliacea – Stolodibranchia) forment un clade monophylétique (Figure 31).

Les Stolidobranchia possèdent une paire de gonade, et l'atrium se développe à partir d'une invagination unique. Ce groupe contient des espèces fixées coloniales tel que *Botryllus schlosseri* (Pallas, 1766), ou solitaire comme *Molgula oculata* (Forbes, 1848) (Satoh, 1994-2014).

Les Phlebobranchia, les Thaliacea et les Aplousobranchia forment un clade monophylétique, groupe-frère des Stolidobranchia (Figure 31). Les Thaliacea sont planctoniques et coloniaux. Ils ont totalement perdu la queue et la chorde au stade larvaire (Satoh, 1994-2014). Les Phlebobranchia et les Aplousobranchia (parfois regroupés dans les Enterogona – groupe dont la monophylie est débattue) ont un nombre impair de gonades associées au tube digestif. De plus, l'atrium se développe à partir de deux invaginations. Les espèces du genre *Ciona* sont des Phlebobranchia est, en fonction des analyses moléculaires, présenté comme monophylétique ou paraphylétique. Les Aplousobranchia en sont les plus proches parents.

I.3. Anatomie et cycle de vie de Ciona intestinalis

I.3.a. Anatomie de l'adulte

La cione adulte est fixée et présente, en position distale par rapport au point de fixation, des siphons possédant des organes sensoriels distribués autour de leur ouverture (Figure 29). Le siphon inhalant permet l'entrée d'eau dans un pharynx branchial hyper-développé. Surdimensionné, il permet la filtration de l'eau par les fentes branchiales et produit un mucus récupérant les particules alimentaires qui seront ensuite orientées vers l'œsophage. Les déchets sont ensuite éliminés via le siphon exhalant (Figure 29) (Satoh, 1994-2014). Entre ces deux siphons se trouve le ganglion nerveux à partir duquel l'innervation se fait en direction des autres organes de l'animal. Proche de l'estomac, situé à la base du pharynx en position proximale par rapport au point de fixation se trouve le cœur (entouré d'un péricarde), base du système circulatoire (Satoh, 1994-2014). La circulation, qui a la particularité de pourvoir s'inverser, se fait au travers des quelques vaisseaux

existant. La gonade, proche du cœur et de l'estomac, produit les deux types de gamètes mâles et femelles, qui s'accumulent une fois matures dans le spermiducte et l'oviducte respectivement. Ces deux gonoductes sont indépendants, parallèles et suivent le tube digestif jusqu'au siphon exhalant à partir duquel les gamètes sont relargués dans le milieu externe (Satoh, 1994-2014). Tous les individus sont hermaphrodites, mais relativement auto-stériles, c'est à dire que la fécondation est bloquée en raison de la reconnaissance entre spermatozoïdes et cellules folliculaires des ovocytes du même individu. Cependant, de l'auto-fécondation a été observée dans des cas particuliers, tels qu'une baisse dramatique de la population (Rosati & De Santis, 1978). La fécondation en pleine eau donne, après embryogenèse, une larve nageante nommée « têtard ».

I.3.b. Embryogenèse et anatomie de la larve

L'embryogenèse a été divisée en périodes, avec une échelle temporelle correspondant à la succession des stades de développement à une température de 18°C (Hotta *et al.*, 2007). Cette table de développement permet une harmonisation des termes et procédures dans la littérature.

Le période zygote correspond à la première heure post-fécondation (hpf), puis survient la période de clivage depuis la première division jusqu'au stade 76 cellules (4.5 hpf). La période suivante correspond à la gastrulation (4.5-6.3 hpf) suivie de la neurulation (6.3-8.5 hpf). Après la neurulation et jusqu'à l'éclosion, on observe la période têtard qui est divisée en quatre stades (de 8.5 à 17.5 hpf) (Hotta *et al.*, 2007). Le premier stade de cette période gastrula. Le stade ETB (*Erly TailBud*) voit un allongement de la queue, qui forme un angle d'environ 40° avec le tronc. Au stade MTB (*Mild TailBud*) la queue mesure plus de la moitié de la longueur totale de la larve. Le stade suivant LTB (*Late TailBud*) a une forme de têtard caractéristique, et la pigmentation des organes sensoriels otolithe et ocelle s'initie. S'en suit l'éclosion (17.5/18 hpf), et la période dite larve nageante (Hotta *et al.*, 2007). Les termes ITB, ETB, MTB et LTB seront utilisés dans la suite de ce manuscrit.

La larve, composée d'environ 2600 cellules, présente un « plan d'organisation » de chordé et est divisée en deux parties, qui sont le tronc (dans la partie antérieure), et la queue (dans la partie postérieure) (Figure 32) (Satoh, 1994 ; 2014). Le tube neural, en position dorsale, couvre toute la longueur de la larve, depuis les papilles adhésives de l'extrémité antérieure, jusqu'au bout de la queue en partie postérieure. A la frontière du tronc et de la queue est localisé un ganglion viscéral. La notochorde, qui n'est présente que dans la queue, est ventrale par rapport au système nerveux (Figure 32). Elle sert de structure de soutien aux muscles de la queue permettant le mouvement de nage, faisant de la queue de la larve une véritable nageoire caudale. En partie ventrale, se trouve une

tige endodermique (prolongement caudale de l'endoderme du tronc), et postérieurement à celle-ci sont localisées les huit cellules germinales primordiales (PGC – *Primordial Germ Cells*) à l'extrémité de la queue. Dans le tronc se trouve une large partie de l'endoderme, ainsi que l'otolithe et l'ocelle, organes sensoriels de la larve (Figure 32). Après une phase de nage, la fixation est le point de départ d'une métamorphose voyant des changements majeurs dans l'organisation de l'individu.



Figure 32: Anatomie de la larve nageant de *Ciona intestinalis*. Le « plan d'organisation » typique des chordés est reconnaissable, avec un système nerveux dorsal et la présence d'une notochorde. Les muscles permettent la nage de la larve. Modifiée d'après Karaiskou *et al.*, 2015.



Figure 33: Images d'une séquence temporelle représentant l'évolution de la métamorphose de *Ciona intestinalis*. La régression caudale (**A-B-C**) est considérée comme l'événement majeur du processus. Après cette régression la métamorphose se poursuit et donne un juvénile capable de se nourrir (**D**). Modifiée d'après Sasakura *et al.*, 2012.

I.4. La métamorphose

I.4.a. Les principales étapes de la métamorphose

Les changements majeurs observés au cours de la métamorphose ont conduit à une séparation des tissus de l'animal en trois groupes (Cloney, 1982). Premièrement, les tissus qui sont uniquement larvaires, donc transitoires dans le cycle de vie de l'animal, tels que la notochorde ou les muscles de la queue. Deuxièmement, les tissus qui se retrouvent chez la larve et l'adulte, comme le système nerveux central (Horie *et al.*, 2011), ou encore les cellules germinales primordiales (PGC) (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006) et l'endoderme caudal (Nakazawa *et al.*, 2013). Troisièmement, les organes présents chez l'adulte uniquement, comme le pharynx ou l'endostyle (Cloney, 1982 ; Satoh, 1994 ; Karaiskou *et al.*, 2015).

La métamorphose de la larve d'ascidie a été divisée en une succession de 10 étapes correspondant à des événements cellulaires, qui se retrouvent globalement entre les espèces malgré des variations possibles (Cloney, 1978 ; Davidson *et al.*, 2003 ; Karaiskou *et al.*, 2015). Le point de départ est (1) la fixation de la larve sur un substrat grâce à ses papilles adhésives, secrétant une protéine spécialement dédiée à cette fixation. Ensuite se produit (2) la rétractation des papilles, puis (3) la nageoire caudale cesse de bouger et commence la régression caudale avec une contraction (Figure 33) suivie d'apoptose (Cloney, 1973 ; 1982 ; Jeffery, 2002 ; Chambon *et al.*, 2002 ; Krasovec *et al.*, soumis). Cette régression caudale est elle-même divisée en une succession d'événements moléculaires et cellulaires que je décrirai plus loin (Figure 34). Ensuite, (4) la perte de la couche externe de la tunique larvaire est observée, suivie (5) d'une rétractation de la vésicule sensorielle puis de (6) la phagocytose du ganglion viscéral. Les événements suivant sont (7) la migration des « *pigmented cells »*, (8) la rotation de l'axe de l'animal de façon concomitante avec le développement et l'élongation du pharynx. Pour terminer, (9) l'expansion des ampoules s'observe ainsi que le développement important de la tunique et (10) la mise en place du tube digestif et des organes spécifiques de l'adulte tel que l'endostyle.

I.4.b. Le déroulement de la régression caudale

Lors de la phase de nage, il a été observé que la larve change de comportement en fonction de la luminosité et cherche préférentiellement à se fixer sur un substrat non exposé à la lumière (Cloney, 1982 ; Matsunobu & Sasakura, 2015). Il a été montré que les larves sont également sensibles au recouvrement bactérien présent sur le substrat qui facilite la fixation (Davidson &

Swalla, 2002). L'adhésion définitive de la larve représente le début de la métamorphose. Il semblerait que la fixation nécessite, chez *Herdmania curvata* (Kott, 1952), la production de molécules de la famille EGF par les cellules de la papille adhésive, notamment Hemps (Figure 34, événement 1a) (Degnann *et al.*, 1997). Après la fixation de la larve, il a été montré chez *Ciona intestinalis* que la voie ERK kinase est activée au niveau des papilles (Chambon *et al.*, 2007) et qu'elle contrôle indirectement l'initiation de l'apoptose qui se produit bien plus tard (mise en évidence par une approche d'inhibition de la voie ERK). L'expression de la Thrombospondine a été montrée, après activation de ERK, chez les espèces *Ciona intestinalis* et *Boltenia villosa* (Stimpson, 1864), au niveau des papilles et du tronc (Figure 34, événement 1c). De façon intéressante, l'expression de Thrombospondine est localisée dans la région dorsale entre le tronc et la queue, où la voie JNK s'active (Nakayama *et al.*, 2001 ; Chambon *et al.*, 2007). Une approche par inhibition de la voie est indispensable dans l'initiation de la vague apoptotique (Chambon *et al.*, 2007). L'activation de JNK permet en effet une seconde activation de ERK qui se produit cette fois-ci à l'extrémité postérieure de la nageoire caudale (Figure 34, événement 3a).

JNK contrôle également le gène Ci-*sushi*, exprimé sur quasiment toute la longueur de la queue, qui code une protéine impliquée dans la communication cellulaire. Il a été montré par une approche de perte de fonction que ce gène est impliqué dans l'initiation de l'apoptose à l'extrémité postérieure de la queue (Chambon *et al.*, 2007). Il s'en suit une activation des caspases, conduisant à l'apoptose. L'activation des caspases à l'extrémité postérieure de la queue est responsable de la vague apoptotique polarisée suivant l'axe antéro-postérieur (A-P) (Jeffery, 2002 ; Chambon *et al.*, 2002).

La présence d'apoptose au cours de la régression caudale a été mise en évidence par marquage TUNEL chez plusieurs espèces d'ascidies comme chez *Ascidia ceratodes* (Huntsman, 1912) ou *Molgula occidentalis* (Traustedt, 1883) (Jefferey, 2002) ainsi que chez *Ciona intestinalis* (Figure 35.1) (Chambon *et al.*, 2002). Une approche par microscopie électronique a permis d'identifier les caractères morphologiques de l'apoptose chez *Ciona intestinalis*, tels que la présence de corps apoptotiques (Figure 35.2) (Chambon *et al.*, 2002). Celle-ci est initiée dans l'extrémité postérieure de la queue au niveau de l'épiderme de la larve, puis se propage jusqu'au tronc selon une vague polarisée suivant l'axe A-P (Chambon *et al.*, 2002). Ces événements sont donc prédictibles et organisés dans l'espace et le temps, ce qui en fait un cadre idéal pour étudier l'apoptose.



Figure 34: Synopsis des différents événements moléculaires et cellulaires successifs au début de la métamorphose chez les ascidies solitaires. Modifiée d'après Karaiskou *et al.*, 2015.

I.5. Un modèle idéal pour étudier l'apoptose in vivo

Au cours de la régression caudale, **tous les tissus sont affectés par l'apoptose, exceptés deux d'entre eux** qui survivent grâce à une migration de la queue vers le tronc, **l'endoderme caudal** (Kawai *et al.,* 2015) et les **cellules germinales primordiales** (Shirae-Kurabayashi *et al.,* 2006 ; Krasovec *et al.,* soumis). La migration de ces tissus est fondamentale car ils participent à la formation de tissus adultes: l'endoderme participe à la formation du tube digestif (Kawai *et al.,* 2015), et les PGC rejoignent les futures gonades, lieu de leur différenciation finale en gamètes (Figure 36).

Il a également été montré que l'exposition des larves à l'inhibiteur des caspases Z-VAD-Fmk bloque la vague d'apoptose, mais de façon intéressante inhibe également le déplacement des PGC, suggérant que celui-ci dépend de l'activité des caspases.

La cione est un modèle de choix pour étudier l'apoptose car elle est le seul chordé (et le second métazoaire, avec le nématode) ayant une apoptose prédictible dans le temps et l'espace. De plus, simultanément à cette vague apoptotique polarisée, moteur de la régression caudale, la migration de deux tissus (l'endoderme et les PGCs) composant la nageoire caudale est observée. La présence d'apoptose et de migration de deux tissus dans le même contexte spatio-temporel au sein d'une même structure est un cadre biologique idéal pour explorer la fonction constructive de l'apoptose.



Figure 35: Apoptose au cours de la régression caudale. (1), Séquence temporelles (de **A** vers **C**) de marquage TUNEL (vert) marquant les cellules en apoptose au cours de la régression caudale de *Ciona intestinalis*. L'apoptose commence dans l'épiderme postérieur de la queue (**A**), se propage (**B**) pour atteindre le tronc (**C**). (2) Corps apoptotiques de cellules musculaires vus au microscope électronique. ab, *apoptotic bodies*; cc, *condensed chromatin*; lv, *large vacuole*; nf, *nuclear fragment*. Barre d'échelle, (**1**) 220 μ m (**A**) – 140 μ m (**B**) – 80 μ m (**C**); (**2**) 1.6 μ m. Modifiée d'après Chambon *et al.*, 2002.



Figure 36: Séquences d'images temporelles (de **A** vers **E**) de marquage anti-VASA (vert) marquant les 8 cellules germinales primordiales (**B**) au cours de la régression caudale de *Ciona robusta*. Localisées ventralement dans la partie postérieure de la queue (**A-C**), les PGC se déplacent au fur et à mesure que la régression caudale progresse (**D**), et se retrouvent dans le tronc en fin de régression (**E**). Modifiée d'après Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006.

II. LE CNIDAIRE CLYTIA HEMISPHAERICA (LINNAEUS, 1767)

I.1. Présentation générale

Clytia hemisphaerica (Linnaeus, 1767) est un organisme marin appartenant au groupe des cnidaires (Campanulariidae, Leptothecata, Hydroidolina, Hydrozoa, Medusozoa, Cnidaria, Metazoa), clade de métazoaires diversifié comprenant plus de 10 000 espèces, majoritairement marines, avec quelques représentants en eau douce tels que les espèces du genre *Hydra* (Lecointre & Le Guyader, 2018).

II.2. Evolution et position phylogénétique

II.2.a. Histoire et caractéristiques des cnidaires

Les cnidaires sont des métazoaires qui forment, avec les bilatériens, le groupe des eumétazoaires caractérisé entre autres par la présence de synapses au niveau des cellules nerveuses, la mise en place de feuillets embryonnaires après la gastrulation (ectoderme et endoderme) ou encore l'acquisition d'une cavité digestive différenciée. La position phylogénétique du clade des cténophores (ou cténaires) à l'intérieur ou non de ce groupe est largement discutée.

Le registre fossile des cnidaires présente de nombreux fossiles qu'il est difficile d'interpréter. En effet, la forme méduse, souvent plate et circulaire après fossilisation, ne fournit que peu d'information anatomique et peut être confondue avec d'autres organismes. Un certain nombre d'entres-eux, les plus anciens notamment (gisements édiacariens), sont qualifiés de « médusozoïdes » puisqu'une identification plus poussée n'est pas envisageable. Deux espèces semblant être des médusozoaires ont été découvertes et datées d'environ 600 Ma (Ediacarien ; Australie), *Beltanella gilesi* (Billings, 1872) et *Conomedusites lobatus* (Glaessner & Wade, 1966). Les polypes présentant une structure minéralisée se fossilisent plus facilement et les coupes effectuées au sein de ces derniers fournissent davantage d'informations anatomiques autorisant une identification plus rigoureuse. Ainsi, le premier anthozoaire avéré est *Mackenzia costalis* (Briggs, 1994) daté de 530 Ma (Cambrien – Terreneuvien - Étage Fortunien ; Canada) (Briggs *et al.*, 1994). Les hydrozoaires, auxquels appartient *Clytia hemisphaerica*, sont documentés par l'espèce *Silurovelella casteria* (Fischer, 1957) comme première occurrence, datée de 422 Ma (Silurien - Pridoli - Étage Pridolien ; États-Unis).

Les cnidaires sont définis par plusieurs synapomorphies soutenant la monophylie du clade, qui est également appuyée par les phylogénies moléculaires. On peut citer, par exemple, la présence de cellules neuro-sensorielles urticantes, appelées les nématocytes, ou cnidocytes (le mot cnidaire a pour origine le terme grec désignant les orties). Ces cellules sont constamment régénérées par l'organisme et participent aussi bien à la défense qu'à la capture des proies. Les cnidaires possèdent également une mésoglée, matrice extra-cellulaire principalement constituée de glycoprotéines séparant les deux feuillets embryonnaires que sont l'ectoderme et l'endoderme. Les cnidaires ne présentent pas de mésoderme qui est une synapomorphie des bilatériens. La forme polype est commune à tous les groupes de cnidaires. Il s'agit d'une colonne cylindrique fixée au substrat portant à son extrémité un ensemble de tentacules entourant la bouche de l'animal. Enfin, la larve typique des cnidaires, issue de la reproduction sexuée, la planula, est nageante et ciliée, et composée d'un endoderme séparé de l'ectoderme par la mésoglée.

II.2.b. Phylogénie

Les cnidaires peuvent être divisés en deux groupes majeurs, les anthozoaires et les médusozoaires (Figure 37). Chez les anthozoaires, le stade méduse n'est pas présent et seule la forme polype (benthique) existe. Ce sont les polypes qui portent les gonades et, par relargage des gamètes dans le milieu marin, permettent la reproduction sexuée. Les anthozoaires comprennent notamment les anémones de mer et les coraux.

Chez les médusozoaires, caractérisés par l'acquisition de la forme méduse, le cycle de vie est divisé en deux phases. La phase polype (la seule présente chez les anthozoaires) représente la phase dite sessile. L'animal vit fixé sur un substrat, et peut se présenter sous la forme d'un polype solitaire ou bien former une colonie. Les polypes des médusozoaires ont la même organisation que chez les anthozoaires et sont constitués d'un pied au bout duquel se trouve l'unique orifice du tube digestif, la bouche. Chez les médusozoaires, les polypes produisent de façon asexuée les méduses, phase pélagique du cycle de vie. Les méduses possèdent des gonades et se reproduisent de façon sexuée par relargage des gamètes dans le milieu externe. Les médusozoaires comprennent quatre groupes, les stauroméduses, les cuboméduses, les schyphozoaires et les hydrozoaires (Collins *et al.*, 2006).

Clytia hemisphaerica est un médusozoaire hydrozoaire, groupe représenté par environ 3500 espèces (Bouillon *et al.*, 2006). Les hydrozoaires ont, entre autres synapomorphies, perdus les nématocytes de l'épithélium endodermique, acquis une production de méduses au niveau des polypes par bourgeonnement latéral à partir d'un groupement de cellules ectodermiques

(l'entocodon), ou bien encore, acquis la présence d'un velum, membrane ectodermique délimitant la cavité sous-ombrellaire de la méduse. Au sein des hydrozoaires, *Clytia hemisphaerica* est un Leptothecata en raison de la présence d'une thèque autour du polype, synapomorphie du groupe (Collins *et al.*, 2006). La thèque est une enveloppe protectrice entourant le polype et constituée d'un dérivé de la chitine.



Figure 37: Phylogénie moléculaire basée sur des séquences d'ADN ribosomaux, avec optimisation par parcimonie des caractères morpho-anatomiques sur la topologie. *Clytia hemisphaerica* est un médusozoaire hydrozoaire. Modifiée d'après Collins *et al.*, 2006.

II.3. Cycle de vie et anatomie

II.3.a. Cycle de vie

Clytia hemisphaerica (cnidaire médusozoaire) présente un cycle de vie composé des deux phases: une méduse pélagique, issue de reproduction asexuée, et une forme sessile, dite polype, issue de reproduction sexuée (Figure 38).

Chez *Clytia hemisphaerica*, la forme sessile est constituée d'un ensemble de polypes formant une colonie. Deux types de polypes sont présents au sein de la colonie, les polypes nourriciers, ou gastrozoïdes, et les polypes reproducteurs, ou gonozoïdes (Houliston *et al.*, 2010).

L'hydraucaule des gastrozoïdes et des gonozoïdes est l'élément « tubulaire » reliant les différents polypes de la colonie. Sa paroi est constituée d'ectoderme et d'endoderme séparés par une très fine couche de mésoglée, et possède en son centre un tube gastrique (ou cavité gastro-vasculaire) permettant le transport, dans toute la colonie, des éléments nutritifs issus de la prise alimentaire. À l'extrémité des gastrozoïdes s'ouvre une bouche (au centre de l'hypostome) entourée de tentacules. Les gonozoïdes sont, quant à eux, dépourvus de bouche mais produisent des méduses par bourgeonnements latéraux. La production de méduses, plus ou moins continue durant la vie d'un gonozoïde, est donc une forme de reproduction asexuée. En revanche, les méduses présentent des sexes séparés : une méduse produisant des gamètes soit mâles soit femelles. Le déterminisme du sexe est lié à la température. A maturité sexuelle (environ deux mois à 18°C), les gamètes sont relargués dans le milieu. La production et la libération des gamètes sont provoquées par une exposition à la lumière. La fécondation puis l'embryogenèse aboutissent à une larve nageante ciliée nommée planula. Après métamorphose de la larve, on obtient un polype primaire capable de se nourrir, qui sera à l'origine d'une nouvelle colonie (Houliston *et al.*, 2010).

Cycle de vie de Clytia hemisphaerica



Figure 38: Cycle de vie de *Clytia hemisphaerica*. La forme sessile, le polype, produit de façon asexué des méduses mâle ou femelle. Les méduses représentent la phase pélagique et se reproduisent de façon sexuée. La fécondation externe produit une larve nageante ciliée, la planula. La planula se fixe au substrat et se métamorphose en polype dit « primaire », point de départ de la colonie.

La forme méduse de *Clytia* est classiquement composée d'une ombrelle, qui s'organise en une partie sous-ombrellaire ectodermique et une partie ex-ombrellaire composée d'ectoderme (Figure 39). Au centre de l'ombrelle, en position orale, émerge une longue « tige » ou manubrium à l'extrémité duquel se trouve la bouche, entourée de quatre lèvres perradiaires. La cavité sous-ombrellaire est partiellement fermée par le velum (synapomorphie des hydrozoaires) (Collins *et al.*, 2006 ; Houliston *et al.*, 2010).

Les tentacules, nombreux mais en nombre pair, sont distribués autour de l'ombrelle, en alternance avec les statocytes, structures sensorielles nécessaires à l'équilibration. La marge de l'ombrelle est composée de deux anneaux nerveux (synapomorphie des hydrozoaires) et d'un canal circulaire (Figure 39). Quatre canaux radiaires (synapomorphie des hydrozoaires) font la jonction entre l'estomac (à la base du manubrium) et le canal circulaire, avec au centre de chaque canal radiaire et sur son trajet, une gonade (Figure 39) (Collins *et al.*, 2006 ; Houliston *et al.*, 2010).



Figure 39: Anatomie d'une méduse de Clytia hemisphaerica. Modifiée d'après Houliston et al., 2010.

II.4. Embryogenèse et métamorphose

Les premières études sur le développement ont été réalisées par Bodo & Bouillon (1968). La première division de l'œuf s'observe environ une heure après fécondation. Suite au développement, semblable à celui décrit chez d'autres hydrozoaires comme *Clytia gregarium* (Agassiz, 1862) (Figure 40), on obtient une blastula ciliée, puis une gastrula composée des deux feuillets embryonnaires, endoderme et ectoderme, avec une cavité centrale, le blastocoele (Byrum, 2001 ; Brusca & Brusca, 2003). Durant la gastrulation, un mécanisme d'ingression au pôle oral conduit la migration des cellules de l'épithélium vers le blastocoele, remplissant ainsi la cavité. Après l'embryogenèse (24h à 18°C) on obtient une larve ciliée planula composée d'un endoderme séparé par la mésoglée de l'ectoderme portant les cils qui assurent la locomotion.

Trois jours post-fécondation (72hpf), la larve commence une métamorphose caractérisée par la fixation au substrat, un aplatissement formant le stade « galette » (*pedal disc*) puis la formation d'un polype primaire capable de se nourrir, point de départ d'une nouvelle colonie (Figure 41) (Freeman, 1981). Chez *Clytia hemisphaerica*, la métamorphose présente cette même séquence d'événements, sans que leur description n'ait été réalisé de façon exhaustive (Figure 42) (Houliston *et al.*, 2010).



Figure 40: Développement embryonnaire de l'hydrozoaire *Clytia gregarium*. La gastrulation implique un mécanisme d'ingression unipolaire avec modification et migration des cellules de l'épithélium du pôle oral vers le centre de l'embryon, comblant ainsi la cavité blastocoelienne. Modifiée d'après Byrum, 2001.


Figure 41: Diagramme de la succession des stades de l'embryogenèse (a-f), de la planula (g), de la métamorphose (h-j) et du polype (k) de *Clytia gregarium*. Toutes les figures sont orientées avec le pôle postérieur en haut. a, première division. Le site d'initiation du clivage deviendra le pôle postérieur de la planula. b, Stade 8 cellules. c, Stade blastula. Le blastocoele apparaît à partir de 16 cellules. d, Stade gastrula. Les cellules du pôle postérieur commencent à s'allonger et à migrer dans le blastocoele. L'ectoderme de l'embryon devient cilié. e, Stade mi-gastrula. La moitié postérieure du blastocoele est comblée. f, Stade post-gastrula. Le blastocoele est rempli de cellules endodermiques. g, larve planula. Endoderme et ectoderme sont séparés par la mésoglée. Les cellules glandulaires ectodermiques, de forme allongée, sont présentent au pôle antérieur. h, planula fixée au substrat. i, Galette (*pedal disc*) formée par l'aplatissement de la planula. j, croissance du stolon du polype primaire. k, Polype formé avec ses tentacules. La croissance du stolon sur le substrat initie la formation de la colonie. Bl, blastocoele ; Ect, ectoderme ; End, endoderme ; Sta, tige (*stalk*) ; Hy, hydranthe ; AGC, cellules glandulaires (*Adhesive gland cells*). Modifiée d'après Freeman *et al.*, 1981.

Polarité de la larve :

Il convient ici de présenter la façon dont les pôles de la larve ciliée planula sont nommés afin d'éviter toute confusion par la suite. La larve planula possède un axe définit en fonction du sens de nage, où le pôle antérieur se trouve du côté de la direction de nage, et le pôle postérieur à l'opposé. Au moment de la métamorphose, le pôle antérieur est celui par lequel la planula va se fixer en premier lieu au substrat, sur lequel se développera le pied du futur polype primaire. A l'opposé de ce pied va s'ouvrir la future bouche du polype. Ainsi, le pôle antérieur de la planula constitue le futur pôle aboral du polype (ou pied) et le pôle postérieur de la planula, opposé au point de fixation du polype, constitue le pôle oral où va s'ouvrir la bouche (Figure 42).

ORAL



Figure 42: Evolution de la métamorphose de la larve planula de *Clytia hemisphaerica*. Après fixation de la planula nageante (A), la larve s'aplatit en galette (B), puis le stolon croît et les tentacules se développent (C). Modifiée d'après Houliston *et al.*, 2010.

Plusieurs comportements et destins cellulaires ont été mis en évidence au cours de la métamorphose de la planula chez différentes espèces de cnidaires, tels de l'apoptose chez *Aurelia aurita* (Yuan *et al.*, 2001), de la prolifération chez *Hydractinia echinata* (Plickert *et al.*, 1988) ou encore de la migration chez *Pennaria tiarella* (Martin & Archer, 1986).

La présence potentielle dans un même contexte biologique et spatio-temporel de ces différents comportements et destins cellulaires fait des cnidaires des modèles expérimentaux attrayant pour étudier les rôles morphogénétiques de l'apoptose, et notamment la FCA déjà mise en évidence chez l'hydre (Chera *et al.*, 2009).

Je détaillerai et présenterai les travaux sur la métamorphose de la planula de *Clytia hemisphaerica* en première partie du Chapitre I de cette thèse, afin d'illustrer l'intérêt du choix de cet organisme modèle.

Un premier travail nécessaire et fondamental a été une description exhaustive de la métamorphose de cet animal, première étape indispensable permettant d'étayer les rôles de l'apoptose au cours de son développement.

CHAPITRE I

La métamorphose de Clytia hemisphaerica

I. LES CNIDAIRES, UN MODÈLE À EXPLORER POUR ÉTUDIER LA FCA

L'apoptose a été mise en évidence ou est suggérée chez de nombreuses espèces de cnidaires représentant les principaux groupes tels les anthozoaires *Haliplanella lineata* (Verrill, 1869) (Mire & Venable, 1999) ou encore *Anemonia viridis* (Forsskål, 1775) (Richier *et al.*, 2006), les hydrozoaires *Hydra vulgaris* (Cikala *et al.*, 1999 ; Böttger & Alexandrova, 2007), *Hydra oligactis* (Pallas, 1766) (Kuznetsov *et al.*, 2002) ainsi que *Hydractinia echinata* (Fleming, 1828) (Seipp *et al.*, 2001) mais aussi le scyphozoaire *Aurelia aurita* (Yuan *et al.*, 2008). Les recherches effectuées sur les cnidaires à partir des génomes et des transcriptomes disponibles montrent que ce groupe possède les acteurs fondamentaux classiquement impliqués dans les voies de signalisation apoptotique, notamment les caspases et les gènes de la famille *Bcl*-2 (Dunn *et al.*, 2006 ; Lasi *et al.*, 2010 ; Zmasek *et al.*, 2013 ; Moya *et al.*, 2016).

Plusieurs travaux montrent que les cnidaires comptent parmi les groupes de métazoaires chez qui la fonction constructrice de l'apoptose (FCA) a été mise en évidence (Chera *et al.*, 2009 ; Wittig et al. 2011). La FCA a été montrée notamment au cours de la régénération de l'hydre, processus au cours duquel les cellules en apoptose induisent une prolifération après ablation de la tête du polype (Chera *et al.*, 2009) (*cf.* Introduction page 46). Plus classiquement, il a été observé chez *Hydractinia echinata* l'élimination par apoptose de cellules larvaires neuro-sensorielles au cours de la métamorphose de la larve planula (Seipp *et al.*, 2001, 2006).

Durant la métamorphose des cnidaires, plusieurs autres comportements cellulaires ont été observés,

comme de la prolifération, de la migration ou un maintien et une mobilisation des cellules souches (Martin *et al.*, 1983 ; Martin & Archer, 1988 ; Seipp *et al.*, 2001).

Après avoir abordé l'état des connaissances sur la machinerie apoptotique chez les cnidaires, je vais présenter certains organismes appartenant à ce groupe et considérer comme des « modèles biologiques » afin d'illustrer les connaissances sur les différents comportements cellulaires (apoptose – prolifération – migration) qui interviennent au cours de la métamorphose de la larve ciliée « planula », ce qui permettra d'introduire le premier article en préparation de mon travail de thèse, focalisé sur la métamorphose de la larve de *Clytia hemisphaerica*.

I.1. L'apoptose chez les cnidaires

I.1.a. Les acteurs apoptotiques des cnidaires

La machinerie apoptotique des cnidaires comporte des gènes appartenant aux familles multigéniques intervenant classiquement dans la signalisation apoptotique chez les modèles classiques tels que les vertébrés (Ikala *et al.*, 1999 ; Dunn *et al.*, 2006 ; Zmasek *et al.*, 2007, 2013 ; Lasi *et al.*, 2010 ; Moya *et al.*, 2016). Les membres de ces familles de gènes ont été identifiés la plupart du temps par similarité de séquences sur la base de comparaison avec des gènes de vertébrés. Ces analyses ont permis d'identifier les domaines caractéristiques des acteurs de la machinerie apoptotique (par exemple les domaines DED, CARD, P20 et P10 pour les caspases, ou encore les domaines BH pour les Bcl-2) et ainsi de faire des prédictions d' « homologie ».

Parmi ces acteurs, quinze caspases ont été caractérisées chez le modèle *Hydra vulgaris* (Hydrozoa), dont cinq qui semblent être initiatrices en raison de la présence d'un long pro-domaine (Lasi *et al.,* 2010a, 2010b). Les travaux sur l'hydre ont également permis d'identifier des protéines activatrices par similarité de séquence, comme Hy-Fadd ou encore Hy-Apaf-1 (Lasi *et al.,* 2010).

Le génome de *Nematostella vectensis* (Anthozoa) comprend *a priori* onze caspases et quatre protéines activatrices potentielles possédant des domaines DED ou CARD (*i.e. apaf-1*) (Zmasek *et al.*, 2007 ; Zmasek & Godzik, 2013).

Des études sur des espèces moins classiques ont confirmé la présence de plusieurs membres au sein de la famille multigénique des caspases et de celle des gènes *Bcl*-2. Chez l'anthozoaire *Acropora mellipora* (Ehrenberg, 1834) notamment, quatorze caspases ont été mises en évidence, et onze membres de la famille *Bcl-2* (Moya *et al.*, 2016). Une analyse phylogénétique réalisée par inférence bayésienne (MrBayes – modèle LG) à partir des séquences protéiques des gènes de la famille Bcl-2

de vertébrés et de cnidaires a permis de proposer des relations d'orthologies entre les gènes de vertébrés et ceux du corail *Acropora*. Plusieurs gènes *Bcl-2* d'*Acropora* ont été renommés en fonction des résultats de la topologie, tels que Am-*bak* ou encore Am-*box* (Moya *et al.*, 2016).

En revanche, une approche similaire par analyse phylogénétique effectuée avec les séquences de caspases n'a pas permis aux auteurs d'identifier et renommer les caspases d'*Acropora*. Les gènes ont été nommés par des lettres (*i.e.* AmCaspase A) sans se baser sur les vertébrés, et un clade spécifique aux cnidaires a été identifié (Caspases-X). Cette approche fut pertinente pour éviter des dénominations fausses et montre également qu'une nomenclature des caspases basée uniquement sur celle des vertébrés n'est pas toujours adaptée. La même approche a été utilisée chez *Hydra vulgaris*, chez qui les caspases sont nommées Hy-caspase -A à -M.

Malgré ces approches prudentes, certaines caspases de cnidaires sont proposées comme orthologues de la caspase 3 des vertébrés en raison de leur similarité de séquence, et de la présence d'un prodomaine court. C'est le cas de He-caspase 3 chez *Hydractinia echinata* (Seipp *et al.,* 2006) par exemple.

Les travaux effectués sur les cnidaires montrent qu'il existe des caspases possédant des pro-domaines CARD ou DED (potentiellement initiatrices), des caspases présentant un prodomaine court (potentiellement exécutrices), ainsi que des membres de la famille *Bcl* -2 proou anti-apoptotiques. Chez les espèces de cnidaires étudiées, le nombre de gènes composant ces familles est élevé et similaire à ce qui est connu chez les mammifères (*i.e.* 15 caspases chez l'hydre, 13 caspases chez l'homme) et en opposition au nombre chez les ecdysozoaires (*i.e.* 4 caspases chez le nématode) (Kumar, 2007 ; Lasi *et al.*, 2010 ; Shalini *et al.*, 2015). De plus, nous avons pu mettre en évidence par analyse phylogénétique (phylogénie des protéines Bcl-2 (*cf.* Chapitre III page 216) qu'il existe des gènes orthologues entre vertébrés et cnidaires pour la famille *Bcl-2.* L'ensemble de ces acteurs mis en évidence chez les cnidaires suggère une machinerie apoptotique complexe, dont l'étude pourrait apporter des éléments cruciaux pour notre compréhension de l'évolution des voies de signalisation apoptotique. Par conséquent, il était fondamental de présenter nos connaissances chez ce groupe, d'autant plus que l'évolution des signalisations apoptotiques sera à nouveau abordée et discutée dans ce manuscrit (*cf.* Chapitre III page 193).

Enfin, il faut souligner que les travaux qui se sont focalisés sur l'apoptose au niveau fonctionnel montrent qu'elle semble jouer un rôle fondamental pour le bon déroulement de la métamorphose, notamment chez l'hydrozoaire *Hydractinia echinata* (Seipp *et al.*, 2001, 2006 ; Wittig *et al.*, 2011).

I.1.b. De l'apoptose au cours de la métamorphose des cnidaires : l'exemple d'*Hydractinia echinata*

Au cours de la métamorphose du cnidaire *Hydractinia echinata* (Hydrozoa), l'apoptose observée au niveau de l'épiderme présente un profil polarisé et provoque la destruction de certaines cellules larvaires, notamment neuro-sensorielles. L'apoptose est fondamentale dans ce processus puisque son inhibition chez les planulas en métamorphose provoque des problèmes de développement du future polype (Seipp *et al.*, 2001, 2007, 2010; Wittig et al. 2011).

Comme beaucoup de cnidaires, *Hydractinia echinata* présente un stade de vie sessile nommé polype. Le polype se reproduit de façon sexuée, larguant les gamètes dans le milieu extérieur (Weis *et al.*, 1985 ; Walther *et al.*, 1996). Après fécondation, l'embryogenèse produit la larve nageante ciliée planula. Après une phase de nage (1 jour), la planula va se métamorphoser (Figure 43), processus au cours duquel des changements morphologiques majeurs se produisent, puisque la larve initialement allongée va s'élargir et se raccourcir, puis se fixer au substrat grâce à une ventouse (nommée « *suction cup »* par Freeman (1981) chez *Clytia gregarium*) située au pôle aboral et composée de cellules glandulaires (Weis *et al.*, 1985 ; Walther *et al.*, 1996). La galette obtenue (nommée « *pedal disc »* par Freeman (1981) chez *Clytia gregarium*), issue de l'aplatissement de la larve, va croître en polype primaire qui développera des tentacules lui permettant de se nourrir (Wittig *et al.*, 2011).

De l'apoptose a été mise en évidence par marquage TUNEL (Figure 44) dans l'ectoderme aux deux pôles de l'animal à tous les stades de la métamorphose. Une approche montrant la fragmentation de l'ADN par « échelonnement de l'ADN » sur gel d'agarose (*DNA laddering*) a confirmé qu'il s'agissait d'apoptose (Seipp *et al.*, 2001). De plus, la présence de caspases actives a été montrée par l'utilisation d'un substrat fluorogénique spécifique de la caspase 3 des vertébrés (Seipp *et al.*, 2006). Plus tard, l'expression de He-caspase 3 (nommée ainsi car considérée comme homologue de la caspase 3 des vertébrés) a été caractérisée par hybridation *in situ* (Wittig *et al.*, 2011).

La présence d'apoptose attestée par ces travaux a conduit à une identification des cellules éliminées. Les ganglions neuronaux (localisés par immunomarquage anti-FMRF-amide) font partie des cellules détruites par apoptose (Seipp *et al.*, 2010), ce qui semble également être le cas des cellules glandulaires localisées au niveau de la ventouse (Seipp *et al.*, 2010). Une élimination des cellules glandulaires est également suggérée chez l'hydrozoaire *Mitrocomella polydiademata* (Romanes, 1876 ; Martin, Chia & Koss, 1983).

L'importance de l'apoptose dans le déroulement de la métamorphose de la planula d'*Hydractinia* a été évaluée par plusieurs approches (Seipp *et al.,* 2006 ; Wittig *et al.,* 2011). D'une part, l'exposition

à l'inhibiteur de caspases (pan-caspase inhibiteur Z-VAD-Fmk) a montré que la proportion de larves en cours de métamorphose était significativement inférieure chez les larves traitées par rapport aux témoins physiologiques, impliquant un rôle majeur de l'apoptose (Seipp *et al.*, 2006). D'autre part, il a été observé qu'une perte de fonction de He-cas3 par ARN interférence, inhibait significativement l'apoptose durant la métamorphose *d'Hydractinia*, provoquant des malformations dans la partie antérieure de la larve (pôle aboral, présentant la ventouse) (Wittig *et al.*, 2011). Alors que les larves témoins ont pu poursuivre une métamorphose normale conduisant à la formation d'un polype primaire (stade 14, Figure 43), il a été montré par comptages et analyses statistiques que les larves traitées restaient bloquées aux stades 7-12. Il en a été déduit que la présence d'apoptose au pôle antérieur (aboral) de la larve est un prérequis indispensable pour la mise en place du futur polype primaire après fixation de la planula. L'absence d'effets qui a été constatée dans la région postérieure de la planula indique que d'autres caspases peuvent être potentiellement impliquées, limitant l'impact de la perte de fonction de He-cas3. Cette explication proposée est congruente avec les observations qui ont été faites chez les vertébrés où une redondance de fonctions entre différentes caspases exécutrices est documentée (Kumar, 2007).

Hydractinia echinata n'est pas le seul cnidaire présentant de l'apoptose au cours de la métamorphose de la planula, puisque cette dernière est potentiellement présente au cours de la métamorphose d'*Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) (Scyphozoa) au niveau de l'endoderme. Elle est suggérée par des marquages immunologiques anti-caspase 3 et par une analyse en DAPI montrant une fragmentation de l'ADN (Yuan *et al.*, 2008). Chez *Clava multicornis* (Forskal, 1775) (Hydrozoa), des marquages TUNEL ont aussi permis de détecter une apoptose massive dans l'endoderme 48h après l'induction de la métamorphose (Pennati *et al.*, 2013).

La présence d'apoptose au cours de la métamorphose semble concerner la majorité des cnidaires. Cependant, l'apoptose n'est pas le seul comportement cellulaire mis en évidence au cours de la métamorphose des larves planula, puisque de la migration (concernant des cellules neuro-sensorielles, les nématocytes) (Plickert *et al.*, 1988) ou encore de la prolifération (concernant des cellules souches ou *i-cells*) ont été observées (Plickert *et al.*, 1988 & Yaun *et al.*, 2008). De plus, les études précédentes montrent que l'apoptose est localisée en partie au niveau de l'endoderme de la planula. Or, de façon intéressante, la présence de cellules souches au niveau de l'endoderme (détectée par hybridation *in situ*), a été mise en évidence chez plusieurs espèces de cnidaires (*Clytia*; *Hydractinia*) (Rebscher *et al.*, 2008 ; Leclère *et al.*, 2012) et interroge sur l'impact éventuel de l'apoptose sur ces dernières.



Figure 43: Représentation schématique du déroulement de la métamorphose de la larve planula d'*Hydractinia echinata* (cnidaire, hydrozoaire). La métamorphose commence alors que la larve est encore nageante. Un ensemble de modifications morphologiques précèdent la fixation au substrat. Un « aplatissement » s'en suit, et précède la croissance du stolon, puis enfin le développement des tentacules. Modifiée de Wittig *et al.*, 2011.



Figure 44: Marquage TUNEL sur des planulas de *Hydractinia echinata* nageantes en cours de métamorphose permettant de visualiser les cellules apoptotiques (vert). (A), en partie antérieure (a) des noyaux sont « TUNEL-positifs » autour de la ventouse. (B), De l'apoptose est présente aux deux pôles de la larve. (C), focus sur l'ectoderme postérieur présentant des noyaux « TUNEL-positifs ». Barre d'échelle : 100µm. Modifiée de Seipp *et al.*, 2006.

La présence, au cours de la métamorphose des cnidaires, de cellules souches ainsi que leur migration ou encore leur prolifération dans un contexte apoptotique, en fait un cadre propice pour mieux comprendre les rôles morphogénétiques de l'apoptose, et explorer l'existence de la FCA chez ces animaux. Je vais donc présenter dans la suite de cette partie ce qui est connu sur les comportements cellulaires observés chez les larves planulas, en m'intéressant essentiellement aux cellules souches présentes dans l'endoderme.

I.2. Coexistence de plusieurs comportements cellulaires

I.2.a. Les cellules souches des cnidaires, entre maintien et différenciation

Les cnidaires hydrozoaires possèdent des populations de cellules souches particulières, globalement nommées cellules interstitielles (ou *i-cells – interstitial cells*). La distinction entre les différentes populations d'*i-cells* n'est pas encore claire, j'utiliserai donc ce terme pour désigner ces cellules dans leur ensemble. Les *i-cells* sont présentes chez la larve planula, le polype et la méduse, impliquant leur maintien (elles restent présentes) tout au long du cycle de vie de l'animal.

Les *i-cells* apparaissent au cours de la gastrulation, période durant laquelle elles sont localisées en position centrale dans l'endoderme (Leclère *et al.*, 2012). Elles conservent cette localisation endodermique dans la planula, puis se retrouvent majoritairement dans l'ectoderme au stade polype et au stade méduse. Les noyaux des *i-cells*, gros et globuleux, sont facilement reconnaissables en microscopie photonique à l'aide d'un marquage DAPI ainsi qu'en microscopie électronique (Plickert *et al.*, 1988). Chez plusieurs espèces de cnidaires telles *Podocoryne carnea* (Sars, 1846) (Seipel *et al.*, 2004) ou encore *Hydra vulgaris* (Mochizuki *et al.*, 2000-2001), les *i-cells* ont également été détectées grâce à des marqueurs classiques de cellules souches tels que *Nanos, Vasa, PL10* ou encore *Piwi*. Chez *Hydryctina echinata*, la présence des *i-cells* dans l'endoderme de la planula, aussi bien pendant la phase de nage que lors de la métamorphose, où l'apoptose est détectée (Seipp *et al.*, 2001), a aussi été montrée par hybridation *in situ* (He-vasa) et par microscopie électronique (Figure 45) (Weis & Buss, 1987; Rebscher *et al.*, 2008).

Chez *Clytia hemisphaerica*, il a également été observé par hybridation *in situ* (Che-*piwi, -vasa,* -*PL10, -nanos*) que cette population cellulaire est localisée dans l'endoderme de la larve planula nageante juste avant la métamorphose (Figure 46) (Leclère *et al.,* 2012).



Figure 45: Profil d'expression de He-*vasa* obtenu par hybridation *in situ* et révélant les *i-cells* chez *Hydractinia echinata*. Le marquage He-*vasa* est présent dans l'endoderme chez une jeune planula (52 hpf)(**A**) et une planula avant métamorphose (**B**) (7 dpf). Durant la métamorphose (**D**-**E**), le marquage montre que la population cellulaire exprimant He-*vasa* est toujours présente dans l'endoderme, mais est localisée dans la partie aborale. A 11.5h post-induction (hpi), alors que la larve est fixée, les *i-cells* sont présentes dans l'endoderme. Environ 5h après la fixation, des cellules exprimant He-*vasa* sont également présentes dans l'ectoderme, puis sont observées durant la croissance du polype primaire (**E**). Une fois le polype formé, les *i-cells* se retrouvent dans l'ectoderme. Les *i-cells* « traversent » donc la métamorphose, dans un contexte apoptotique, notamment dans l'ectoderme. Les pointillés représentent la mésoglée et séparent endoderme et ectoderme. Barre d'échelle pour A : 100µm. Barre d'échelle pour B-E, 50µm. L'étoile représente le pôle oral (postérieur) de la planula. Modifiée d'après Rebscher *et al.*, 2008.



Figure 46: Profil d'expression de Che-*piwi* obtenu par hybridation *in situ* et marquant les *i-cells* durant le développement post-blastula de *Clytia hemisphaerica*. (A-C), stades successifs de la gastrulation. (D-E), planula de 1 jour. (F), planula de 2 jours. (G), planula de 3 jours. Les *i-cells* sont présentes dans l'endoderme oral entre 1-2 jours, puis dans tout le tissu à 3 jours, avant la métamorphose. Barre d'échelle: 50 µm. Le pôle oral est en bas. Modifiée d'après Leclère *et al.*, 2012.

Les *i-cells* sont à l'origine de cellules somatiques neurosensorielles (*i.e.* cellules sensorielles, nématocytes), de cellules glandulaires ainsi que de cellules germinales chez la méduse (Weiler-Stolt, 1960 ; Martin & Chia, 1982 ; Martin *et al.*, 1988 ; Watanabe *et al.*, 2009). La différenciation d'*i-cells* en nématocytes (ou cnidocytes), cellules urticantes des cnidaires, a également été observée au cours de la métamorphose de la planula de *Cassiopeia xamachana* (Bigelow, 1892) ou encore d'*Hydractinia echinata* (Martin & Chia, 1982 ; Weis & Buss, 1987 ; Martin & Archer, 1988).

La prolifération des cellules souches *i-cells* qui se produit au cours de la métamorphose permet d'une part un maintien de cette population cellulaire, et d'autre part une différenciation de certaines d'entre elles en nématocytes.

Cette prolifération au cours de la métamorphose a été mise en évidence chez *Hydractinia echinata* par marquage de la phase-S (Plickert *et al.*, 1988 ; Kroiher *et al.*, 1990) aussi bien dans la larve encore nageante que dans le polype primaire (Figure 47). Les mêmes observations ont été faites chez la planula fixée en cours de métamorphose d'*Aurelia aurita* (Figure 47), où la prolifération a été détectée par immunomarquage anti-Phospho-Histone H3 (Yuan et al 2008).

Les nématocytes, bien que produits dans l'endoderme, sont ensuite localisés à la surface de l'ectoderme de la larve planula. Cette localisation puis accumulation de nématocytes observées au cours de la métamorphose s'expliquent par une migration de ces derniers de l'endoderme vers

l'ectoderme (Weis & Buss, 1987 ; Martin & Archer, 1988), ce qui a été montré notamment chez *Mitrocomella polydiatemata* en microscopie (Martin *et al.*, 1983).



Figure 47: Marquage des noyaux en phase-S chez la planula d'*Hydractinia echinata* (**A**) et prolifération cellulaire et apoptose durant la phase précoce de la métamorphose chez *Aurelia aurita* (**B**). (**A1**), phase-S, témoin de prolifération, dans le polype primaire en cours de développement. an = pôle antérieur ; po = pôle postérieur ; bp = *basal plate* ou *pedal disc* ; hy = hypostome ; tb = bourgeons de tentacules. (**B1**), section confocale d'une planula en métamorphose (en voie de fixation) avec marquage anti-Phospo-Histone H3 (marqueur de prolifération, cellules mitotiques en rouge) et anti-tubuline tyrosinée (vert). (**B2**), section confocale d'une planula en métamorphose (anti-caspase 3 (rouge) et anti-tubuline tyrosinée (vert) et marquage Sytox (marqueur nucléaire en bleu). Ecs = ectoderme prolifératif ; or = pôle oral ; enp = cellules endodermiques apoptotiques ; ens = endoderme en fin de prolifération. Barre d'échelle: **A**: 100 µm; **B**: 25 µm. Modifiée d'après Plickert *et al.*, 1988 & Yuan *et al.*, 2008.

I.2.b. Les nématocytes et les *i-cells* migrent au cours de la métamorphose

Les nématocytes sont produits au niveau de l'endoderme de la planula, en particulier par les *i-cells*. La littérature des années 70 et 80, grâce à l'apport de la microscopie électronique, montre la présence de ces cellules très reconnaissables, car de forme allongée, dans l'endoderme. Ces cellules ont la particularité de migrer en traversant la mésoglée durant la métamorphose. Après cette migration, elles sont distribuées à la surface de l'ectoderme de la planula (Weis & Buss, 1987; Martin & Archer, 1988). La migration de ces cellules présente la particularité de s'initier avant leurs différenciations complètes. En effet, le cnidocil (récepteur déclenchant l'éjection du harpon et donc l'injection du venin) et les stéréocils (expansions cytoplasmiques ramifiées) qui composent entre autres les nématocytes continuent de se former dans l'ectoderme après avoir traversé la mésoglée. Ces cellules sont à usage unique et continuellement renouvelées par l'animal, phénomène étudié chez l'hydre où la migration des nématocytes a été mise en évidence une première fois dans les années 70 (Campbell, 1974), puis étudiée in vitro (Agosti & Stidweill, 1991). Cette étude a montré in vitro, par marquage phalloïdine et microscopie électronique, que la migration de nématocytes chez l'hydre dépend d'actine F, de collagène IV et de fibronectine. Plus tard, la migration des nématocytes à partir de l'endoderme a été observée au cours de la métamorphose de la planula d'Hydractinia echinata (Weis & Buss, 1987 ; Plickert et al., 1988), et a également été caractérisée chez Pennaria tiarella (Martin & Archer, 1986).

Chez *Clytia hemisphaerica*, des nématocytes, détectables en marquage DAPI prolongé, ont été localisés au niveau de l'ectoderme chez des planulas de trois jours, au moment où est censée commencer la métamorphose. Ceci suggère leur production (*i-cells*), et leur migration depuis l'endoderme.

Les *i-cells* semblent également migrer au cours de la métamorphose de l'endoderme vers l'ectoderme chez la planula. Cette migration a été suggérée chez *Hydractinia* par microscopie électronique (Weis & Buss, 1987) et par hybridation *in situ* (Rebscher *et al.,* 2008) en raison des changements de localisations observés. Le même phénomène est observé chez *Pennaria tiarella* (Martin & Archer, 1986). Les observations au laboratoire de marquages Che-*piwi* ainsi que Che*nanos* par hybridation *in situ* montrent que des *i-cells* peuvent être présentes dans l'ectoderme chez les planulas de trois jours, suggérant aussi une possible migration de ces cellules chez cette espèce.

121

I.3. Clytia hemisphaerica, un organisme idéal pour étudier la FCA

Les données issues de plusieurs modèles de cnidaires hydrozoaires montrent qu'une population de cellules souches, les *i-cells*, est localisée dans l'endoderme de la larve. Ces cellules semblent se maintenir durant la métamorphose, puis migrent potentiellement vers l'ectoderme où elles seront localisées au stade polype et au stade méduse. Elles produisent aussi plusieurs types de cellules, notamment les nématocytes, qui migrent de l'endoderme vers l'ectoderme au cours de la métamorphose. De manière intéressante, de l'apoptose est observée de façon concomitante chez plusieurs espèces (*Hydractinia, Aurelia, Hydra*), suggérant qu'elle est présente chez la majorité des cnidaires.

Chez *Clytia hemisphaerica*, des nématocytes ont été détectés au niveau de l'ectoderme par marquage DAPI concentré chez des planulas de trois jours (début de la métamorphose), impliquant une migration préalable. De plus, la présence d'*i-cells* dans l'endoderme a été attestée par hybridation *in situ*, et de manière intéressante différents marquages ont été observés dans l'ectoderme, ce qui peut suggérer une migration.

Pour ces raisons, je me suis focalisé sur cette espèce qui semble prometteuse pour étudier les rôles morphogénétiques de l'apoptose. En effet, la métamorphose des planulas d'hydrozoaires est un cadre idéal et unique pour étudier la FCA dans la mesure où, dans un même cadre biologique et spatio-temporel, se produit de l'apoptose, de la prolifération, de la différenciation et de la migration.

TITRE

Clytia hemisphaerica, un nouveau modèle pour étudier les rôles morphogénétiques de l'apoptose au cours de la métamorphose.

RÉSUMÉ

La métamorphose est un processus morphogénétique impliquant un haut degré de coordination entre différents comportements et destins cellulaires, notamment la mort cellulaire par apoptose. L'apoptose semble commune à de nombreux types de métamorphoses et intervient dans l'élimination des cellulaires et structures larvaires. Cependant, il a été montré chez plusieurs espèces, comme le cnidaire Hydra, que l'apoptose est également capable d'induire des signaux moléculaires à destination des cellules adjacentes, modifiant ainsi leurs comportements en promouvant notamment de la prolifération. Ces deux fonctions soulignent des rôles morphogénétiques de l'apoptose plus large que la simple élimination de cellules, et suggèrent que les cellules apoptotiques peuvent réguler d'autres comportements cellulaires. Chez les cnidaires, la métamorphose de la larve planula a été décrite chez plusieurs espèces comme *Hvdractinia echinata* (Hydrozoa) ou Aurelia aurita (Scyphozoa). Durant ce processus, plusieurs comportements ou destins cellulaires ont été observés tels que de la prolifération, de la différenciation, de la migration ainsi que de l'apoptose, en faisant des modèles attrayant pour étudier les relations entre ces mécanismes. Ici, nous décrivons la métamorphose de la larve planula du cnidaire Clytia hemisphaerica. Après avoir caractérisé les stades morphologiques successifs de la métamorphose, divisés en une phase nageante puis une phase fixée, nous avons montré la présence d'un profil apoptotique polarisé. L'apoptose est localisée au pôle aboral de l'ectoderme, lieu de formation de la ventouse de fixation, et au pôle oral de l'endoderme. A ce niveau, l'apoptose se propage au cours de la phase de nage suivant l'axe oral-aboral puis est observée dans l'ensemble du tissu. De plus, dans ce contexte apoptotique marqué au niveau de l'endoderme, nous mettons en évidence la prolifération des *i-cells* (cellules souches) ainsi que la différenciation de certaines d'entre elles en nématocytes. Enfin, ces cellules migrent de l'endoderme vers l'ectoderme au cours de la phase de nage de la métamorphose. Ces différents comportements et destins cellulaires, observés chez plusieurs espèces de cnidaires, sont tous présents lors de la métamorphose de *Clytia hemisphaerica*. Le regroupement dans un même cadre biologique et spatio-temporel de prolifération, de différenciation, de migration et d'apoptose fait de cette espèce un modèle unique pour explorer les rôles morphogénétiques de l'apoptose.

INTRODUCTION

La métamorphose de *Clytia gregarium* a été décrite par Freeman (1981), et est caractérisée par des changements morphologiques observés chez d'autres espèces de cnidaires, soit une fixation de la planula nageante, suivi d'un aplatissement sur le substrat, puis la croissance du polype primaire.

La métamorphose de *Clytia hemisphaerica* respecte cette séquence d'événements. De plus, différentes hypothèses peuvent être émises sur les comportements et destins cellulaires pouvant avoir lieu au cours de sa métamorphose, en raison de ce qui est connu chez d'autres espèces de cnidaires. En effet, de l'apoptose, de la prolifération ainsi que de la différenciation ont été mises en évidence.

Pour ces raison, j'ai décrit la métamorphose de *Clytia hemisphaerica*, et caractérisé son profil apoptotique par marquage TUNEL, la prolifération par marquage EdU et la migration par marquage phalloïdine.

Ce travail a permis de montrer que de l'apoptose est impliquée dans l'élimination de cellules au cours de la métamorphose et est présente de façon concomitante avec de la prolifération, de la différenciation ainsi que de la migration dans l'endoderme. Cet ensemble de comportements et destins cellulaires regroupé dans un même contexte spatio-temporel font de *Clytia hemisphaerica* un nouveau modèle biologique de choix pour explorer les rôles morphogénétiques de l'apoptose.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Voir Annexe : Matériels et Méthodes (page 258).

RÉSULTATS

Caractérisation des étapes de la métamorphose de Clytia hemisphaerica

La larve planula, de forme allongée, commence la métamorphose trois jours postfécondation (jpf). Cependant, une hétérogénéité importante a été constatée puisque celle-ci peut parfois commencer plus précocement (2 jpf) ou au contraire plus tardivement (4 à 5 jpf). La métamorphose peut durer de 24h à 48h, depuis son initiation jusqu'à la formation du polype primaire capable de se nourrir. L'utilisation du neuropeptide GLW-amide permet l'induction de celle-ci et l'obtention de réplicats biologiques plus homogènes (même si une certaine hétérogénéité persiste). Pour cette raison, indiquer un intervalle de temps pour les étapes de la métamorphose de *Clytia hemisphaerica* que nous avons définies semble plus conforme aux observations, plutôt que de donner un temps fixe tel que ce qui a été effectué pour la métamorphose de la planula d'*Hydractinia echinata* (Wittig *et al.*, 2011).

Les larves dites pré-métamorphiques sont des larves planulas de trois jours dont la métamorphose n'a pas été induite, en opposition aux larves métamorphiques qui sont celles ayant été exposées au GLW-amide. La métamorphose de la planula, à partir de caractéristiques morphologiques, comportementales et cellulaires, a été divisée en **douze stades** (std-1 à std-12) eux-mêmes **répartis en deux phases** (Figure 48 A). La première phase qui correspond à la larve nageante comprend les stades std-1 (induction) à std-4 (larve compétente pour la fixation), tandis que la seconde phase qui correspond à la larve fixée comprend les stades std-5 (fixation de la larve au substrat) au std-12 (le polype primaire est formé et capable de se nourrir) (Figure 48 A).



Figure 48: Déroulement de la métamorphose de la larve planula de *Clytia hemisphaerica*. **A**, stades morphologiques de l'induction (std-1) au polype primaire (std-12) répartis en une phase nageante puis une phase fixée. **B**, Changements morphologiques majeurs (flèches blanches) de la phase de nage (ici std-3). Le pôle oral devient plus fin, la larve raccourcie en longueur suivant l'axe oral-aboral et des bourrelets latéraux apparaissent dans la zone médiane de la planula. C, ventouse de fixation au pôle aboral vue en marquage phalloïdine (actine-rouge) avec un marquage DAPI (vert) chez une planula en phase de nage (ici std-4). **D**, une fois la ventouse formée, la larve se fixe au substrat (ici std-5). Barre d'échelle : 100µm (std-1 à -8).

L'induction, par ajout de GLW-amide dans l'eau de mer contenant des larves pré-métamorphiques donne des larves std-1 initiant la métamorphose. Au cours des 30min qui suivent l'induction, les premiers changements morphologiques sont constatés, caractérisant les std-2 et std-3 : les larves métamorphiques présentent une forme moins allongée que les larves pré-métamorphiques, et gagnent en largeur (std-2). Chez les larves std-3, le raccourcissement de la longueur et le rétrécissement de la largeur du pôle oral débutés au std-2 se poursuivent. Le std-3 est en particulier caractérisé par l'apparition des bourrelets latéraux (Figure 48 B). De plus, l'invagination de la ventouse de fixation au pôle aboral se produit et cette dernière peut être distinguable à la loupe binoculaire, par marquage DAPI ou encore par marquage à la phalloïdine (Figure 48 B-C). Une fois la ventouse formée (Figure 48 C), la larve localisée près du fond adopte une nage en rotation sur elle-même (std-4). Elle est alors capable de se fixer, fixation qui représente le début de la phase 2 de la métamorphose qui commence environ 1 heure post-induction (hpi) (std-5). Suite à cette fixation, la planula subit un aplatissement suivant l'axe oral-aboral (std-6-7), jusqu'à former une galette sur le substrat (std-8) (nommé « pedal disc » chez Clytia gregarium par Freeman, 1981). À partir de la forme galette, formée environ 4 hpi, la croissance du stolon du futur polype primaire commence (std-9). A mi-croissance de celui-ci, la thèque et les « segments » sont clairement distinguables (std-10). Enfin la tête du futur polype se forme (std-11) puis les tentacules se développent, lui permettant de se nourrir (std-12) (Figure 48 A). L'établissement de stades de la métamorphose m'a permis dans un second temps de me focaliser sur les événements cellulaires les caractérisant.

Le profil apoptotique est polarisé

Le déroulement de la métamorphose tel que décrit précédemment est également caractérisé par un profil apoptotique qui évolue au cours du temps. Les larves pré-métamorphiques ne présentent pas de cellules en apoptose, à l'exception notable de quelques cellules « TUNEL-positives » localisées de façon sporadique dans l'endoderme. Après induction, l'apoptose détectée par marquage TUNEL est caractérisée par un profil polarisé au cours de la phase de nage (Figure 49 A). Les cellules TUNEL positives sont observées au pôle aboral de l'ectoderme sur le pourtour de la future ventouse de fixation au std-2 (Figure 49 B), ainsi qu' au pôle oral de l' endoderme (Figure 49 A-B). Ensuite, jusqu' à la fin de la phase de nage (std-3 à std-4), l'apoptose s'étend du pôle oral de l'endoderme vers le pôle aboral et touche l'ensemble du tissu (Figure 49 A-bas). Elle reste en revanche localisée au pôle aboral dans l'ectoderme. De manière intéressante, *Che-wnt3* est exprimé, chez les larves planulas std-4, sur l'ensemble du pôle oral de l'ectoderme, là où aucune cellule TUNEL-positive n'est détectée (Figure 49 C) (sachant que la voie *wnt* est connu pour être une voie de survie). De ce fait, un lien potentiel pourrait exister entre l'expression de *Che-wnt3* et le profil apoptotique observé au niveau de l'ectoderme. L'apoptose ectodermique se concentre en revanche

au niveau des cellules glandulaires qui forment la ventouse au pôle aboral de la larve nageante (Figure 50).



Figure 49: Profil apoptotique polarisé de la planula au cours de la phase de nage analysé par marquage TUNEL (apoptose-**rouge**) couplé à un marquage DAPI (**vert**) (**A-B**) avec l'expression polarisée de Che-*wnt3* (**C**). **A**, larve nageante au std-2 vue par microscopie confocale au niveau de l'ectoderme (haut) et de l'endoderme (milieu) chez la même planula. L'apoptose est localisée au pôle aboral de l'ectoderme et au pôle oral de l'endoderme. A la fixation, l'apoptose est généralisée dans l'endoderme (A - TUNEL – 3^{eme} ligne) (std-4-5). **B**, planula présentant le profil apoptotique polarisée (flèche rouge A, ectoderme aboral ; flèche rouge B, endoderme oral) avec la ventouse en formation (flèche bleu), caractéristique des std-2-3. C, Hybridation *in situ* de Ch-*wnt3* chez une larve avant fixation (std-4). L'expression est polarisée au pôle oral de l'ectoderme où l'apoptose n'est pas présente. Barre d'échelle : 50µm.



Figure 50: Larve en métamorphose avec marquage YL1/2 (tubuline- α – **rouge**), marquage TUNEL (apoptose-**vert**) et un marquage DAPI (**bleu**). Les cellules glandulaires composent la ventouse de fixation au pôle aboral. **A**, planula au std-2. L'apoptose est ectodermique. **B**, planula au std-4. L'apoptose est ectodermique **C**, planula au std-8. (**D**) Pôle aboral au niveau de la ventouse. Barre d'échelle : 50µm.



Figure 51: Profils apoptotiques au cours de la phase fixée de la métamorphose observés par marquage TUNEL (apoptose-rouge) et un marquage DAPI (vert). A, planula au std 8 (dit stade « galette »). L'apoptose est généralisée dans l'endoderme. B, apoptose le long du stolon en croissance (std-10). C, formation du tube gastrique (cavité gastrovasculaire) par apoptose (haut) et apoptose au niveau du pied (std-11). D, chez des polypes issus de colonies, aucune cellule TUNEL positive n'est détectée le long du stolon, mais en revanche certaines cellules sont marquées à l'extrémité des tentacules.

À la fixation de la larve, l'apoptose est généralisée à l'ensemble de l'endoderme, alors qu'elle reste localisée au pôle aboral de l'ectoderme (std-5 – Figure 49 A). Lors de la formation de la galette (std-5-8), l'apoptose est massive et concerne l'endoderme comme l'ectoderme (Figure 4 A). Au cours de la croissance du futur polype primaire, les cellules TUNEL-positives sont réparties sur toute la longueur de l'endoderme du stolon, ainsi qu' au niveau du pied du polype qui prendra une forme caractéristique en trèfle (Figure 48 ; Figure 51 B-C). En opposition au polype primaire, nous constatons une absence d'apoptose dans le stolon des polypes issus de colonies (Figure 51 D). En revanche, chez ces derniers, de l'apoptose est mise en évidence à l' extrémité distale des tentacules (Figure 51 D).

Les cellules souches *i-cells* sont localisées dans l'endoderme dans un contexte apoptotique

La présence des *i-cells* dans l'endoderme au cours de la métamorphose, en particulier durant la phase de nage lorsque l'apoptose est présente, est attestée par des hybridations *in situ* (Figure 52 A). Plus tard, au std-11, les *i-cells* sont détectées dans l'ectoderme au niveau du pied du futur polype primaire, ainsi que dans le stolon en développement (Figure 52 A). Ce changement de localisation des *i-cells* peut déjà être observé chez les planulas nageantes. En effet, des *i-cells*, bien que majoritairement détectées dans l'endoderme, peuvent également être localisées dans l'ectoderme à partir du std-3, au pôle aboral (Figure 52 B) comme au pôle oral (Figure 52 C). La présence d'apoptose à ces deux pôles est attestée par marquage TUNEL dans l'ectoderme aboral (Figure 52 B), et visible indirectement dans l'endoderme grâce à la fragmentation des noyaux marqués en DAPI (Figure 52 C). Les *i-cells* sont des cellules souches et sont, par conséquent, caractérisées par une prolifération permettant leur maintien.



Figure 52: Hybridations *in situ* du gène Che-*Piwi* au cours de la métamorphose. A, Ch-*piwi* est exprimé dans l'endoderme, indiquant la présence des *i-cells* (std-4). L'expression est détectée dans l'ectoderme dans le pied du polype et dans le stolon (std-11). B, le marquage Ch-*piwi* est détecté chez la planula dans l'ectoderme aboral (flèche rouge), indiquant une migration des *i-cells* alors que de l'apoptose y est présente (marquage TUNEL). C, le marquage est localisé dans l'endoderme ainsi que dans l'ectoderme oral (flèche rouge) au std-3, suggérant une migration. On remarque la fragmentation des noyaux visible en DAPI (flèches blanches) dans l'endoderme, caractéristique de l'apoptose. Barre d'échelle: 50µm.



Figure 53: Prolifération cellulaire (A-B) détectée par marquage EdU (**rouge**) avec un marquage DAPI (**vert**) et migration des nématocytes (C) mis en évidence par marquage phalloïdine (actine-**rouge**) lors de la phase de nage. **A**, larve nageante au std-3 présentant un marquage EdU-positif dans l'ensemble de l'endoderme, ainsi qu'au niveau de l'ectoderme de façon moins importante. **B**, grossissement sur une larve nageante (std-3) montrant le marquage EdU colocalisé avec le DAPI. On remarque la fragmentation des noyaux visible en DAPI (flèches blanches), caractéristique de l'apoptose. **C**, ectoderme avec marquage phalloïdine montrant les filaments d'actine (flèches blanches) à la base des nématocytes visibles en DAPI (forme allongée), indiquant leur migration. Barre d'échelle: 50µm.

La prolifération et la différenciation des *i-cells* au cours de la phase de nage

Les analyses EdU effectuées sur des planulas en métamorphose au cours de la phase de nage montrent des marquages positifs indiquant des divisions cellulaires (Figure 53 A). Celles-ci sont présentent dans l'ectoderme, mais surtout, et de façon plus importante, dans l'endoderme alors qu'une apoptose massive est d'ores et déjà présente (std-3-4). L'apoptose peut être indirectement détectée grâce à la fragmentation des noyaux visibles en marquage DAPI (Figure 53 B) et qui confirme les observations effectuées par marquage TUNEL. La prolifération des *i-cells* conduit à la production de nématocytes que leur forme allongée caractéristique permet d'observer en marquage DAPI concentré (Figure 53 C) (Wolenski *et al.*, 2013 ; Babonis & Marindale, 2017).

La production et la différenciation des nématocytes se produisent dans l'endoderme, alors qu'ils sont également observés dans l'ectoderme où ils s'accumulent au pôle oral de la larve au cours de la phase de nage. Les filaments d'actines détectés à la base des nématocytes grâce à un marquage phalloïdine indiquent une migration active de ces derniers de l'endoderme vers l'ectoderme, raison pour laquelle ils sont observés à l'ectoderme oral de la planula nageante (Figure 53 C). Alors que les nématocytes s'accumulent préférentiellement à la surface de l'ectoderme du pôle oral de la larve, c'est dans l'endoderme oral que le plus grand nombre de nématocytes en migration est détecté, c'est-à-dire là où l'apoptose est detectée dans l'endoderme.

La prolifération détectée dans l'endoderme résulte probablement de la prolifération des *i-cells* qui se maintiennent au cours de la phase de nage de la métamorphose, ainsi que de la production de nématocytes issue de la différenciation de certaines d'entre-elles.

Au cours de la phase de nage de la métamorphose de la planula, la prolifération, la différenciation, la migration des nématocytes et potentiellement des *i-cells* s'observent de façon concomitante avec de l'apoptose au niveau de l'endoderme.

Les différents changements morphologiques observés chez *Clytia hemisphaerica* lors de la métamorphose de la larve planula s'accordent avec des observations réalisées chez d'autres espèces de cnidaires. La fixation de la larve, suivie par son aplatissement suivant l'axe oral-aboral sur un substrat puis la mise en place du futur polype par la croissance du stolon ont été observés notamment chez *Hydractinia echinata* (Wittig *et al.*, 2011), *Aurelia aurita* (Mayorova *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2008) ou encore *Clytia gregarium* (Freeman, 1981).

La métamorphose chez *Clytia hemisphaerica* débute alors que la larve est encore nageante, ce qui est courant chez les cnidaires, comme *Hydractinia echinata* ou *Cassiopeia xamachana* (Martin & Chia 1982). La nage en rotation caractérisant le std-4 a également été observée chez *Acropora millepora* (Muller *et al.*, 2002). C'est au cours de cette phase de nage que la ventouse se développe, avec la présence des cellules glandulaires neuro-sensorielles au pôle aboral de la larve, mises en évidence notamment par microscopie électronique chez *Cassiopea xamachana* (Martin & Chia 1982) et *Clytia gregarium* (Freenman, 1981 ; Martin & Chia 1982 ; Weis & Buss, 1987) ou encore par immunomarquage FMRF-amide chez *Hydractinia echinata* (Seipp *et al.*, 2010).

Ces cellules glandulaires, spécifiques des hydrozoaires, sont également détectées chez *Clytia hemisphaerica*, en particulier lorsque la ventouse est formée (std-4). Il a été proposé que la ventouse soit indispensable pour la fixation de la larve (Freeman, 1981, Weis & Buss, 1987), ce que nos observations semblent confirmer, puisqu'aucune larve dépourvue de ventouse n'est capable de se fixer. Cependant, la phase fixée est techniquement complexe à étudier.

En effet, la fixation de la larve (std-5) rend difficile l'obtention de matériel biologique pour la phase fixée (std-5-12). Tenter de décoller les larves ou les polypes en croissance conduit la plupart du temps à leurs destructions, impliquant qu'une collecte importante d'individus est difficilement envisageable. Par conséquent, le nombre d'échantillons biologiques disponible pour l'étude de la phase fixée est particulièrement réduit par opposition aux larves nageantes. Les résultats présentés concernant la phase fixée doivent donc être regardés à la lumière du peu de réplicats disponibles, mais aussi par rapport à la difficulté de leur obtention.

L'apoptose polarisée

Le profil apoptotique observé chez *Clytia hemisphaerica* suggère, au niveau de l'endoderme, que l'apoptose progresse du pôle oral vers le pôle aboral comme une vague polarisée, jusqu'à concerner l'ensemble du tissu endodermique (Figure 54).

La présence d'un profil apoptique polarisé au cours de la métamorphose a déjà été mise en évidence chez le cnidaire *Hydractinia echinata* (Seipp *et al.*, 2006). Chez cette espèce, l'apoptose est

localisée au niveau de l'ectoderme et se propage du pôle oral vers le pôle aboral. En revanche, l'apoptose au pôle oral est endodermique chez *Clytia hemisphaerica* en opposition à *Hydractinia echinata* où celle-ci est ectodermique. Chez *Aurelia aurita*, l'apoptose est également localisée, comme chez *Clytia*, dans l'endoderme (Yuan *et al.*, 2008). A la lumière de ces données, il semblerait que la présence d'apoptose au cours de la métamorphose concerne l'ensemble des cnidaires.

Il a été montré que l'apoptose participe notamment à l'élimination des cellules glandulaires (neuro-sensorielles) au cours de la métamorphose chez *Hydractinia echinata* (Seipp *et al.*, 2010). Il paraît probable qu'il en soit de même chez la planula de *Clytia hemisphaerica*. En effet, l'apoptose est présente dans l'ectoderme aboral, et les marquages YL1/2 effectués sur les larves au stade galette (sdt-8) montrent que les cellules glandulaires sont généralement moins nombreuses ou même absentes en comparaison aux larves en phase de nage, suggérant que ces cellules ont été éliminées après la fixation. D'autres types cellules sont possiblement éliminées, puisque l'apoptose le long de l'endoderme du stolon du futur polype primaire de *Clytia hemisphaerica*, suggère la formation de la cavité gastrique avant le développement des tentacules, ce qui a été observé également chez *Aurelia aurita* (Yuan *et al.*, 2008).

Ces éléments suggèrent que, chez *Clytia hemisphaerica*, l'apoptose intervient dans l'élimination des cellules ou structures larvaires qui ne seront plus présentes chez le polype primaire. Ce résultat est conforme avec le fait que de l'apoptose est toujours observée lors des métamorphoses et intervient dans l'élimination et le réarrangement des tissus (*i.e.* xenopus) (Jacobson *et al.*, 1997)

L'apoptose massive détectée dans l'endoderme de la larve et le pied du polype de *Clytia hemisphaerica* (std-3-10) suggère un rôle prépondérant de l'apoptose pour le bon déroulement de la métamorphose. Il a été montré chez *Hydractinia echinata* que l'inhibition de l'apoptose bloque la formation du polype primaire après fixation de la larve, indiquant que cette mort cellulaire est cruciale pour la survie de l'animal (Wittig *et al.*, 2011). Surtout, le développement du polype nécessite un processus de différenciation qui n'a pas lieu en cas d'inhibition des caspases, suggérant que la différenciation dépend des cellules apoptotiques, ce entrerai dans la définition de la FCA.

La présence du gradient d'expression de Che-*wnt3* au niveau de l'ectoderme oral, autrement dit localisé dans la zone non apoptotique de l'ectoderme au cours de la phase de nage de la planula de *Clytia hemisphaerica*, suggère un lien potentiel entre la polarité de la larve et son profil apoptotique. Chez *Ciona intestinalis* notamment, le profil apoptotique polarisé de la queue, suivant l'axe antéro-postérieur lors de la métamorphose de la larve, dépend de la polarité de l'épiderme et de l'extension de l'expression de Ci-*hox12* dans l'ensemble de l'épiderme caudal (Krasovec *et al.,* soumis). Une perte de fonction du gène Che-*wnt3* permettrait d'évaluer le rôle de ce gène et de déterminer si son profil d'expression conditionne le profile apoptotique de l'ectoderme.



Figure 54: Profil apoptotique polarisé au cours de la phase de nage de la métamorphose de la planula de *Clytia hemisphaerica*.

La prolifération, la différenciation et la migration se déroulent dans un contexte apoptotique

La prolifération et la différenciation des *i-cells* dans l'endoderme ont été mises en évidence chez plusieurs espèces de cnidaires comme *Hydractinia echinata, Aurelia aurita* ou encore *Cassiopeia xamachana* (Martin &Chia, 1982 ; Plicker *et al.*, 1988 ; Rebscher *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2008).

Il a également été montré que les nématocytes sont produits par la différenciation de ces cellules souches dans l'endoderme et qu'ils migrent ensuite vers l'ectoderme en traversant la mésoglée (Martin & Chia, 1982 ; Weis & Buss, 1987 ; Plicker *et al.*, 1988 ; Rebscher *et al.*, 2008 ; Mayorova *et al.*, 2012). Nous retrouvons de la prolifération (marquage EdU) chez *Clytia hemisphaerica*, et la présence de nématocytes prouve que certaines *i-cells* se différencient. Cette prolifération et cette différenciation ont la particularité de se dérouler de façon concomitante avec de l'apoptose dans l'ensemble de l'endoderme de la larve (Figure 55).

Nos marquages à la phalloïdine montrent de larges projections membranaires de types lamellipodes suggérant une migration des nématocytes. La migration des *i-cells* est aussi suggérée chez *Clytia hemisphaerica* par leur localisation (hybridation *in situ*) dans l'ectoderme de certaines planulas et chez les polypes en croissance au niveau du pied. Or, il a été montré chez *Hydractinia echinata* que les *i-cells* sont endodermiques chez la planula puis ectodermiques dans le polype primaire, suite à leur migration (Weis & Buss, 1987; Rebscher *et al.*, 2008). Les différences de localisation des *i-cells* que nous avons constatées suggèrent donc que le même phénomène est présent chez *Clytia hemisphaerica* en fin de phase de nage et au cours de la phase fixée, même si le nombre de polypes primaires que nous avons pu collecter est réduit.

Nos données mettent en évidence qu'un ensemble de comportements (prolifération - migration) et destins cellulaires (différenciation - apoptose) observé chez plusieurs espèces de cnidaires est présent au cours de la métamorphose de la larve planula de *Clytia hemisphaercia*, dans un même cadre biologique et spatio-temporel (Figure 55).

Malheureusement, en raison de la présence d'une GFP endogène chez *Clytia hemisphaerica*, fortement exprimée dans la planula (Fourrage *et al.*, 2014 ; observations personnelles), effectuer des doubles marquages en immuno-fluorescence couplant un marquage TUNEL avec un second immunomarquage s'est révélé compliqué. Si des doubles marquages TUNEL/YL1/2 ont pu être réalisés avec succès, cela n'a pas été le cas pour les marquages EdU ainsi que phalloïdine. En revanche, dans ces deux derniers cas, il est possible d'observer grâce au marquage DAPI la fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose, ce qui suggère sa présence, d'autant plus que ce sont ces types de fragments qui sont TUNEL-positifs dans nos autres marquages. Ce type d'approche est courant dans la littérature et a déjà été utilisé chez *Aurelia aurita* (Yuan *et al.*, 2008). Bien qu'indirecte, cette approche permet de renforcer les hypothèses de prolifération et de migration dans un contexte apoptotique.



Figure 55: Ensemble des comportements et destins cellulaires intervenant au cours de la métamorphose de la planula de *Clytia hemisphaerica* au std-4, avant fixation.

L'apoptose pourrait participer à la coordination des comportements cellulaires observés

L'apoptose est un destin cellulaire permettant l'élimination de tissus larvaires, notamment au cours de la métamorphose, ce que suggèrent nos résultats chez *Clytia hemisphaerica (i.e.* cellules glandulaires, cavité gastrique). Cependant, une fonction nouvelle de l'apoptose a émergé ces dernières années, présentant les cellules apoptotiques comme étant capables d'induire des signaux moléculaires à destination de cellules adjacentes. Chez la drosophile par exemple, les cellules apoptotiques sont capables d'induire un mécanisme de survie vers les cellules voisines au niveau des disques imaginaux lors de l'embryogenèse (Bilak *et al.*, 2014). Cette fonction a également été mise en évidence chez le cnidaire *Hydra vulgaris*, où les cellules apoptotiques présentes sur le site de blessure, suite à une amputation de la tête du polype, induisent un signal Wnt activant la voie Wnt-β-caténine dans les cellules voisines, ce qui provoque leur prolifération et initie la régénération de l'animal (Chera *et al.*, 2009).

Les études qui se sont portées sur cette fonction émergente de l'apoptose ont montré que le signal

moléculaire émis par les cellules apoptotiques dépendait d'une famille de protéase, les caspases (Tseng *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2010). Or, les caspases sont centrales dans la régulation et l'exécution de l'apoptose (Meier *et al.*, 2000 ; Fush et Steller, 2015), et ont été mises en évidence à l'échelle des métazoaires et notamment chez plusieurs espèces de cnidaires comme *Hydractinia echinata*, *Acropora mellipora* ou encore *Hydra vulgaris* (Seipp *et al.*, 2006 ; Lasi *et al.*, 2010 ; Zmasek 2013; Moya *et al.*, 2016). De manière intéressante, l'induction de comportements ou de destins cellulaires de façon caspases-dépendante a également été montrée dans un cadre non apoptotique, comme lors de la migration des neurones olfactifs durant l'embryogenèse de la souris (Ohsawa *et al.*, 2010). Ces éléments considérés dans leur globalité suggèrent que les cellules apoptotiques pourraient participer à la coordination des comportements et destins cellulaires observés au cours de la métamorphose de *Clytia hemisphaerica*, tout en assurant une fonction d'élimination des cellules et structures larvaires.

CONCLUSION

La fonction de l'apoptose consistant en la suppression de tissus ou cellules (*i.e.* tissus larvaires au cours de la métamorphose) est largement documentée à l'échelle des métazoaires (Jacobson *et al.,* 1997). En revanche, l'apoptose semble jouer un rôle plus large en influant sur le comportement ou le destin des cellules adjacentes, fonction qui n'a été mise en évidence que chez quelques espèces. De plus, cette fonction émergente a été montrée dans des cadres restrictifs, c'est à dire dans un contexte biologique ou l'apoptose induit un seul comportement ou destin cellulaire.

Chez la larve planula de *Clytia hemisphaerica*, lors de la métamorphose, une apoptose massive est présente de façon concomitante avec plusieurs types de comportements ou destins cellulaires que sont la prolifération (i-cells), la différenciation (nématocytes) et la migration (i-cells et nématocytes). L'ensemble de ces comportements regroupés dans un même cadre biologique et spatio-temporel fait de *Clytia hemisphaerica* un modèle unique et novateur pour étudier l'ensemble des fonctions morphogénétiques de l'apoptose, et explorer en particulier la FCA.

III. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE N°1

III.1. Synthèse

La métamorphose de la planula du cnidaire *Clytia hemisphaerica*, initiée trois jours après fécondation, peut-être induite par une exposition au neuropeptide GLW-amide de la même manière que pour *Hydractinia echinata* afin d'obtenir des lots homogènes (Schmich *et al.*, 1998 ; Houliston *et al.*, 2010). J'ai observé la métamorphose de la planula et l'ai divisé en une succession de douze stades en fonction des caractéristiques morphologiques et cellulaires observées. Les quatre premiers stades correspondent à la phase nageante, et les suivants (5-12) correspondent à la phase fixée.

Au cours de la phase de nage, des changements morphologiques majeurs sont observés, avec un raccourcissement de la longueur de la larve et l'apparition de bourrelets latéraux (forme nommée « *dish-pile* » par Pennati et al (2013) chez *Clava multicornis*). Des marquages TUNEL couplés à des marquages DAPI ont permis de localiser les cellules apoptotiques et d'observer la fragmentation nucléaire. Le profil apoptotique mis en évidence montre une nette polarité, puisque de l'apoptose est détectée au pôle aboral de l'ectoderme, et en opposition au pôle oral de l'endoderme. Au cours de la phase de nage et avant la fixation, l'apoptose se généralise dans l'endoderme, présentant un nombre important de cellules TUNEL-positives uniformément réparties du pôle oral au pôle aboral. Pour ce qui est de l'ectoderme, l'apoptose demeure localisée au pôle aboral. Parallèlement, la ventouse de fixation se forme, (structure nommée « *suction-cup* » par Martin & Chia (1982) chez *Cassiopeia xamachana*), composée de cellules glandulaires (neuro-sensorielles) mise en évidence par immunomarquage anti-tubuline- α (YL1/2). L'invagination au pôle aboral, conséquence de la mise en place de la ventouse, peut également être observée à la loupe binoculaire (permettant ainsi d'évaluer la progression de la métamorphose) ou encore en marquage DAPI.

De façon intéressante, j'ai mis en évidence que les *i-cells*, populations de cellules souches endodermiques, sont présentes dans l'endoderme et restent détectables par hybridations *in situ* (Che-*Piwi* et Che-*Nanos*) au cours de la métamorphose, alors qu'une apoptose généralisée est observée. Par conséquent, cette population se maintient (reste en place/survit) au cours de la métamorphose dans un contexte apoptotique marqué. Ces cellules produisent, entre autres, les nématocytes, qui migrent vers l'ectoderme. J'ai détecté par marquage DAPI concentré ces cellules, et mis en évidence leur migration par marquage phalloïdine permettant de visualiser les filaments d'actines. Alors que le maintien des *i-cells* et la production de nématocytes suggèrent de la prolifération dans l'endoderme, j'ai mis en évidence chez les planulas en phase de nage la présence de division (phase-S) par immunomarquage EdU. L'ensemble de ces travaux montre la présence, dans un même

cadre spatio-temporel, de phénomène d'apoptose, de prolifération et de migration chez la planula de *Clytia hemisphaerica* et ce, en métamorphose durant la phase de nage.

Les planulas en métamorphose en phase fixée sont particulièrement difficiles à obtenir, les décrocher du substrat conduit la plupart du temps à leur destruction. Par conséquent, les résultats présentés sur cette phase doivent être analysés à la lumière du peu de réplicats biologiques disponibles. Malgré cette contrainte inhérente à mon modèle et à la biologie de sa métamorphose, j'ai pu montrer que l'apoptose demeure présente dans l'endorme et l'ectoderme, au stade galette puis lors de la croissance du futur polype primaire. Au stade galette, les cellules glandulaires mises en évidence par marquages YL1/2 ne sont plus détectées, suggérant leur élimination par apoptose comme cela a été observé chez *Hydractinia echinata* (Seipp *et al.*, 2010). L'apoptose en position centrale observée sur toute la longueur de la tige du futur polype primaire en croissance s'effectue probablement simultanément à l'ouverture de la cavité gastrique (les polypes issus de colonies ne présentent pas un tel profil apoptotique). Enfin, les hybridations *in situ* Che-*Piwi* ont montré que des marquages sont présents chez les polypes en développement, confirmant le consensus sur le maintien des *i-cells* au cours du cycle de vie des hydrozoaires.

Ces travaux ont permis de décrire les différents changements morphologiques et certains événements cellulaires au cours de la métamorphose de la larve planula de *Clytia hemisphaerica*. La métamorphose commence chez la planula nageante, qui après fixation va former une galette à partir de laquelle un polype primaire se développe après croissance du stolon et développement des tentacules. J'ai observé un profil apoptotique polarisé (marquage TUNEL, fragmentation nucléaire détectée en marquage DAPI), caractérisé par une généralisation de l'apoptose dans l'ensemble de l'endoderme durant la phase de nage de la larve en métamorphose. Dans ce contexte apoptotique, au niveau de l'endoderme, j'ai pu mettre en évidence : 1) de la prolifération (marquage EdU), 2) un maintien des cellules souches *i-cells* (hybridation *in situ*), et 3) la migration potentielle des nématocytes (marquage phalloïdine) suggérant leur différenciation.

La présence de ces comportements cellulaires dans un même contexte spatio-temporel nécessite vraisemblablement un haut degré de coordination et de communication. En raison de la capacité potentielle des cellules en apoptoses à modifier leur environnement cellulaire en lien avec une fonction constructrice, l'apoptose tient une place sans doute fondamentale dans le déroulement de la métamorphose.

Au vu de l'ensemble de ces données, *Clytia hemisphaerica* est un nouveau modèle biologique de choix pour étudier les rôles morphogénétiques de l'apoptose.

III.2. Perspectives

Il est possible de détecter l'apoptose par marquage TUNEL ou encore en observant la fragmentation nucléaire par marquage DAPI. Cependant, pour confirmer de façon certaine qu'il s'agit bien de ce type de mort cellulaire, d'autres vérifications doivent être effectuées. Une approche par microscopie électronique (Kerr *et al.*, 1972) permettrait une identification certaine des caractéristiques morphologiques de l'apoptose.

De plus, la présence de caspases actives, caractéristiques moléculaires de l'apoptose, au cours de la métamorphose de *Clytia hemisphaerica*, peut être testée par une approche par Western-Blot (WB), qui permet de détecter les caspases actives.

Des travaux ont également montré que le clivage de PARP (poly-ADP-ribose polymérase) est caspase-dépendant (Sallmann *et al.*, 1997), faisant de la recherche de la protéine PARP sous sa forme clivée par WB un indicateur classiquement utilisé pour évaluer l'activité des caspases, ce qui pourrait être réalisé chez *Clytia hemisphaerica*.

L'analyse du transcriptome disponible de *Clytia hemisphaerica* permettrait de détecter d'éventuels acteurs apoptotiques, tels que des caspases ou des membres de la famille *Bcl*-2. En réalisant des BLAST réciproques sur le(s) transcriptome(s) de *Clytia* (à partir des caspases de *Homo sapiens*), j'ai détecté **deux séquences similaires à celles des vertébrés possédant chacune un domaine P20 avec le site actif QACQ, ainsi qu'un domaine P10.** Les similarités de séquences couplées avec ces caractéristiques propres aux caspases suggèrent que ce soient deux caspases <u>exécutrices potentielles</u> (absence de pro-domaine long). Ce résultat confirme l'expression de caspases chez *Clytia hemisphaerica*. La réalisation d'hybridations *in situ* à partir de sondes spécifiques des ARNm de ces gènes permettrait de déterminer leur profil d'expression potentiel au cours de la métamorphose.

L'identification de caspases chez *Clytia hemisphaerica* donne l'opportunité de réaliser des analyses phylogénétiques afin d'identifier les relations d'orthologies avec les caspases des autres espèces de cnidaires modèles tels que *Hydra*, *Hydractinia* ou encore *Acropora*, afin d'étudier l'évolution de cette famille multigénique chez les cnidaires. En tant que groupe-frère des bilatériens, la compréhension de la signalisation apoptotique chez les cnidaires pourrait apporter des connaissances cruciales pour comprendre l'évolution de l'apoptose à l'échelle des métazoaires

Afin d'étudier les rôles morphogénétiques de l'apoptose durant la métamorphose, observer les impacts d'une exposition des larves à des inhibiteurs de caspases pour en évaluer les effets serait fondamental. Cela permettrait de vérifier notamment si l'induction de la prolifération ou de la migration sont (ou non) caspase-dépendant. J'ai initié de tels travaux en utilisant du Z-VAD-Fmk mais pour l'instant sans succès. Malheureusement, le Z-VAD-Fmk est suspendu dans du DMSO, dont la toxicité sur les planulas provoque une mort cellulaire massive même à faible concentration (0.1µL de DMSO / mL). En effet, outre la désintégration de certaines larves, les survivantes, après exposition, présentait un marquage TUNEL positif pour tous les noyaux de l'ensemble des cellules de l'ectoderme, en opposition au profil polarisé (apoptose localisée au pôle aboral de l'ectoderme) que j'ai caractérisé en condition physiologique. Le même problème apparaît si l'inhibiteur est suspendu en éthanol 100 %, et mes expérimentations pour diminuer la quantité de solvant utilisé n'ont pas permis de résoudre ce problème. Par conséquent, **il serait nécessaire de rechercher des inhibiteurs dont le solvant serait sans conséquences sur la physiologie des larves.**

De la même manière que chez *Ciona intestinalis*, le profil apoptotique de *Clytia hemisphaercia* est polarisé puisque l'apoptose dans l'endoderme semble se propager du pôle oral vers le pôle aboral, et elle n'est localisée qu'au pôle aboral dans l'ectoderme. Or, l'expression de certains gènes de « patterning » présente également un profil polarisé dans la larve planula, y compris au cours de la métamorphose. C'est le cas notamment de Che-*wnt3* dont l'expression déterminée par hybridation *in situ* chez des planulas en métamorphose en phase de nage montre une localisation ectodermique sur les deux tiers oral de la larve. Autrement dit, **Che-***wnt3* **est exprimé dans l'ectoderme là où il n'y a pas d'apoptose**. Comme chez *Ciona intestinalis*, un lien potentiel entre la polarité de la planula et le profil apoptotique existe probablement et doit être exploré. En effet, et de manière intéressante, il a été montré que les gènes de la famille *Wnt* peuvent jouer le rôle de facteurs de survie (Chen *et al., 2001*), ce qui pourrait expliquer l'absence d'apoptose dans l'ectoderme où Che-*wnt3* est localisé. La micro-injection (technique mise en place et utilisée avec succès chez *Clytia hemisphaerica*) d'un morpholino **Che-***wnt3* afin de provoquer la perte de fonction de ce gène serait un bon moyen pour déterminer sa fonction au cours de la métamorphose.
CHAPITRE II

La régression caudale chez Ciona intestinalis

Au cours de la métamorphose, la régression caudale qui affecte la larve de cione est caractérisée par des **événements polarisés** suivant l'axe antéro-postérieur (A-P) :

- une vague d'apoptose (Chambon et al., 2002),

- un déplacement des cellules germinales primordiales PGC (Shirae *et al.*, 2006, Krasovec *et al.*, soumis)

- une migration de la tige d'endoderme caudal (Kawai et al., 2015).

Ces événements font de la régression caudale un contexte biologique idéal pour étudier la fonction constructive de l'apoptose (FCA) puisque la migration des PGC et de la tige d'endoderme on lieu de façon concomitante à une apoptose prédictible spatialement et temporellement. Afin d'étudier les impacts potentiels de la vague d'apoptose sur la migration, il est nécessaire de pouvoir contrôler sa propagation. En effet, la mise en place d'un outil accélérant ou ralentissant la vague d'apoptose a l'avantage de ne pas bloquer la régression caudale (contrairement à une exposition au pan-caspases inhibiteur Z-VAD-Fmk) et permet de suivre l'évolution des tissus. Étant donné que la vague apoptotique est polarisée, il est possible d'émettre l'hypothèse que la polarité au sein de la queue et les acteurs qui la déterminent spatialement et temporellement soient associés à la régulation de l'apoptose. Autrement dit, c'est l'identité postérieure des cellules épidermiques au bout de la queue qui permettrait le déclenchement de la vague d'apoptose. Sa propagation pourrait dépendre d'un changement de l'identité selon l'axe A-P sur l'ensemble de la queue, provoquant sa propagation en vague polarisée. Les gènes *Hox* sont des candidats privilégiés étant donné qu'ils sont classiquement

impliqués dans la mise en place de la polarité de l'axe A-P (Pearson *et al.*, 2005). Ils sont également exprimés pour certains au niveau de l'épiderme de la nageoire caudale chez la larve de cione (*i.e.* Ci-*hox-12* en partie postérieure) (Ikuta *et al.*, 2004). C'est pour ces raisons que je vais introduire les gènes *Hox* dans cette partie et discuter de la polarité de la larve de *Ciona intestinalis* et des acteurs qui la détermine, afin de pouvoir faire suivre de manière logique le deuxième article de cette thèse, actuellement soumis à *Developmental Biology* et en attente de décision.

I. LE RÔLE DES GÈNES HOX DANS LE DÉVELOPPEMENT

I.1 Les gènes Hox chez Ciona

Les gènes *Hox* sont classiquement impliqués dans l'établissement de l'axe antéropostérieur (A-P) chez la plupart des métazoaires durant l'embryogenèse (Hueber & Lohmann, 2008 ; Lewis, 1978 ; Veraksa *et al.*, 2000). Cette fonction est mise en évidence dans la mise en place d'organes fondamentaux tels que le système nerveux central ou la formation des vertèbres chez les vertébrés par exemple (Altmann & Brivanlou, 2001; Koussoulakos, 2004 ; Mallo *et al.*, 2010). Le séquençage du génome de *Ciona* a permis l'identification de 9 gènes *Hox* (Dehal *et al.*, 2002 ; Spagnulo *et al.*, 2003), nommés Ci-*hox*.

I.1.a. Caractérisation des gènes Ci-hox

Après leur identification (Gionti *et al.*, 1998 ; Spagnulo *et al.*, 2003 ; Keys *et al.*, 2004), la position des neuf Ci-*hox* sur les chromosomes a été établie par hybridation *in situ* fluorescente (FISH – *fluorescent* in situ *hybridization*) (Ikuta *et al.*, 2004). Ils sont répartis sur deux chromosomes, le chromosome 1 pour Ci-*hox-1* à -6 et Ci-*hox10*, et le chromosome 2 pour Ci-*hox-12* et -*13* (Ikuta *et al.*, 2004). L'absence des Ci-*hox7*, -8, -9 et -*11* et leur présence chez les vertébrés et l'amphioxus indiquent que la cione a subi des pertes (Duboule *et al.*, 2007 ; Ikuta & Saiga, 2005) (Figure 56). Cependant, la nomination des gènes Ci-*hox* s'est faite par comparaison avec les autres chordés, et en fonction d'une composition en gènes *Hox* ancestrale établie comme la plus parcimonieuse (Ikuta *et al.*, 2004 ; Ikuta & Saiga, 2005). L'absence d'analyses phylogénétiques pour déterminer les relations d'orthologies entre les gènes *Hox* fait que ces dénominations doivent être prises avec prudence, même si, d'après les patrons d'expressions (Ikuta *et al.*, 2004),

l'identification des gènes Hox antérieurs et postérieurs est cohérente.



Figure 56: Proposition de scénario évolutif des gènes *Hox*. En comparaison des autres deutérostomiens, *Ciona* présente un nombre moins important de gènes, probablement en raison de pertes secondaires. Les Ci-*hox* sont également répartis sur deux chromosomes (formant deux clusters). Contrairement aux vertébrés, il n'y a pas de duplication des clusters. Modifiée d'après Ikuta & Saiga *et al.*, 2005.

La « clusterisation » (le regroupement des gènes sur un même chromosome) des *Hox* chez les vertébrés, l'oursin et l'amphioxus permet d'émettre l'hypothèse d'une « clusterisation » ancestrale chez les deutérostomiens (Ikuta & Saiga, 2005 ; Duboule *et al.*, 2007). En raison de la répartition des Ci-*hox* sur deux chromosomes, il a été proposé comme hypothèse que la « clusterisation » a été perdue chez la cione (Ikuta *et al.*, 2004). L'urochordé *Oikopleura dioica* a également perdu la « clusterisation » des *Hox* (répartition sur 5 chromosomes) (Duboule *et al.*, 2007) impliquant une perte possible à l'échelle des urochordés. De plus, la drosophile a, comme la cione, deux chromosomes portant les gènes *Hox* (Duboule *et al.*, 2007). Il est donc nécessaire de se documenter sur davantage d'organismes pour évaluer le patron ancestral avant de statuer.

I.1.b. Les rôles des Ci-hox dans l'embryogenèse et la métamorphose

Le profil d'expression des gènes Ci-*hox* a été caractérisé à différents stades de développement (du stade ETB au stade larve nageante pour la plupart) grâce à des hybridations *in situ* réalisées par Ikuta *et al.*, 2004. La carte d'expression a ensuite pu être établie à partir de ces profils, et montre une colinéarité avec des territoires d'expression spécifiques et des gradients le long de l'axe A-P (Figure 57). Des expériences de perte de fonction par des approches utilisant soit le TALEN soit des morpholinos ont été effectuées pour identifier leurs fonctions (Kawai *et al.*, 2015, Ikuta *et al.*, 2010).



Figure 57: Colinéarité dans l'expression des gènes *Hox* chez la larve de *Ciona intestinalis* au cours du développement. A, système nerveux (tube neural). B, tube digestif. as, siphon exhalent (*atrial siphon*); es, œsophage (*esophagus*); est, endostyle (*endostyle*); gi, branchies (*gills*); ht, cœur (*heart*); int, intestin (*intestine*); nc, tube neural (*nerve cord*); nk, cou (*neck*); nx, complexe neural (*neural complex*); os, siphon inhalant (*oral siphon*); st, estomac (*stomach*); sv, vésicule sensorielle (*sensory vesicle*); yg, ganglion viscéral (*visceral ganglion*).

Ci-hox1 est exprimé au niveau de l'épiderme et du système nerveux central (CNS – *Central Nervous System*), au niveau du tronc et de la partie antérieure de la queue depuis le stade ETB jusqu'au stade larve nageante (Figure 58). La perte de fonction de Ci-*hox1* n'a aucun effet visible pendant l'embryogenèse chez les larves. Par contre, Ci-*hox1* est nécessaire pour la formation du tube digestif chez le juvénile (Ikuta *et al.*, 2004, 2010).

Ci-*hox2* est exprimé dans la larve nageante au niveau du tronc (Figure 58). La perte de fonction ne provoque aucun phénotype (Ikuta *et al.*, 2004, 2010).

Ci-*hox3* est présent au niveau de l'épiderme antérieur de la queue, chez la larve LTB puis nageante (Figure 58). Pour ce gène, la perte de fonction n'a pas non plus d'effet (Ikuta *et al.*, 2004, 2010).

Ci-*hox4* est localisé dans le tronc, uniquement dans la larve en cours de développement du stade neurula au stade LTB (Figure 58). Aucun problème n'a été détecté après une perte de fonction (Ikuta *et al.*, 2004, 2010).

Ci-*hox5* est exprimé au niveau du CNS dans la partie antérieure de la queue du stade ETB à la larve nageante (Figure 58). Comme pour les Ci-*hox* précédants, les pertes de fonction ne semblent pas avoir d'effet sur le développement (Ikuta *et al.*, 2004, 2010).

Ci-*hox6* n'est pas exprimé d'après l'absence de marquage par hybridation *in situ*, du stade neurula au stade juvénile (Ikuta *et al.*, 2004).

Ci-hox10 montre une expression dans la larve MTB, au niveau du CNS antérieur et de l'endoderme caudal (*endodermal strand*) (Figure 58). L'expression s'étend dans tout l'endoderme caudal au cours du développement, et est toujours présente dans la larve nageante (Ikuta *et al.*, 2004). Ce gène est nécessaire pour le développement des neurones GABAergic du ganglion viscéral dorsal (Ikuta *et al.*, 2010). Il intervient également dans la migration de l'endoderme caudal, puisqu'une perte de fonction bloque cette migration. En effet il semblerait que Ci-*hox10* provoque un réarrangement de la structure de la matrice extra-cellulaire en régulant l'expression du gène du collagène IX, permettant la migration de l'endoderme (Kawai *et al.*, 2015).

Ci-hox12 est le seul gène Ci-hox exprimé à l'extrémité postérieure de l'animal, depuis le stade neurula jusqu'au stade LTB (Figure 58). Avant l'éclosion, Ci-hox12 est présent au bout de la queue au niveau de l'épiderme. Chez le juvénile, une expression est mise en évidence au niveau du tube digestif. Ci-hox12 contrôle l'élongation de la queue et le développement des cellules épidermiques postérieures (Ikuta et al., 2010). La perte de fonction par Morpholino provoque un raccourcissement de la queue des embryons, dont l'extrémité est anormalement arrondie et non pas pointue (roundedended tail). Ces travaux mettent aussi en évidence que les cellules épidermiques postérieures sont de forme cuboïdes et non pas allongée (columnar) (Ikuta et al., 2010). De plus, le tube nerveux est plus court, et n'atteint pas l'extrémité postérieure de la queue du têtard en développement. Par ailleurs, Ci-wnt5 et Ci-fgf8/17/18, qui sont exprimés en condition normale à l'extrémité postérieure de la queue, voient leurs expressions réduites chez les embryons injectés avec un Morpholino dirigé contre Ci-hox12, suggérant que Ci-hox12 participe à la formation de la queue en contrôlant ces gènes cibles Ikuta et al., 2010. Ce rôle est confirmé par le fait que la co-injection du Morpholino et d'ARNs synthétiques Ci-hox12 donne un têtard normal. Grâce à des expériences d'inhibition de la voie FGF, les auteurs montrent que Ci-fgf8/17/18 contrôle l'élongation de la queue et Ci-wnt5 la forme des cellules épidermiques. Ci-hox12 semble donc avoir une fonction fondamentale dans le développement de la partie postérieure de la queue de la larve au cours du développement (Kawai et al., 2015).

Ci-hox13 n'est exprimé qu'au stade juvénile, dans le tube digestif (Figure 58) (Ikuta & Saiga, 2005).



Figure 58: Profils d'expression des gènes Ci-*hox* chez *Ciona intestinalis* au cours du développement et chez le juvénile obtenus par hybridation *in situ*. Les profils ont été observés de l'œuf à la larve nageante. Seuls les stades et les gènes pour lesquels un signal est détecté sont présentés (raison pour laquelle Ci-*hox6* a été supprimé). Barre d'échelle : 100µm. Stade: N, neurula; eTB, mTB et ITB correspondent aux stade de Hotta *et al.*, 2007 ; Lv, larva; Jv, juvenile. Modifiée d'après Ikuta *et al.*, 2004.

L'expression globale de ces gènes (Figure 57-58) montre une colinéarité, avec des gènes antérieurs et d'autres postérieurs, et des territoires d'expressions spécifiques qui peuvent se recouper. Le gène postérieur Ci-*hox12* est fondamental dans le développement de l'extrémité postérieur de la queue, qui de façon intéressante est le point de départ de la vague apoptotique polarisée. Ce gène est donc un bon candidat pour développer une approche permettant d'impacter sur le déroulement de la régression caudale au travers de la vague d'apoptose polarisée.

I.2. L'établissement de la polarité de l'épiderme de la nageoire dépend de deux gradients antagonistes

La mise en place de l'axe A-P chez les chordés dépend de gradients antagonistes faisant intervenir plusieurs voies de régulation, dont les voies FGF et RA (Diez Del Corral., 2003 - 2004). Chez l'ascidie *Ciona intestinalis*, il a été mis en évidence la participation de ces voies dans la polarisation de l'épiderme de la larve au cours du développement embryonnaire (Pasini *et al.*, 2012). Cette étude montre aussi l'intervention de ces voies dans la mise en place des neurones épidermiques caudaux (CENs – *Caudal Epidermal Neurons*) faisant partie du système nerveux périphérique (PNS - *Peripheral Nervous System*) et répartis le long de la queue. Les CENs présentent deux populations (l'une antérieure et l'autre postérieure) ayant chacune un type de morphologie, indiquant une identité différente le long de l'axe A-P (*patterning*), qui est contrôlée par les gradients antagonistes RA et FGF (Pasini *et al.*, 2012).

Le gradient RA est présent dans la partie antérieure de la queue, alors que le gradient FGF est présent dans la partie postérieure (Pasini *et al.*, 2012) (Figure 59). L'utilisation de différents traitements sur des larves en développement a montré que la perturbation de ces gradients impacte l'expression de certains gènes impliqués dans la polarité A-P. L'ajout de RA provoque une expression dans l'ensemble de l'épiderme de Ci-*hox1*, et inhibe celle de Ci-*hox12* (Figure 60). Au contraire, l'ajout de DEAB, inhibiteur de la synthèse de RA, bloque l'expression de Ci-*hox1*. L'ajout de FGF réduit l'expression de Ci-*hox1*, mais étend celle de Ci-*hox12*. Ces résultats montrent qu'il est possible de perturber l'expression des gènes Ci-*hox* en jouant sur ces gradients. Étant donné que Ci-*hox12* est le seul gène exprimé en partie postérieure de la queue, j'ai testé si la perturbation de l'expression caudale.

Grâce à ces traitements, il m'a été possible de perturber l'expression de Ci-*hox12* chez des larves nageantes et fixées, et de montrer un effet sur le déroulement de la régression caudale. Je dispose ainsi d'un outil idéal permettant de moduler l'apoptose (par ralentissement ou accélération de la propagation de la vague) et la migration des PGC.



Figure 59: Vue ventrale schématique d'un embryon en développement de *Ciona intestinalis* illustrant que les territoires ou les voies RA (bleu), FGF/MAPK (vert) et Wnt canonique (Orange) sont actives au niveau de l'épiderme. Modifiée d'après Pasini *et al.*, 2012.



Figure 60: Contrôle du « patterning » de l'épiderme de la queue de la larve de cione par les gradients antagonistes RA / FGF. (**A-D**): Larves témoins avec l'expression de Ci-*hox1* (**A**), Ci-*hox12* (**B**), Ci-*wnt5* (**C**) et Ci-*fgf8/17/18* (**D**). Ci-*hox1* est exprimé dans le premier tiers antérieur de la queue, Ci-*hox12* dans la partie postérieure, Ci-*wnt5* à l'extrémité postérieure de la queue et Ci-*fgf8/17/18* dans 2-4 cellules de l'extrémité postérieure. (**E-H**): Traitements par ajout de 1.5 mM de RA. L'expression de Ci-*hox1* devient ubiquitaire (**E**), alors que celles de Ci-*hox12* (**F**) et Ci-*wnt5* (**G**) sont réduites ou absentes. L'expression de Ci-*fgf8/17/18* (**H**) n'est pas modifiée. (**I-L**): L'inhibition de la synthèse de RA par traitement avec 150 mM de DEAB conduit à une diminution d'expression de Ci-*hox1* expression (**I**), alors que les expressions de Ci-*hox12* (**J**), Ci-*wnt5* (**K**) et Ci-*fgf8/17/18* (**L**) ne changent pas. (**M-P**): Le traitement à 100 ng/ml de bFGF réduit l'expression de Ci-*hox1* (**M**) tandis que celles de Ci-*hox12* (**N**) et Ci-*wnt5* (**O**) s'étendent. L'expression de Ci-*fgf8/17/18* (**P**) n'est pas affectée. Modifiée d'après Pasini *et al.*, 2012.

Ci-hox12 tail gradient manages the apoptotic wave and the primordial germ

cells movement during tail regression in Ciona larva

Krasovec, G¹., Robine, K¹., Quéinnec, E¹., Karaiskou, A^{2*}., and Chambon J.P.^{1*§}

¹ Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine, IBPS, Evolution Paris Seine, Paris F-75252 Cedex 05, France.

² Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris F-75012, France.

* The last two authors equally contributed to this work.

[§]Corresponding author: jean-philippe.chambon@upmc.fr

Abstract

At the onset of the *Ciona intestinalis* metamorphosis the first event is the tail regression, characterized by a contraction, an apoptotic wave and Primordial Germ Cells movement (PGC). All these cell behaviors originate from the posterior tail tip and progress to the anterior. Interestingly, earlier in *Ciona* development, the antero-posterior (A/P) patterning of the tailbud epidermis depends on two antagonist gradients, respectively FGF/MAPK at the posterior and retinoic acid (RA) at the anterior part of the tail. Fundamental genes such as Ci-*hox1*, Ci-*hox12* and Ci-*wnt5*, classically involved in chordates A/P polarity, are controlled by these gradients and exhibit specific expression profiles in the tail epidermis. In this study, we first confirmed by video-microscopy that tail regression depends on a postero-anterior wave of a caspase-dependent apoptosis coupled with a contraction event. Concomitantly an apoptotic-dependent postero-anterior movement of PGC was observed for the first time. Unexpectedly, we observed that expression of the posterior hox gene, Ci-*hox12*, is extended from a posterior localization to the entire tail epidermis as the larvae progress from the swimming period to the settlement stage. Finally when we disturbed FGF/MAPK or RA gradients we observed strong effects on Ci-*hox12* expression pattern coupled with modulation on

the subsequent tail regression dynamics. In these conditions the PGC movement was also affected and was strongly correlated to the caspase-dependent apoptotic wave speed. These results support the idea that Ci-*hox12* expression in larval tail manages the postero-anterior cell behavior during the subsequent tail regression.

Keywords

Metamorphosis; Tail polarity; Tail regression; Apoptosis; *Ci-Hox-12*; Primordial Germ Cells; Ascidians; Caspases.

Introduction

The tail regression of the ascidians *Ciona intestinalis* and *Ciona robusta* represents an exciting model to investigate *in vivo* apoptosis regulation in a developmental context, since apoptosis was reported as the driving force of this process (Chambon *et al.*, 2002, both species were used in this work but only referred as *C. intestinalis*). *Ciona* has a biphasic life cycle: a pelagic larva and a benthic adult. After fertilization, a rapid embryogenesis generates a tadpole-like body composed of an anterior trunk and a posterior tail, consisting of approximately 2600 cells (Satoh, 1994). After hatching, the tadpole larvae swim for a few hours, then adhere to a substrate and finally metamorphose into a juvenile that is a sessile filter feeder. One of the first and most dramatic events is the regression of the larval tail followed by morphological changes such as rotation of visceral organs or expansion of the branchial basket (reviewed in Karaiskou *et al.*, 2014).

During embryogenesis, in the elongating tail of the *Ciona* tailbud, a Retinoic Acid (RA) signaling pathway was reported, active at the anterior tail epidermis, while the FGF/MAPK and Wnt canonical pathways are restricted to the posterior tail epidermis (Pasini *et al.*, 2012). In the *Ciona* embryo, the antagonism of these two signalling pathways is required to control the antero-posterior patterning of the tail epidermis through spatial *Ci-hox1* and Ci-*hox12* expression (Pasini *et al.*, 2012). In *Ciona*, nine *hox* genes (Ci-*hox*) have been identified: Ci-*hox1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12* and *13* (Dehal *et al.*, 2002; Spagnuolo *et al.*, 2003). *Ci-hox1hox1* to 5 and *Ci-hox10* and *12*

seem to be involved in regionalization of the larval Central Nervous System (CNS). Moreover, at the tailbud stage, *Ci-hox12* which is expressed in the end of the posterior nerve cord and epidermis plays a pivotal role in tail development by maintaining the posterior expression of Ci-*fgf8/17/18* and Ci-*wnt5* (Ikuta *et al.*, 2004, 2010). Inversely, *Ci-hox1* was detected at the early tailbud stage in the epidermis and the central nervous system (CNS) around the junction of the trunk (head of the ascidian tadpole) and the tail (Ikuta *et al.*, 2004). The FGF/MAPK signals promote Ci-*hox12* expression at the posterior-most third part of the tail while the opposite RA gradient inhibits it at the anterior-most third part and promote Ci-*hox1* expression in this region (Pasini *et al.*, 2012). Although these expression patterns seem to be maintained in the subsequent developmental stage, the hatching-larvae, (Ikuta *et al.*, 2004), data concerning Ci-*hox1* and Ci-*hox12* expression in the swimming-, competent and metamorphic larvae have yet to be reported.

After the hatching stage and to reach the metamorphic changes successfully, a swimminglarva needs to acquire metamorphic competence during the larval period. This has been shown to occur in response to a wide variety of external but also endogenous signals (Jackson and Strathmann, 1981; Cloney, 1982; Davidson and Swalla, 2002; Jackson *et al.*, 2002; review in Karaiskou *et al.*, 2014). In addition, we previously demonstrated that the phosphorylation of the MAP Kinases (MAPK) ERK and JNK, respectively in papillae and central nervous system, occur during the competency acquisition period, and initiate a MAPK-dependent-gene-network essential for the tail regression triggering pathway (Chambon *et al.*, 2007). When the larva becomes competent, they are able to adhere to substrates with their adhesive papillae located at the anteriormost part of the trunk (Cloney, 1982; Degnan, 2001).

Once adhesion occurs, *Ciona* initiates tail regression. Previous studies clearly demonstrated that adhesion is a compulsory stage for this metamorphic event (Matsunobu and Sasakura, 2015; Nakayama *et al.*, 2009). Indeed, when the adhesive papillae are removed ("papillae-cut" experiment), the adhesion stage is abolished and the metamorphic larvae exhibits some features of metamorphosis but never the tail regression event (Nakayama *et al.*, 2009). The first tail regression

mechanism proposed was based on the contractile properties of either epithelial or notochord cells that would trigger tail shortening (Cloney, 1982). More recently, we and others clearly showed that most of the tail cell types die by apoptosis (Chambon *et al.*, 2002, Tarralo and Sordino, 2004; Jeffery, 2002). This apoptotic cell death affects the majority, if not all, of the epidermal cells of the tail, muscle cells and at least the posterior-most notochord cells (Chambon *et al.*, 2002). The most remarkable feature of this apoptotic-dependent tail regression is its posterior origin and anterior propagation. We observed that apoptosis started at the tail tip and, through TUNEL temporal analyses, we showed that it continued up to the tail base (Chambon *et al.*, 2002). In other words, in *Ciona*, one of the main mechanisms of tail regression is apoptosis which is tightly controlled and even predetermined in time and space along the postero-anterior axis of the larva tail; this is a unique feature among chordate organisms (reviewed in Karaiskou *et al.*, 2014). Significantly, *C. robusta* genome shares with vertebrates major central actors of the cell death machinery (Takada *et al.*, 2005; Terajima *et al.*, 2003; Weill, 2005, referred as *C. intestinalis* in these publications).

As it seems to be the case in others metazoan, the achievement of apoptosis in *Ciona* occurs through the activation of cysteine proteases, termed initiator/executive caspases (Chambon *et al.*, 2002). The vertebrate apoptotic machinery is substantially similar to that of non-vertebrates, although the apoptotic network is much more complex with the presence of at least two signaling pathways: the "mitochondrial" (intrinsic) and the "cell death receptor" (extrinsic) pathways (reviewed in Meier *et al.*, 2000). In both cases, the activation of initiator caspases (9, 8 or 10) triggers a set of executioner caspases (3, 6 and 7 in mammals), which are strongly regulated through many layers of activators and inhibitors (Hernandez-Martinez *et al.*, 2009).

It was previously suggested that the caspases machinery diversity in *Ciona* is similar to that found in vertebrates (Baghdiguian *et al.*, 2007). Moreover, the activation of *Ciona* caspases is essential for caudal cells elimination during tail regression (Chambon *et al.*, 2002 and 2007). Among the caudal cells, Primordial Germs Cells (PGC) are localized at the posterior part of the tail in the swimming larvae (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006). During tail regression, the PGC seem to escape from the apoptotic cell death fate. Indeed, they persist throughout tail regression with a localization described as always anterior to the regressing tail tip, suggesting a PGC movement (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006). However, no evidence was reported to associate the posterior to anterior PGC movement toward the trunk and the tail regression mechanism.

These previous observations highlight the finely orchestrated cellular events, *i.e.* contraction, apoptosis and PGC movement, in a posterior to anterior manner. However, they do not provide insights into the accurate mechanism of the sequential "destruction" of a large part of the tail tissues and the associated cellular events.

In this work, we investigated the potential role of the tail epidermis patterning in the polarisation and coordination of these events. We first observed an extension toward the anterior of the posterior Ci-hox12 expression. This "posteriorization" of the tail seems to be a prerequisite step for apoptosis progression. Moreover we observed that the postero-anterior PGC movement depends on the caspase-dependent apoptotic wave progression suggesting a regulation of immediate environment cell behaviors (PGC movement) by apoptotic cells themselves (*i.e.* wave of apoptosis), that we interpreted as which an evidence of a new function of apoptosis. In addition, we were able to integrate contraction, apoptosis and PGC movement in the tail regression process.

Material and Methods

Biological material

Adult *Ciona intestinalis* were collected on the field by the Biological Sample Collection Service of the Station Biologique de Roscoff (Britain, France) and maintained in 35% salinity in artificial sea water (ASW) at 18°C in the UMR7138 Evolution Paris Seine laboratory (Sorbonne University, Paris, France). Oocytes and sperms were obtained by dissection of gonoducts and cross-fertilizations were performed in plastic Petri dishes. Embryos were cultured at 18°C in 0.2 µm filtered ASW with 0.1 M Hepes (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #H4034). Tadpole larvae hatched at approximately 18 hours post-fertilization (18 hpf), then, they swim freely for more than 5 hours.

The onset of metamorphosis started at approximately 2 hours after fixation (26 hpf) when larvae adhered to plastic dishes and stop moving.

Fixation and storage

Larvae were fixed in 3.7% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature (RT) for immuno-fluorescent labelling. Larvae used for *in situ* hybridization are fixed 2 hours at 4°C in MEM-PFA (4% paraformaldehyde, 0.1 M MOPS pH7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM MgSO4, 0.05% Tween-20). After fixation larvae are washed three times and dehydrated through a graded series of ethanol and stock in 100% ethanol at -20°C. Rehydratation is made by successive wash series of ethanol/PBS solution to a full PBS final solution. Larvae used for TUNEL labelling were rehydrated same days of fixation and storage at 4°C.

TUNEL and VASA labelling

Terminal Transferase-Mediated dUTP Nick-End labelling Assay (TUNEL) was performed with the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Fluorescein, #11684795910) according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics Corporation/ Roche Applied Science). Larvae were permeabilized in phosphate-buffered saline (PBS) + 0.2% Triton for 30 min. and wash in PBS three times during 15 min. Biological samples were incubated 75 min. at 37°C in a humidification chamber with 125 μ L of reaction mix (Enzyme solution plus *Label solution*). Negative control was incubated in *Label solution* only. As positive control, some larvae were incubated in DNAse I solution (1 mg/ml) (Fermentas, #EN0521) for 20 min. at RT before adding the reaction mix. After reaction larvae were washed three times in PBS for 15 min.

After PBS baths larvae were incubated for the night at 4°C in PBS 0.1% Tween-20 (PBT) and 3% BSA (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #A7906) with primary anti-Vasa antibody CiVH designed and gifted by Maki Shirae-Kurabayashi (2006) and diluted at 1/500 in blocking buffer. Larvae were washed three time in PBS + 0.05% Tween-20 for 1 hour, and incubated 2 hours at RT in PBT + 3%

BSA solution with Hoecht (1/1000) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #H6024) and secondary antibody Alexa Fluor 568 goat anti-guinea pig (1/10 000) (Invitrogen, #A11075). Samples were finally washed in PBS three times for 15 min.

In situ hybridization

For larvae without treatment, eggs were dechorionated after insemination by immersion in ASW containing 1% sodium thioglycolate (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #T0632) and 0.05% Pronase E (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #P5147). Then, the eggs were washed (washing must be done before first division) and placed in 1.5 % low gelling agar-coated (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #A9414) Petri dishes in ASW 0.5 % bovin serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #A7906).

For the larvae used to perform *in situ* hybridization of Ci-*hox12* in treatment conditions, we decide to remove the tunic manually. Tunic was removed from the entire tail and not the trunk because of the risk to cleave the larvae in two parts. Huge larvae samples must be dissected to obtain a final number of 10 and 20 larvae available because of the very delicate procedure. This procedure allows us to obtain ISH whole-mount larvae without strong background generated by the tunic and an accurate labelling interpretable without doubt. Indeed tunic is a strong problem when working with larvae after hatching in opposite with developing larvae.

Larvae were fixed 2 hours at 4°C in MEM-PFA (4% paraformaldehyde, 0.1 M MOPS pH7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, and 2 mM MgSO4, 0.05% Tween-20). After fixation larvae were washed three times and dehydrated through a graded series of ethanol/PBS baths and stocked in 100% ethanol at -20°C. Rehydratation was made by successive washes of ethanol/PBS solution to a full PBS final solution. Hybridization was made according to the protocol of Christiaen *et al.* (2009) except that any methanol was used but only ethanol. Probes were tested on LTB to control that the labelling was in accordance with pattern data from ANISEED before larva processing

Pharmacological treatments

Swimming larvae were distributed in small Petri dishes after hatching. If number of larvae allows it, three biological replicates were made for each treatment. When 70% of larvae were fixed on the dish and when some of them were not moving anymore - this mean that metamorphosis will begin soon - supernatant was discarded and replaced by filtered ASW containing each pharmacological treatments or dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #D8418) as control. Drugs were stored in DMSO at -20°C. Pan-caspases inhibitor benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #V116) was used at final concentration in ASW at 10 µM. SU5402 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #SML0443), retinoic acid (RA) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #R2526) and diethylaminobenzaldehyde (DEAB) (Sigma, #D86256) were used at final concentration of 10µM, 1.5µM and 150µM respectively. U0126 (Promega, V1121) and SP600125 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #S5567) were used at final concentration of 6 µM and 10µM respectively. For each treatment, same quantity of DMSO was added in all controls.

Measures and statistics

The beginning of the tail regression in the control allows determining the T0 of the experiments. From this starting point, proportions of larvae with tail regression in progress were calculated at different time (2, 4 and 6 hours) in each treatment. PGCs relative position was evaluated by calculated the ratio (Z) between the posterior length behind the PGC (PL) and the anterior length in front of the PGC (AL). Differences between all conditions (DMSO, DEAB, RA, SU) were evaluated by Kruskal-Wallis analysis. Differences between control and each condition were made by Wilcoxon Mann Whitney test. Effects were considered significant with a p-value < 0.05. All statistics were done using tools implemented in the stats package of the software R 2.14.1 from the R Development Core Team (2011) (R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available: www.R-project.org.

Microscopy and Image acquisition

Images are taken with a confocal Leica TCS SP5 microscope and an Olympus BX61 microscope. All images are analysis with ImageJ 1.46a-1 software version or the LAS AF Lite. Images with DAPI labelling were treated by ImageJ filters to well delimit the nuclei contour (Process-Filters-Convolver). Macroscopes used for the *in vivo* video is a whole *Ciona* larvae were mounted on glass slides and coverslipped with Mowiol 4-88 (Calbiochem, #475904). Images were acquired with a BX61 microscope (Olympus) and a confocal TCS SP5 microscope (Leica). Sequential optic sections were acquired in z-stacks and processed using ImageJ 1.46a-1 software version or the LAS AF Lite.

In vivo macroscopy

Fixed larvae were harvest and bathed in ASW contained the live fluorescent marker of caspase activity Cell Event Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen, #C10423) for a final concentration of 20μM during 2 hours. They were asleep in ASW containing 200mg/L of ethyl-3-aminobenzoate methylsulfonate (MS222)(Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #E10521) and then immobilized in ASW containing 0.25% agarose low melting (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, #A9414) in Ibidi μ-Slide VI 0.1 (Biovalley, #80661). Temperature is maintained at 18°C. Images were taken with a Macro-Apotome (ZEISS).

Papilla cut experiments

Papilla cut was realized according to the protocol of Nakayama et al. (2009).

Results

1. <u>Polarized Caspases activation, apoptosis onset and PGCs movement are major postero-</u> anterior events during tail regression. Among the executive caspases, we previously reported that a Caspase 3-like protein expressed and activated during *Ciona* metamorphosis (Chambon *et al.*, 2002). In order to follow *in vivo* activation of this executive caspase (Ci-Caspase 3) in *Ciona intestinalis*, prior to tail regression, we combined time-lapse microscopy and activated caspases-labelling using a fluorescent marker ("caspase event 3/7") (video 1 and video 2). For this approach, we embedded live larvae in low gelling agarose in order to limit tail movement during the time-lapse acquisition. Using this experimental approach, we were able to detect, at the onset of the metamorphosis a discrete shortening (about 10 % of total length) that occurs at the posterior tail tip just before caspases' activation (video 1 and 2). This process is followed by a wave of fluorescent labelling which progresses along the tail from the posterior tip to the trunk. This event corresponds to executive caspases activation starting at the tail extremity and propagating towards the tail basis.

Given the physical constraint imposed to the larvae in this approach (see materials and methods for details) due to low gelling agarose, we assume to slow down the tail regression process. We always observed the same specific time sequence of events, and the co-existence of two distinct temporal phenomena: a physical contraction followed by a caspase–dependent apoptosis during the tail regression. Moreover, this time lapse approach confirms that both, contraction and apoptosis start at the most posterior part of the tail, with apoptosis extending to the anterior part and seemingly affecting the vast majority of the caudal cells.

PGC labelling using a polyclonal antibody anti-Vasa (a well-known PGC marker) coupled with a TUNEL staining, confirms that PGC movement co-occurs with tail regression (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2007) (Fig. 1). However, as shown in Figure 1 (red arrow), Vasa labelling precedes the TUNEL staining. This result implies that PGC move towards the trunk while being just at the anterior front of the apoptotic wave meaning that the relative position of PGC is maintained just anterior to the apoptosis wave during the full process. Taken together these results suggest that all three processes (contraction, apoptosis and PGC movement) are coordinated during tail regression

in a posterior to anterior manner and we focused on the last two for the rest of the study.

2. PGC movement is coordinated with the cellular events of the tail regression

The PGC movement described above could be either independent but concomitant to the apoptotic regression wave or participate in a coordinated process.

The onset of metamorphosis comes after the acquisition of competence and is correlated with the definitive adhesion of the larvae to the substratum (Matsunobu and Sasakura, 2015; Nakayama et al., 2009). Adhesion is followed by ERK and JNK-dependent-genes-network activation that controls apoptosis initiation at the tip of the tail (Chambon et al., 2007). To abolish each of these initiating steps we either prevented adhesion of the larva by the well-described "papilla cut" experiment (Nakayama et al., 2009) or by ERK or JNK inhibition (using their respective selective inhibitors, U0126 and SP600125) that block the subsequent genes network onset and subsequently tail regression (Chambon et al., 2007) (Fig. 2). We combined a double Vasa/TUNEL labelling to these treatments to analyse PGC localization at a time when PGC reach the trunk in the control larvae (Fig. 2 .A2). In both experiments (Fig. 2.B1-B2) we observed that the onset of the tail regression has been abolished as expected and that the PGC are still localized at the posterior of the tail similarly what they are in the swimming larvae, meaning that the PGC movement depends on the onset of the tail regression event. Our results suggest that the apoptotic wave and the PGC movement depend on the same initial molecular cue switching on the tail regression but they do not inform us on their interdependence. In order to investigate this process, we used a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-Fmk) that abolishes apoptotic dependent tail regression by blocking caspases activation (Chambon et al., 2002) (Fig. 2.B3). Once again, the onset of the tail regression has been abolished as apoptosis has been inhibited and in a more interesting way the PGC were still localized at the posterior part of the tail as in the swimming larvae, meaning that the PGC movement depends on the apoptotic events.

These results highlight that PGC movement is a cellular mechanism that belongs to the

metamorphic sequence, and should be coordinated with other postero-anterior cellular behaviors such as apoptosis. Moreover, the chemical inhibition of caspases blocks PGC movement supporting the fact that PGC movement depends on apoptosis progression.

3. <u>Ci-hox12</u> expression is extended in all the tail prior metamorphosis

It has been reported that in the *Ciona* embryo, antero-posterior polarity of the tail epidermis depends on the antagonism of the RA and FGF/MAPK (Pasini *et al.*, 2012). Furthermore, Ci-*hox12* role has been established into maintaining the posterior expression of Ci-*fgf8* and Ci-*wnt5* and it has been proven essential for the tail tip formation (Pasini *et al.*, 2012 and Sasakura Y., 6th Tunicate meeting, Naples, 2013). We hypothesized that these early events could be linked to polarized mechanisms of the tail regression (*i.e.* apoptotic wave, PGCs movement) but also to other molecular cues (see Fig. 2). We investigated the expression profiles of these genes involved in tail epidermis patterning in *Ciona* (Ci-*hox1*, Ci-*wnt5 and* Ci-*hox12*) from the swimming larva to the settlement stage (Fig. 3 and Fig. 4).

No difference was observed for Ci-*wnt5* between swimming and fixed stage where it is expressed at the tip of the tail and in some ventral cells (red arrows, Fig.3B) as reported in previous studies (Pasini *et al.*, 2012). Ci-*hox1* is expressed at the anterior part of the tail, the dorsal trunk border (*i.e.* probably the visceral ganglia) and at the posterior part of the trunk in swimming larva and seems to be restricted and extended in the trunk in fixed larva. These observations are in accordance with previous observations (Pasini *et al.*, 2012; Ikuta *et al.*, 2004).

A contrasted situation was observed for Ci-*hox12* expression between swimming and fixed larvae (Fig. 4).

Ci-*hox12* expression was reported in very posterior part of the tail during embryogenesis, at the mid-tailbud and tailbud stage (Pasini *et al.*, 2012). In swimming larva Ci-*hox12* expression is

extended to the posterior half of the tail (Fig. 4.A), and is present throughout the tail at the fixation stage (Fig. 4.B). The strong background in the trunk observed at this stage is due to a thick larval tunic, often producing high unspecific signal observed in this region.

Given this latter result, Ci-*hox12* gene expression evolving from the posterior tail towards anterior, is compatible with the role of potential molecular cue driving postero-anterior caspase-dependent-apoptosis and PGC movement.

4. <u>Ci-hox12</u> expression manages the apoptotic wave and the associated PGCs movement

In order to test this potential role of Ci-*hox12*, we modulated it expression. We therefore treated fixed larvae with either RA, DEAB (inhibitor of RA synthesis) or SU (inhibitor of the FGF pathway) and followed Ci-*hox12* expression (Fig. 5.A).

As it was reported previously, RA and SU treatment strongly affected Ci-*hox12* expression (Pasini *et al.*, 2012). In fixed treated larvae we were not able to detect Ci-*hox12* expression in the tail by *in situ* hybridization (Fig. 5.A, lower panel). On the contrary when we treated fixed larvae with DEAB, we observed a stronger expression in all the tail in comparison with the DMSO control (Fig. 5.A, upper panel). The strong background observed at this stage, due to a thick larval tunic obliged us manually removed tunic from the larva tail prior to *in situ* hybridization.

We took advantage of this Ci-*hox12* expression modulation to observe the effect on tail regression speed (Fig. 5.B). We compared percentage of larvae with tail regression in progress at different time points between all treatments and notice differences between them (chi-squared = 47.1334, df = 4, p-value = 1.43e-09). Same observation was made between the control and each treatment. We clearly observed that tail regression occurs faster with DEAB (W = 365, p-value = 1.312e-06) treatment compared with the control (DMSO), and an opposite situation occurred with RA (W = 102.5, p-value = 0.0001272) and SU (W = 78.5, p-value = 0.02101) treatment in which the process is slowly at all time. This result strongly correlates Ci-*hox12* expression in tail with the subsequent tail regression process during metamorphosis.

We next analysed apoptosis in treated larva (DEAB, RA or SU), at the time where apoptosis should be initiated at the tip of the tail in control (DMSO). Interestingly, apoptosis already started to propagate as a wave in DEAB-treated larva while apoptosis was not initiated in SU- and RA-treated larva (Fig. 5.C). Since apoptosis was reported as the driving force of the tail regression, this result confirms the previous result on the positive effect of Ci-*hox12* expression on apoptotic-dependent tail regression in *Ciona*.

Finally, we measured the relative position of the PGC during the tail regression at different time (Fig. 5.D1-D2) and found no differences between all treatments (chi-squared = 1.5787, df = 3, p-value = 0.6642). We found same results when we compared each treatment with the control (DMSO), respectively DEAB (W = 2127, p-value = 0.5243), RA (W = 1468, p-value = 0.8656) and SU (W = 453, p-value = 0.2939). It clearly appeared that PGC move towards the trunk in accordance with the progression of apoptosis and the associated tail regression. In other words, when apoptosis propagated faster, the PGC reached the trunk faster, and on the opposite when apoptosis propagated slower, the PGC moved slower. Moreover, we combined DEAB with pancaspase inhibitor (Z-VAD-Fmk) treatment (Supplemental Fig. A, B) and we confirmed that PGC movement is controlled by the apoptotic wave.

Taken together these results offer an obvious link between the expression pattern of Ci-*hox12* in the larva tail and the subsequent tail regression during metamorphosis. Moreover, Ci-*hox12* influences the dynamic of the tail regression by controlling all the cell behaviors involved in this process such as apoptosis and PGC movement. These data demonstrated that the extension of Ci-*hox12* from the posterior part to anterior part of the tail in the swimming and fixed larvae is an excellent compulsory cue candidate for *Ciona* tail regression.

Discussion

This study focuses on the cellular and molecular mechanisms that drive the tail regression during *Ciona* metamorphosis.

Contraction and apoptosis act together during tail regression

We previously reported that apoptotic cell death can be considered as the driving force of the tail regression during metamorphosis (Chambon *et al.*, 2002, 2007), since when apoptosis is abolished, with pan-caspase inhibitors, the tail regression is inhibited (Chambon *et al.*, 2002 and this study). However, here we observed a first step of contraction (video 1 and 2), that concerns the tip of the tail, and which precedes caspase activation and results in a shortening process. It would be interesting to address if this contraction is a prerequisite to the initiation of apoptosis in this same region.

In addition, another noteworthy observation from our videomicroscopy approach is that the tail continues the shortening process during the progression of both the PGCs and the apoptosis wave towards the trunk (Fig. 1). It will be challenging to figure out how this process occurs in an apoptotic context (video 1 and 2). Indeed, executive caspases activation is well known to highly disorganize the actin cytoskeleton and global cellular organization (reviewed in Vaculova and Zhivotovsky, 2008), which is not compatible with contractile events, as the one suggested by Cloney (1982) proposing that the epidermal layer moves and pushes the other tissues toward the trunk during tail regression. Another puzzling fact is that we never observed any cell corpse clearance of the dead cells during tail regression, which is considered as the ultimate event of this physiological cell death. In *Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster* and in vertebrates the engulfment step leads to the recycling of the dead cells energy (reviewed in Klöditz, *et al.*, 2017). In *Ciona*, the shortening process could provide an excellent way to bring the dead cells toward the trunk and it would be tempting to hypothesize that the dead cells are engulfed by trunk cells in order to provide energy for the subsequent events of the metamorphosis.

Ci-hox12 controls progression of apoptosis during tail regression

In the present study, we show that Ci-*hox12* expression is extended to all the tail just before the tail regression onset (Fig. 4). Moreover this extension is required for the tail regression and manages the apoptosis progression and the associated PGC movement (Fig. 5.A-B-C). Hoxregulated apoptosis was already reported in metazoans (review in Domsch *et al.*, 2015). In vertebrates, during the limb development interdigital cell death is indirectly regulated by HoxA13 (Knosp *et al.*, 2004). In *Drosophila*, the transcriptional activation of the pro-apoptotic protein Rpr by the *hox* gene *dfd* is required for the formation of the maxillary/mandibular segment boundary (Lohmann *et al.*, 2002). Moreover, the posterior Hox gene *abd-A* activates pro-apoptotic genes in drosophila neuroblasts that die by apoptosis, *abd-A* in a cell autonomous manner (Bello *et al.*, 2003). This work also suggests a regulation of apoptosis by Hox genes at a specific developmental timing. An interesting mechanism would be a transcriptional control of pro-apoptotic proteins at the same time we observed Ci-*hox12* expression extended throughout the tail. Interestingly, Ci-*caspase 3* is expressed during the swimming period in the larva and activated during *Ciona* metamorphosis, but is undetectable at the hatching stage (Chambon *et al.*, 2002).

However, the major function of *hox* genes is the patterning of the A-P axis during metazoan embryogenesis (Hueber and Lohmann, 2008). In vertebrates, *Hox* genes establish the pattern of the central nervous system (CNS) and vertebrae along the A-P axis (Altmann and Brivanlou, 2001; Koussoulakos, 2004; Mallo, 2010). In *Ciona*, a limited role for 3 out of 9 *hox* genes was reported during larval development, Ci-*hox1* is required for anterior gut formation (via regulation of larval, atrial siphon primordium formation (Sasakura*et al*, 2012); Ci-*hox10* is involved during development of GABAergic neurons in the dorsal visceral ganglion and Ci-*hox12* play important roles in tail development and morphology (Ikuta *et al.*, 2010). Interestingly, Ci-*hox10* is also required later to promote migration of endodermal strand in swimming larvae (Kawai *et al.*, 2015). This process is regulated indirectly by Ci-*hox10* by reconstructing the extracellular matrix through direct regulation of the expression of the collagen type IX (Kawai *et al.*, 2015). In other words, Ci-*hox10* promotes endodermal strand cells survival by indirectly regulating their migration. In our case, we could hypothesize that Ci-*hox12* promotes PGC survival by indirectly regulating their movement through apoptosis regulation.

Apoptosis manages PGC movement in a caspase-dependent manner

During tail regression, one of the emerging issues of our investigation is the compelling fact that groups of cells in the tail will survive, as it is the case of the endodermal strand and the Primordial Germ Cells (PGC) (Kawai et al., 2015, this study). Furthermore, these two latter groups of cells achieve survival, at least partially, by a posterior to anterior migration, which takes place in swimming larva (Kawai et al., 2015) or at the onset of tail regression (our unpublished observation) for the endodermal strand, or during tail regression for the PGC (Fig. 1). For the later ones, apoptotic cells in ascidians tail could act as a driving force for their migration towards the trunk. Indeed, when apoptosis is inhibited with a pan-caspase inhibitor, PGC stay in the posterior part of the tail (Fig. 2.B3), which implies that caspases activity is necessary for this movement. Moreover, taking advantage of the polarization of this event, we successfully modulated the dynamics, *i.e.* the speed, of the apoptotic wave using chemical treatments that perturb tail polarity (Fig. 5). We observed that the speed of PGC migration positively correlates with the speed of the apoptotic wave toward the trunk (Fig. 5C, 5D). Taken together these results strongly suggest an apoptosisdependent-PGC movement toward the trunk. Apoptosis-dependent cell migration was already reported in several vertebrate systems. During mouse development, it was suggested that migration of olfactory sensory neuron (OSNs) is mediated by caspase activity. In these cells the cleavage of a membrane-anchored member of the semaphorin family of guidance proteins, Sema7A, is correlated to Caspase 3 activation. Caspase 3 KO or its upstream regulators Apaf-1 or Caspase 9 affect axonal path finding, synapse formation and maturation status in the olfactory bulb (Ohsawa et al., 2010). During tail regeneration in *Xenopus laevis* tadpole, when apoptosis is abolished, a mis-patterning of axons is observed, suggesting an apoptotic dependent axon guidance mechanism (Tseng et al., 2007). It is tempting to hypothesize that apoptotic cells in the regressing *Ciona* tail may provide molecular cues that activate PGC movement.

Studies on metamorphosis in insects and amphibians, where some larval structures are eliminated by apoptosis (Tata, 1966; Lockshin and Williams, 1965) and the work on embryogenesis in some Bilateria, where apoptosis sculpts developing structures by elimination of supernumerary cells, led to the definition of the "sculpting model" or "carving model". Apoptosis is a genetically controlled programmed cell death mechanism, considered crucial for metazoan development because of its function in cell removal, described for example during digit formation in tetrapod vertebrates (Hernández-Martínez et al., 2009; review in Suzanne and Steller, 2013). During the last decade, research from different systems increased evidences on apoptotic-dependent cell behaviors and tissue remodeling during morphogenesis, in addition to the destructive function. It was reported that caspase-dependent signals of dying cells towards their vicinity participate in morphogenetic processes. This signaling can be mediated by: (i) exerting mechanical forces inside the tissues that participate actively to tissue (re)modeling (Monier et al., 2015; Toyama et al., 2008; Yamaguchi and Miura2013); (ii) caspase-dependent secreting molecular cues that affect the behaviors of the surrounding cells inducing cell proliferation (Vritz et al., 2015; Chera et al., 2009,., 2011; Huh et al., 2004; Tseng et al., 2007; Li et al., 2010), cell differentiation (Seipp et al., 2001), cell migration (Ohsawa et al., 2010; Tseng et al., 2007; Lauber et al., 2003; Gude et al., 2008), or promoting cell survival (Bilak et al., 2014).

Tail regression of *Ciona* represents an excellent model to address the molecular relationship between apoptotic cells and PGC movement.

Conclusion

The results of this work taken with previous observations on ascidian metamorphosis (reviewed in Karaiskou *et al.*, 2014) lead us to propose a model (Fig. 6) in which the extension towards the anterior part of the tail of Ci*-hox12* expression is the first molecular event in the tail prior to the tail regression process. It will be now interesting to address the temporal coordination and the potential link between the molecular and cellular events from the swimming period to the apoptotic wave and

the PGC movement. However, it is also crucial to distinguish common from distinguished mechanisms between the two Ciona species, intestinalis and *robusta*. Indeed, we have already identified some interesting differences in the time sequence of events. For example Ci-*hox10*-dependent endodermal strand migration was reported during the swimming period in *C. robusta* (Kawaï *et al.*, 2014), we observed this migration process at the onset of tail regression (unpublished data) in *C. intestinalis*. The comparison of the time sequence of metamorphic events between these two phylogenetically closed species should provide clues on the evolution of the metamorphic process.

Legends

<u>Video 1 and video 2:</u> <u>Contraction at the tip of the tail is followed by a wave of executive caspase</u> <u>activation during the tail regression process.</u>

Caspase activation is visualized by green fluorescence.

Figure 1: PGCs move simultaneously with the apoptotic wave propagation during *Ciona* tail regression.

Double labelling VASA (red) and TUNEL (green) labelling was performed with DAPI (blue) in fixed larvae during tail regression. During the temporal sequence of tail regression, TUNEL positive cells are localized posteriorly of the PGCs and synchronously move towards the trunk. The apparent modification of the PGC row organization is essentially due to different orientation of the larvae at the time of the picture acquisition and may not reflect the in vivo exact position with an exception for the last picture. Indeed we often observed this apparent grouping of PGC at the end of tail regression.





Figure 2: PGC movement is a part of the tail regression and is controlled by apoptosis Double VASA (red) and TUNEL (green) labelling was performed with DAPI (blue) in four conditions, respectively in B1 (papilla cut – no adhesion), B2 (treated with 6uM U0126 – MAPK kinase inhibitor; or 10 μ M SP600125 – JNK inhibition, in ASW) and B3 (treated with 10 μ M Z-VAD-Fmk – pan-caspases inhibitor in ASW). (A) Control situation: After fixation swimming larvae activate the ERK and JNK dependent genes network, the apoptotic tail regression occurs, and finally larvae lose their tail but PGC are present in the trunk. (B) Inhibition of the apoptotic wave by three independent approaches, blocks tail regression and PGC movement. Because of papilla removal, adhesion is impossible and the first step of metamorphosis does not occur (B1). ERK and JNK inhibition blocks the gene network leading to the tail regression initiation (B2). Caspases activity inhibition by Z-VAD-Fmk, inhibits tail regression (B3).

Figure 2



Figure 3: Ci-hox1 and Ci-wnt5 expression pattern in larva resembles the embryo pattern.

In situ hybridization on swimming larvae and fixed larvae (pre-metamorphic) of Ci-*hox1* and Ci-*wnt5*. (A) Ci-*hox1* is expressed at the same localization at both stages, at the visceral ganglion and the endoderm in the trunk. (B) Ci-*wnt5* is expressed at the same localization at both stages, at the posterior extremity of the tail, and at some cells localized ventrally in the endodermal strand (red arrows).

Figure 4: Ci-hox12 expression is extended to all the tail prior to the tail regression

In situ hybridization of Ci-*hox12* on larvae at different time: hatching larvae; swimming larvae and fixed larvae. (A) Ci-*hox12* is expressed at the posterior part of the tail. Before tail regression initiation, expression propagates throughout the tail and finally to the whole tail. (B) Quantification in percentage of the surface of labelling (from the tip toward the base) observed in the tail for each time of observation (*i.e.* hatching, swimming and fixed larvae).





Figure 5: *Ci-hox12* expression manages tail shortening event by controlling propagation of apoptosis and PGC movement

Effects of treatments on tail regression events. (A) In situ hybridization of Ci-hox12 expression in the pre-metamorphic larvae tail after DMSO (control), DEAB (RA inhibitor, 150 µM), RA or SU (FGF inhibitors, used at 10 and 1, 5 µM respectively) treatments. The expression gradient is present in control and in DEAB treated larvae (where the labelling is even stronger) in opposite with RA and SU where no labelling is observed. Total absence of tunic on the trunk made the signal observation more obvious. (B) Percentage of larvae with tail regression in progress for the different treatments. The frequency is calculated over time for each condition. By statistical tests (Wilcoxon Mann Whitney test), we show that proportion of larvae with tail regression in progress is statistically different between each treatment and the control. More than 6000 larvae from 23 independent fertilizations were used. (C) TUNEL labelling (red) with DAPI (green) in larva treated with DEAB, SU or RA (concentrations as mentioned above)at the time of initiation of apoptosis in control (as in DMSO). As expected, more TUNEL positive cells are present in DEAB conditions in opposite with RA and SU where not TUNEL positive cells are present. (D) To evaluate the relative position of the PGCs, we have calculated the ratio (Z) between the posterior length behind the PGC (PL) on the anterior length in front of the PGC (AL). The ratio is calculated for each treatment on larvae with tail regression in progress, allowing us to obtain the PGCs relative position and an estimation of their movement speed. Differences between all conditions (Kruskall Wallis test), and between the control and each treatment (Wilcoxon Mann Whitney test) are not significant. There is no effect of the drugs, involving that the PGCs move at same speed as the tail regression. These calculations were performed on 207 larvae from 5 independent fertilizations.

Figure 5



Effects of treatments on the tail regression speed





D1 Evaluation of the PGCs position



AL, anterior lenght of the PGCs ; PL, posterior length of the PGCs.

D2

В

Relative position of the PGCs



Figure 6: Schematic representation of the temporal sequence of polarized events that happened during the tail regression.

During the swimming period, the Ci-*hox12* expression extends from the posterior part of the tail to the trunk. In fixed larvae, caspases activation wave starts at the tip of the tail and propagates as a wave to the anterior part. Consequently an apoptotic polarized wave occurs and triggers the tail regression. Caspase-dependent apoptosis promotes the PGC migration which moves at the same time to reach the trunk (Black arrow) In *C. intestinalis* the question of endodermal migration promoted by apoptotic cells is still open (black arrow dash-line).

<u>Supplementary data: DEAB effect on tail regression and PGC movement depends on</u> <u>apoptosis regulation</u>

Comparison between DEAB (RA inhibitor, 150 μ M) and DEAB + Z-VAD-Fmk (pan-caspases inhibitor, 10 μ m) exposition effect on apoptotic wave and PGCs movement. (A) Double labelling VASA (red) and TUNEL (green) with DAPI (blue). Apoptotic wave and tail regression are delayed when Z-VAD is added with the DEAB. In all cases, PGCs move only if TUNEL positive cells are present. This shows that their movement depends on apoptosis but not on DEAB treatment. (B) Proportion of larvae between DEAB, DMSO and DEAB+Z-VAD-Fmk show that tail regression occurs faster with DEAB. When Z-VAD is added with the DEAB, tail regression occurs as in the control (DMSO). Statistical differences exist between control and DEAB treatment, but not between control and DEAB+Z6VAD (Wilcoxon Mann Whitney test).



Acknowledgements

We acknowledge Dr Shirae-Kurabayashi for the kindly gift of the Ci-Vasa antibody; J.F. Gilles (plateforme imagerie, IBPS/Sorbonne Université) for assistance in time-lapse acquisition with Zeiss macro-apoptome. We also acknowledge the "André Picard" network community, S. Darras (Observatoire océanologique de Banyuls sur Mer/ Sorbonne Université) C. Vesque (IBPS/ Sorbonne université) and J. Gros (Institut Pasteur) for helpful discussion.

Funding

The work of G.K. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Education, research and Innovation, by "André Picard" fellowship "Projet collaboratif exploratoire".

The present study was supported by Fondation ARC Grant to JP. Chambon and "Emergence UPMC" grant attributed to JP. Chambon and A. Karaiskou.
Supplemental figure



References

- Altmann CR, Brivanlou AH. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. Int. Rev. Cytol.; 203:447-82.
- Baghdiguian S, Martinand-Mari C, Mangeat P. (2007). Using Ciona to study developmental programmed cell death. Semin. Cancer Biol. 17:147–153.
- Bello BC, Hirth F, Gould AP. (2003). A pulse of the Drosophila Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis Neuron. Jan 23; 37(2):209-19.
- Bilak, A., Uyetake, L., and Su, TT. (2014). Dying cells protect survivors from radiationinduced cell death in Drosophila. PLoS Genet. Mar 27; 10(3):e100422
- Chambon JP, Soule J, Pomies P, Fort P, Sahuquet A, Alexandre D, Mangeat PH, Baghdiguian S. (2002). Tail regression in Ciona intestinalis (Protochordate) involved a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. Development 129: 3105–3114.
- Chambon JP, Nakayama A, Takamura K, McDougall A, Satoh N. (2007). ERK- and JNKsignalling regulate gene networks that stimulate metamorphosis and apoptosis in tail tissue of ascidian tadpoles. Development 134:1203–1219.
- Chera, S., Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, Martinou JC, Galliot B.. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. Dev. Cell. 17, 279-289.
- Chera, S., Ghila L, Wenger Y, Galliot B. (2011). Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration. Dev. Growth. Differ. 53(2):186-201.
- 9. Christiaen L, Wagner E, Shi W, Levine M. (2009). Whole-mount in situ hybridization on sea squirt (Ciona intestinalis) embryos. Cold Spring Harb. Protoc. Dec; 2009 (12).
- Cloney, R. A. (1982). Ascidian larvae and the events of metamorphosis. Am. Zool. 22,817 -826.

- 11. Davidson, B. and Swalla, B. J. (2002). A molecular analysis of ascidian metamorphosis reveals activation of an innate immune response. Development 129, 4739 -4751.
- 12. Degnan BM, Souter D, Degnan SM, Long SC. (1997). Induction of metamorphosis with potassium ions requires development of competence and an anterior signaling center in the ascidian Herdmania momus. Dev. Genes Evol. 206:370–376.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson,
 B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M. et al. (2002). The draft genome of Ciona intestinalis: insights into chordate and vertebrate origins. Science 298, 2157 -2167.
- 14. Domsch K, Papagiannouli F, Lohmann I. (2015). The HOX-Apoptosis Regulatory Interplay in Development and Disease. Curr. Top. Dev. Biol. 114:121-58.
- 15. Gude, DR., Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S.. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphin-gosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. FASEB J. 22(8):2629-38.
- 16. Huh, JR., Guo, M., and Hay, BA. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the Drosophila wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. Curr. Biol. 27;14(14):1262-6.
- Ikuta T, Yoshida N, Satoh N, Saiga H. (2004). Ciona intestinalis Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Oct 19; 101(42):15118-23.
- 18. Ikuta T, Satoh N, Saiga H. (2010). Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian Ciona intestinalis. Development May; 137(9):1505-13.
- Jackson, G. A. and Strathmann, R. R. (1981). Larval mortality from offshore mixing as a link beween precompetent and competent period of development. Am. Nat. 118, 16-25.
- Jackson D, Leys SP, Hinman VF, Woods R, Lavin MF, Degnan BM. (2002). Ecological regulation of development: Induction of marine invertebrate metamorphosis. Int. J. Dev. Biol. 46:679–686.

- 21. Jeffery WR. (2002). Programmed cell death in the ascidian embryo: Modulation by FoxA5 and Manx and roles in the evolution of larval development. Mech. Dev. 118:111–124.
- 22. Hernández-Martínez R, Castro-Obregón S, Covarrubias (2009). Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. Development 136(21):3669-78.
- 23. Hueber SD¹, Lohmann I . (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age Bioessays Oct; 30(10):965-79.
- 24. Karaiskou A, Swalla BJ, Sasakura Y, Chambon JP. (2015). Metamorphosis in solitary ascidians. Genesis Jan; 53(1):34-47.
- 25. Kawai N, Ogura Y, Ikuta T, Saiga H, Hamada M, Sakuma T, Yamamoto T, Satoh N, Sasakura Y. (2015).Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. Dev. Biol. Jul 1; 403(1):43-56.
- 26. Klöditz K, Chen YZ, Xue D, Fadeel B (2017). Programmed cell clearance: From nematodes to humans. Biochem Biophys Res Commun. Jan 15;482(3):491-497.
- 27. Knosp WM, Scott V, Bächinger HP, Stadler HS. (2004). HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. Development Sep; 131(18):4581-92.
- Koussoulakos S. (2004). Vertebrate limb development: from Harrison's limb disk transplantations to targeted disruption of Hox genes. Anat. Embryol. (Berl). Dec;209(2):93-105.
- Lauber, K. Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell 13;113(6):717-30.
- 30. Li, F. Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY. (2010). Apoptotic cells

activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. Sci. Signal. 23; 3(110):ra13.

- 31. Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1965). Programmed cell-death-I Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyl Silkmoth. J. Insect. Phys. 11,123-133.
- 32. Lohmann I, McGinnis N, Bodmer M, McGinnis W. (2002). The Drosophila Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. Cell Aug 23; 110(4):457-66.
- 33. Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. Dev. Biol. Aug 1; 344(1):7-15.
- 34. Matsunobu S, Sasakura Y (2015). Time course for tail regression during metamorphosis of the ascidian Ciona intestinalis. Dev. Biol. Sep 1;405(1):71-81.
- 35. Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. Nature 407,769-801.
- 36. Monier B, Gettings M, Gay G, Mangeat T, Schott S, Guarner A, Suzanne M. (2015). Apicobasal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. Nature 12; 518(7538):245-8.
- 37. Nakayama-Ishimura A, Chambon JP, Horie T, Satoh N, Sasakura Y. (2009). Delineating metamorphic pathways in the ascidian Ciona intestinalis. Dev. Biol. 326:357–367.
- 38. Ohsawa, S., Hamada S, Kuida K, Yoshida H, Igaki T, Miura M. (2010). Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 27; 107(30):13366-71.
- 39. Pasini A, Amiel A, Rothbacher U, Roure A, Lemaire P, Darras S. (2006). Formation of the ascidian epidermal sensory neurons: insights into the origin of the chordate peripheral nervous system. PLoS Biol. 4:e225.3.
- 40. Satoh, N. (1994). In Developmental Biology of Ascidians (ed. P. W. Barlow, D. Bray, P. B. Green and J. M. W. Slack), pp. 234. Cambridge: Cambridge University Press.

- Seipp, S., Schmich, J., and Leitz, T. (2001). Apoptosis--a death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in Hydractina echinata (Cnidaria, Hydrozoa). Development 128, 4891-4898.
- 42. Shirae-Kurabayashi M, Nishikata T, Takamura K, Tanaka KJ, Nakamoto C, Nakamura A. (2006). Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in Ciona intestinalis. Development 133:2683–2693.
- 43. Spagnuolo A, Ristoratore F, Di Gregorio A, Aniello F, Branno M, Di Lauro R. (2003). Unusual number and genomic organization of Hox genes in the tunicate Ciona intestinalis. Gene. 8; 309(2):71-9.
- 44. Suzanne M, Steller H. (2013). Shaping organisms with apoptosis. Cell Death Differ. 20(5):669-75.
- 45. Takada N, Yamaguchi H, Shida K, Terajima D, Satou Y, Kasuya A, Satoh N, Satake M, Wang HG. (2005). The cell death machinery controlled by Bax and Bcl-XL is evolutionarily conserved in Ciona intestinalis. Apoptosis 10:1211–1220.
- 46. Tarallo R, Sordino P. (2004). Time course of programmed cell death in Ciona intestinalis in relation to mitoticactivity and MAPK signaling. Dev. Dyn. 230:251–262.
- 47. Tata, J.R. (1966). Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. Dev. Biol. 13, 77-94.
- 48. Terajima D, Shida K, Takada N, Kasuya A, Rokhsar D, Satoh N, Satake M, Wang HG. (2003). Identification of candidate genes encoding the core components of the cell death machinery in the Ciona intestinalis genome. Cell Death Differ. 10:749–753.
- 49. Toyama, Y. Peralta XG, Wells AR, Kiehart DP, Edwards GS. (2008). Apoptotic force and tissue dynamics during Drosophila embryogenesis. Science 321, 1683-1686.
- 50. Tseng, A.S, Adams DS, Qiu D, Koustubhan P, Levin M. (2007). Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in Xenopus laevis. Dev. Biol. 301, 62-69.
- 51. Vaculova A¹, Zhivotovsky B. (2008). Caspases: determination of their activities in apoptotic

cells. Methods Enzymol. 442:157-81.

- 52. Vritz, S., Reiter, S. and Galliot, B. (2014). Cell death: a program to regenerate. Curr. Top. Dev. Biol.108, 12-151.
- 53. Weill, M, Philips A, Chourrout D, Fort P. (2005). The caspase family in urochordates: Distinct evolutionary fates in ascidians and larvaceans. Biol. Cell 97:857–866.
- 54. Yamaguchi, Y. and Miura, M. (2013). How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. Cell Mol. Life Sci. 70(17):3171-86.

III. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE N°2

III.1. Synthèse

La régression caudale, dépendante d'une vague apoptotique polarisée, peut être bloquée par l'inhibiteur de caspases Z-VAD-Fmk. Une absence de mouvement des PGC a également été observée, impliquant que celui-ci est caspase-dépendant. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le mouvement des PGC dépend de l'apoptose, il a été nécessaire de développer un outil permettant de contrôler la vitesse de propagation de la vague apoptotique.

Les approches par hybridations *in situ* ont montré que l'expression de Ci-*hox12* s'étendait chez la larve nageante après éclosion, de l'extrémité postérieure vers la partie antérieure de la queue. Ainsi, chez la larve fixée, Ci-*hox12* est exprimé dans toute la queue de la larve. En réalisant les mêmes traitements que ceux effectués par Pasini *et al.* (2012), mais cette fois-ci sur la larve nageante, j'ai constaté qu'ils ont un impact fort sur l'expression de ce gène. L'expression de Ci-*hox12* est plus importante en présence de DEAB (inhibiteur de la synthèse de RA), en opposition aux conditions avec du RA et SU (inhibiteur de FGF), où celle-ci est inhibée. En raison de l'expression polarisée de Ci-*hox12* qui s'étend de la partie postérieure vers la partie antérieure de la queue, j'ai émis l'hypothèse que la modification de l'expression de Ci-*hox12* peut perturber le déroulement de la vague apoptotique.

Mes données statistiques sur le taux de larves fixées en régression montrent un effet de ces traitements sur le déroulement de la régression caudale. Cette dernière est plus rapide en présence de DEAB, et plus lente en présence de RA ou SU par rapport au témoin. Étant donné que la régression caudale dépend de la vague apoptotique polarisée, j'ai effectué des marquages TUNEL qui ont confirmé l'absence d'apoptose en présence de RA et SU par opposition au traitement DEAB où il y a davantage de cellules TUNEL positives que chez le témoin.

Par conséquent, les traitements me permettent de moduler l'expression de Ci-*hox12*, ce qui a pour conséquence, 1) la modulation de la vitesse de propagation de la vague apoptotique ce qui 2) impacte la vitesse de régression.

Ces traitements sont donc un outil permettant de moduler la vague apoptotique afin d'observer son impact sur les PGC. Les mesures effectuées sur les larves traitées pour obtenir la position relative des PGC montrent qu'elles bougent de façon corrélée avec la progression de la vague apoptotique. Par conséquent, ces données mettent en évidence que le mouvement des PGC dépend de la vague d'apoptose, et confirment l'hypothèse selon laquelle il y a de l'apoptose constructive chez *Ciona intestinalis* durant la régression caudale.

III.2. Des gènes Hox peuvent réguler l'apoptose

L'implication de gènes *Hox* dans la régulation de l'apoptose a été montrée chez les mammifères, la drosophile et le nématode (Figure 61 A) (Domsch *et al.*, 2015). C'est chez la drosophile que la régulation de l'apoptose par un gène *Hox* a été mise en évidence pour la première fois (Lohmann *et al.*, 2002). Lors de son développement, la séparation des lobes au niveau des maxillaires et mandibules nécessite de l'apoptose. Grâce à des approches par perte de fonction, il a été mis en évidence que l'apoptose était induite par le gène *Hox deformed (dfd)*. Celui-ci est un activateur direct de la transcription de *reaper (rpr)*, l'un des antagonistes des IAP (inhibiteur de la caspase initiatrice Dronc). La protéine Reaper permet la levée d'inhibition de Dronc, prérequis pour déclencher la voie apoptotique chez la drosophile (Lohmann *et al.*, 2002).

La protéine Hox Abd-B semble également jouer le rôle de facteur de transcription pour *reaper* dans la partie postérieure de la larve de drosophile, conduisant (comme pour Dfd) à un déclenchement de la signalisation apoptotique éliminant des neuroblastes le long de l'axe A-P (Figure 61 A) (Bello *et al.*, 2003).

Chez les tétrapodes, la digitation, apoptose-dépendante, est également régulée en partie par des gènes *Hox*. Nous avons vu que le déclenchement de l'apoptose lors de la digitation dépend d'un gradient de RA et de la présence de Bmp2/4 en partie distale du membre inhibant le facteur de survie Fgf8 (*cf.* Introduction, page 25). Or, il a été montré que les protéines Hoxa13 et Hoxb13 activent respectivement *bmp* et la voie RA (Figure 61 B) (Knosp *et al.,* 2004). Même si les Hox ne ciblent pas de façon directe des gènes apoptotiques, ils restent cruciaux pour leurs régulations.



Figure 61: Représentation du rôle des gènes *Hox* dans la régulation de l'apoptose au cours du développement de *D. melanogaster* (A) et *M. musculus* (B). A, Dfd active le IAPs antagoniste *rpr* permettant la levée d'inhibition de l'apoptose. L'apoptose permet la séparation des mandibules et maxillaires. En partie postérieure, Abd-B active *rpr*, provoquant de l'apoptose au niveau des neuroblastes. (B1), Hoxa13 et Hoxb13 activent respectivement les voies Bmp et RA, induisant de l'apoptose lors de la digitation. (B2), Au niveau du CNS de la souris, Hoxb1 (dans le cerveau) et Hoxc8 (dans la moelle épinière) bloquent l'apoptose et induisent une différenciation. Les flèches noires indiquent les activations par contrôle direct et les grises par contrôle indirect. Modifiée d'après Domsh *et al.*, 2015.

III.3. Perspectives

Α

L'article présenté précédemment se concentre sur la fonction constructive de l'apoptose au travers du mouvement des PGC, que nous pouvons marquer avec succès grâce à l'anticorps anti-Vasa. Cependant, un second tissu échappe à l'apoptose par une migration de la queue vers le tronc : l'endoderme caudal. Chez *Ciona robusta*, l'endoderme migre avant la régression caudale, ce qui a été mis en évidence dans des individus exprimant une GFP (Kaede) dans l'endoderme grâce à un promoteur spécifique (Kawai *et al.*, 2015). Chez *Ciona intestinalis* en revanche celui-ci migre au tout début de la régression caudale (résultats personnels non publiés). En utilisant la même approche que pour les PGC, j'ai calculé la longueur relative de l'endoderme caudal par rapport à la longueur totale de la queue lorsque je pouvais les mesurer grâce au marquage DAPI (Figure 62). Les valeurs obtenues ont été traitées statistiquement, et le même résultat que celui obtenu pour les PGC apparaît : la longueur relative de l'endoderme caudal ne change pas en fonction des traitements, et donc de la vitesse de la régression caudale (Figure 63). Par conséquent, nous avons également ici une corrélation entre migration et apoptose. Cependant, il faut rester prudent car, contrairement aux PGC pour lesquelles nous avons montré que le mouvement est caspase dépendant (traitement Z-VAD-Fmk), nous n'avons pas de résultats pour ce traitement concernant l'endoderme caudal.

Il serait d'ailleurs intéressant de regarder *in vivo*, grâce au protocole présenté dans l'article II, l'effet des traitements sur l'activation des caspases exécutrices (comme montré en vidéo 1 de l'article I). L'apoptose étant caspase-dépendante, il est possible de postuler que, en présence de RA et SU (donc blocage de la régression caudale), les caspases ne soient pas activées. Il faudra cependant le vérifier pour conforter ces résultats.

Le fait que Ci-*hox12* contrôle les événements de la régression caudale peut être confirmé grâce à une perte de fonction du gène. Nous savons qu'une perte de fonction de ce gène n'est pas létale, mais provoque des malformations dans l'épiderme caudal de la larve en développement. Observer le déroulement de la régression caudale chez des larves KO pour Ci-*hox12* est primordial pour confirmer les résultats obtenus dans ce travail.

Enfin, le fait qu'un gène *hox* intervient de façon directe sur la régulation de l'apoptose n'est pas en contradiction avec la littérature (Domsh *et al.*, 2015). Plusieurs études ont décrit des cas où des gènes *Hox* participent à sa régulation, notamment chez les vertébrés (Domsh *et al.*, 2015).

L'intervention de gènes *Hox* postérieurs dans la régulation de l'apoptose chez les vertébrés tétrapodes (Hoxa13 dans la digitation) (Knosp *et al.*, 2004) à travers un contrôle sur les gradients comme RA ou Bmp suggère qu'un tel mécanisme est possible chez la cione, d'autant plus que Ci*hox12* est un gène postérieur, comme Hoxa13 (Ikuta *et al.*, 2004 ; Duboule *et al.*, 2007). La régulation de l'apoptose par des gènes *Hox* également mise en évidence chez la drosophile (Abd-B) (Bello *et al.*, 2003) montre que cette fonction peut être présente chez plusieurs groupes d'animaux.



Figure 62: Mesure de la longueur relative de l'endoderme caudal par rapport à la longueur de la queue. Cette mesure est possible si l'endoderme est visible en marquage DAPI (vert). L'indice de longueur relative est z =longueur de l'endoderme / longueur de la queue.



Longueur relative de l'endoderme caudal

Figure 63: Boîtes à moustaches (*box plot*) illustrant la répartition des données entre les traitements pour la longueur relative de l'endoderme caudal. L'indice z n'est pas statistiquement différent entre l'ensemble des traitements (chi-squared = 6.221, df = 3, p-value = 0.1013), ni quand on compare chaque traitement avec le témoin, soit DEAB (W = 358, p-value = 0.2922), RA(W= 357, p-value = 0.9374) et SU (W = 413, p-value = 0.3982).

CHAPITRE III

Évolution des voies de signalisation apoptotiques

I. LES ACTEURS APOPTOTIQUES CHEZ CIONA

L'évolution des voies de signalisation apoptotiques est généralement vue à travers le prisme des organismes modèles mammaliens et ecdysozoaires (drosophile et nématode). J'ai préalablement souligné (*cf.* Introduction, page 80) la vision fréquemment gradiste ainsi que le consensus plus ou moins arbitraire qui en ont découlé dans la littérature, et qui ont conduit à affirmer la conservation de la voie de signalisation mitochondriale (intrinsèque) à grande échelle évolutive. Pourtant, cette voie offre de nombreuses différences chez les animaux, y compris entre les modèles « classiques » et, de ce fait, les relations évolutives entre les acteurs doivent être discutées de façon plus précise. Je vais dans cette partie me baser sur mes propres analyses phylogénétiques, indispensables pour discuter des relations d'orthologies des différents gènes qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Je vais, à travers ce travail, me focaliser sur la cione qui présente de nombreuses particularités au niveau de la machinerie apoptotique que je présenterai par la suite en guise d'introduction.

La version (en français) d'un article en préparation portant sur l'évolution de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale est finalement proposée. Pour terminer ce chapitre, je présenterai les données que j'ai obtenues et qui ont mises en évidence l'intervention de la voie de signalisation des récepteurs de mort (extrinsèque) au cours de la régression caudale de *ciona*.

La discussion d'une topologie (graphe/arbre résultant d'une analyse phylogénétique)

nécessite l'emploi de termes spécifiques. J'ai défini, dans l'introduction (*cf.* page 72), les termes « d'homologie, de paralogie et d'orthologie » mais aussi de « monophylie, paraphylie et polyphylie ». Il convient de garder à l'esprit ces définitions, indispensables pour la compréhension de cette partie.

Enfin, en raison de la confusion existante dans certains articles quant à la confusion entre *Ciona robusta* et *Ciona intestinalis*, et sachant que le génome disponible sur ANISEED est celui de *Ciona robusta*, je vais employer uniquement le nom de genre (*Ciona*) dans cette partie, afin de ne pas complexifier inutilement la lecture. La distinction entre les deux espèceS sera faite seulement en cas de nécéssité.

I.1. Identification des relations d'orthologies entre caspases

L'analyse phylogénétique est un prérequis indispensable pour pouvoir identifier les relations d'orthologies (c'est-à-dire résultant d'événements de spéciation) entre les gènes apoptotiques, permettant ensuite de discuter de l'évolution des voies de signalisation apoptotiques. Pour cette raison, j'ai réalisé un grand nombre d'analyses phylogénétiques de séquences protéiques de gènes à différentes échelles évolutives.

Au travers de ces analyses, plusieurs problèmes sont apparus, qu'il est nécessaire de présenter. De façon classique, lorsque l'on réalise une analyse phylogénétique, il est crucial de supprimer les sites trop variables dans l'alignement, car ces derniers ont perdu leur signal phylogénétique, et à défaut d'être informatifs, ils génèrent du « bruit de fond » dans l'analyse. Or, les caspases sont des protéines relativement courtes (en termes de séquences d'acides aminés (aa)), avec seulement deux domaines communs (P20 et P10) sur lesquels il est possible d'aligner les séquences, sachant qu'ils sont eux-mêmes relativement courts. Par conséquent, après l'exclusion des sites trop variables, l'alignement finalement obtenu est composé de 150 aa environ. Or, le nombre de séquences qu'il est possible d'analyser de façon pertinente avec une analyse phylogénétique est généralement proportionnel à la longueur de l'alignement des sites informatifs (autrement dit, à la quantité d'informations phylogénétiques disponibles). Classiquement, le nombre de séquences doit être idéalement inférieur au nombre de sites informatifs. La longueur relativement courte des séquences peut donc devenir problématique lorsque l'on s'intéresse, à l'échelle des métazoaires, à une famille multigénique avec de nombreux membres.

Mes premières analyses phylogénétiques, fondées sur un nombre de séquences supérieur à

100, ont donné des topologies avec des nœuds peu soutenus, trop sensibles au groupe externe, sensibles aux attractions de longues branches (regroupement artificiel de séquences plus divergentes que les autres) et des topologies difficiles à discuter car non cohérentes avec la phylogénie des espèces. Il s'est avéré fondamental de réaliser des analyses avec un ciblage pertinent en fonction de notre question, pour avoir des résultats utilisables et robustes. Je me suis donc concentré soit sur un groupe d'organismes restreint (*i.e.* deutérostomiens), soit des sous-groupes de caspases particulières, possédant toutes un même pro-domaine (i.e. Caspases-CARD). Cette dernière approche permet d'obtenir un alignement plus long car effectué à partir du pro-domaine commun en plus des domaines P20 et P10. Cependant, nous verrons que l'identification des pro-domaines se fait à partir de comparaisons avec les vertébrés, et que certains longs pro-domaines ne sont pas identifiables. Autrement dit, certaines caspases d'organismes non-vertébrés présentent de long pro-domaines (potentiellement DED ou bien CARD), cependant un scan de ces derniers (i.e. avec ScanProsite tool) ne permet pas d'en connaitre la nature. Cela est vraisemblablement dû au fait que les séquences de vertébrés servent de références, empêchant de reconnaitre les domaines trop divergents par rapport à ce groupe. Les caspases concernées ne sont donc pas utilisées dans mes analyses se focalisant sur un sous-groupe de caspases (*i.e.* Caspases-CARD).

I.1.a. Les caspases de Ciona

1) État de l'art sur les caspases de Ciona

Il a été mis en évidence 11 caspases chez *Ciona* par recherche des acteurs de la machinerie apoptotique réalisée à partir du génome de cette espèce (Terajima *et al.*, 2003). Des identifications ont été proposées en fonction des similarités de séquences avec trois « caspase 2 », une « caspase 8 », une « caspase 10 », deux « caspase 6 » et quatre « caspase 7 ».

Par la suite, sur la base de séquences protéiques, le nombre de caspases identifiées est passé à 17 (Weill *et al.*, 2005). Dans ce dernier travail, une analyse phylogénétique est proposée avec la méthode « neighbour-joining » (NJ). Cependant cette analyse ne présente pas de groupe externe et le soutien des nœuds est faible voire inexistant. De plus, les relations d'orthologies proposées sont basées sur une analyse ne comportant que deux espèces: la cione et l'homme. L'identification des caspases et des groupes est donc fortement biaisée. Il en résulte une absence de discussion sur les nœuds profonds, et les noms proposés pour les caspases de *Ciona* sont contradictoires. Par exemple, l'une d'elle est nommée « caspase-8-9 », alors que les caspases 8 et 9 des vertébrés n'ont pas les mêmes pro-domaines, qui sont respectivement un DED et un CARD.

Actuellement, la base de données ANISEED recense 12 caspases chez *Ciona*, nombre que mes analyses par BLAST réciproques, qui n'ont révélé aucune séquence supplémentaire, confirment. Leur identification est basée sur la similarité de séquence, conduisant au fait que certaines ont le nom de plusieurs caspases de vertébrés, mélangeant ainsi caspases initiatrices et exécutrices (*i.e.* KH2012:KH.C4.463 dénommée CASP2; CASP6; CASP8). J'ai utilisé les 12 séquences de références d'ANISEED pour mon travail.

2) Résultats des analyses phylogénétiques

La spécificité des caspases initiatrices avec une voie de signalisation apoptotique particulière chez les vertébrés fait que l'identification des orthologues de *Ciona* permet d'identifier les voies de signalisation potentiellement présentent chez celle-ci. J'ai réalisé des analyses phylogénétiques avec les 12 caspases que possède *Ciona*, et celles de différentes espèces de vertébrés (Figure 64). L'alignement des séquences a été effectué à partir des séquences protéiques avec MAFFT ou Seaview puis le « bruit de fond » a été supprimé avec Gblocks. J'ai manuellement supprimé les prodomaines pour ne garder que les domaines P20 et P10. Les analyses ont été effectuées trois fois, avec un groupe externe différent plus ou moins éloigné phylogénétiquement : *Hydra* (Cnidaria), *Aplysia californica* (Mollusca), *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinodermata). De plus, j'ai réalisé la topologie par méthode d'inférence bayésienne d'une part (MrBayes, modèle JTT, 5 chaînes de Markoff, déviation <0.02) avec les probabilités postérieures pour évaluer le soutien des nœuds, et la méthode de maximum de vraisemblance d'autre part (PhyML, modèle JTT, 5 arbres de départ en NJ, 800 bootstraps).

Les relations entre séquences de cione et de vertébrés, en fonction de la méthode utilisée et des groupes externes introduits, demeurent similaires. De plus, des résultats similaires sont obtenus lorsque deux espèces supplémentaires de tuniciers (*Botryllus / Phallusia*) et un céphalochordé (*Amphioxus*) sont ajoutées. Bien que certaines séquences de *Ciona* présentent des longues branches, faisant chuter la robustesse de certains nœuds, on peut considérer l'ensemble des relations phylogénétiques obtenu comme relativement « solide » (Figure 64).

La topologie obtenue par inférence bayésienne, en utilisant la caspase 9C d'oursin (XP_011661359.1) comme groupe externe, illustre les relations d'homologies entre les caspases de *Ciona* et de vertébrés que j'ai identifiées au travers de ces analyses. Les relations d'orthologies mises en évidence (Figure 64) m'ont permis de renommer les caspases de *Ciona* (Tableau 1).



Figure 64: Phylogénie réalisée par inférence bayésienne avec le modèle de substitution JTT et le logiciel MrBayes avec les séquences protéiques des caspases de vertébrés (*Danio rerio*; *Xenopus laevis*; *Gallus gallus*; *Mus musculus*; *Homo sapiens*) et toutes les séquences de *Ciona* (en rouge). Le soutien des nœuds correspond aux probabilités postérieures. L'alignement de 147 aa, composé de 53 séquences a été fait avec MAFFT sur les domaines P20 et P10 puis traité avec Gblocks.

Le nombre de caspases potentiellement exécutrices de Ciona est particulièrement élevé et montre des groupes paralogues avec cinq caspases 3/7-like (Ci-*casp3/7 -A -B -C -D et -E*) (nœud 1), trois caspases 6 (Ci-*casp6 -A1 -A2 -B*) (nœud 2).

- Une caspase 8/10-like (Ci-*casp8/10*) est présente (nœud 3), séquence-sœur de l'ensemble des caspases-8 et -10 des vertébrés. Cela montre que, au regard des urochordés, les caspases-8 et -10 des vertébrés sont probablement deux paralogues. Cette identification est également soutenue par la présence commune du pro-domaine DED.

- Il y a une caspase 2, que j'ai nommé 2A (Ci-*casp2A*) pour des raisons présentées plus loin (nœud 5). Cette identification est conforme avec la présence du pro-domaine CARD.

On observe la présence de la caspase Ci-*caspX*, séquence-sœur de la caspase Ci-*casp2A*, alors qu'elle ne possède pas de domaine CARD. Il pourrait s'agir potentiellement d'une seconde caspase 2, mais dont le pro-domaine CARD serait très divergent et non reconnaissable. En effet, elle est la seule caspase du clade « caspase 2 » (**nœud 5**) qui ne possède pas de pro-domaine CARD, alors que son pro-domaine est relativement long. La présence d'un pro-domaine CARD non reconnu car trop divergent est l'hypothèse la plus parcimonieuse.

- La caspase Ci-*caspY* est dans le groupe comprenant les caspases-CARD inflammatoires (nœud 6), alors qu'elle n'a pas de pro-domaine CARD. En revanche, le soutien de ce nœud 6 est faible (76 de probabilité postérieure), impliquant que ce regroupement puisse potentiellement être dû à une attraction des longues branches. J'ai préféré rester prudent sur sa détermination, et ne lui ai pas attribué un nom d'orthologue de caspases de vertébrés. L'absence de domaine CARD interroge. Si des pro-domaines existent dans d'autres groupes d'animaux, mais qu'ils ne peuvent pas être reconnus car trop divergents, cela biaise potentiellement l'identification de caspases initiatrices à large échelle évolutive.

- L'absence de la caspase 9 chez *Ciona* est inattendue puisque cette caspase initiatrice est spécifique de la voie mitochondriale chez les vertébrés (nœud 4). Cette absence m'a conduit à poursuivre les analyses en me concentrant sur les caspases-CARD, afin de m'assurer de ce résultat intéressant mais surprenant.

Après avoir effectué ces analyses, j'ai repris a *posteriori* l'alignement en regroupant les séquences appartenant à un même groupe monophylétique (Figure 65). Les similarités de séquences dans ces groupes monophylétiques montrent des « signatures moléculaires » dans le domaine P20 qui sont alors des caractéristiques propres à chaque groupe de caspases (*i.e.* des synapomorphies). Ces signatures permettent une identification *a posteriori* de caractères protéiques dérivés. Les caspases 2 sont caractérisées par la présence d'un N (asparagine) avant le site actif du domaine P20 (NKPK), ce qui semble être dérivé puisque la majorité des autres caspases possède un G (glycine).

Ci-*caspX* fait exception, puisque bien que contenu dans un groupe monophylétique homogène (**nœud 5**), un K (lysine) est présent à la place du N (**K**KPK). Les caspases 9 sont caractérisées par la présence d'un G (glycine) (QACG) dans le site actif du P20, alors que sur le même site les caspases 8 et 10 possèdent un Q (glutamine) (QACQ). Ces deux caractéristiques sont dérivées pour chacun des groupes respectivement (caspase 9 ; caspases-8-10), l'ensemble des autres caspases ayant un R (arginine) (QACR).

Tableau 1: Nomenclature des caspases de *Ciona* en fonction des relations d'orthologies obtenues après analyses phylogénétiques. Les références des protéines et des gènes proviennent de la base de données ANISEED, et correspondent donc à *Ciona robusta*.

Espèce	Identifiant de la protéine	Identifiant du gène	Nom	Pro-domaine
C. robusta	KH2012:KH.C4.463.v1.A.ND1-1	KH2012:KH.C4.463	caspase 2A	CARD
		Cirobu.g00006557		
C. robusta	KH2012-KH-C12-451-V1-A-	KH2012-KH-C12-451	caspase X	NA
	NONSL2-1	Cirobu.g00003007	(=2B ?)	
C. robusta	KH2012-KH-C12-7-V1-A-ND1-1	KH2012-KH-C12-7	caspase	NA
		Cirobu.g00003277	3/7A	
C. robusta	KH2012-KH-C12-350-V1-B-	KH2012-KH-C12-350	caspase 3/7B	NA
	ND1-1	Cirobu.g00002898		
C. robusta	KH2012-KH-C12-220-V1-A-SL1-	KH2012-KH-C12-220	caspase 3/7C	NA
	1	Cirobu.g00002755		
C. robusta	KH2012-KH-C12-104-V1-A-	KH2012-KH-C12-104	caspase	NA
	ND1-2	Cirobu.g00002628	3/7D	
C. robusta	KH2012-KH-C8-922-V1-A-SL2-1	KH2012-KH-C8-922	caspase 3/7E	NA
		Cirobu.g00009604		
C. robusta	KH2012-KH-S1499-1-V1-A-	KH2012-KH-S1499	caspase 6A1	NA
	ND1-1	Cirobu.g00013918		
C. robusta	KH2012-KH-C2-896-V1-A-SL1-1	KH2012:KH.C2.896	caspase 6A2	NA
		Cirobu.g00005137		
C. robusta	KH2012-KH-C12-449-V1-A-SL1-	KH2012-KH-C12-449	caspase 6B	NA
	1	Cirobu.g00003004		
C. robusta	KH2012-KH-C8-550-V1-A-SL1-1	KH2012-KH-C8-550	caspase 8/10	DED
		Cirobu.g00009196		
C. robusta	KH2012-KH-C7-203-V1-A-SL1-1	KH2012-KH-C7-203	caspase Y	NA
		Cirobu.g00008029		

н.	sapiens Casp 3	TGKPKLFIIQACRGTELDCGPVEADFLYAYSTAPGYYSWRGSWFIQSLC
Μ.	musculus Casp 3	TGKPKLFIIQACRGTELDCGPVEADFLYAYSTAPGYYSWRGSWFIQSLC
G.	gallus Casp 3	AGKPKLFFIQACRGTELDSGPVEADFLYAYSTAPGYYSWRGSWFIQSLC
Х.	laevis Casp 3	VGKPKIFFIQACRGTELDSGPVEADFLYAYSTVPGYCSWRGSWFIQSLC
D.	rerio Casp 3	VGKPKLFFIQACRGTELDPGPVEADFLYAYSTVPGYYSWRGSWFIQSLC
н.	sapiens Casp 7	LEKPKLFFIQACRGTELDDGPVEADFLFAYSTVPGYYSWRGSWFVQALC
м.	musculus Casp 7	LEKPKLFFIQACRGTELDDGPVEADFLFAYSTVPGYYSWRGSWFVQALC
G.	gallus Casp 7	IGKPKLFFIQACRGSEFDEGPVEADFLFAYSTVPGYYSWRGSWFVQSLC
х.	laevis Casp 7	VGKPKLFFIQACRGHEFDDGPVEADFLYAYSTVPGYYSWRGSWFVQALC
D.	rerio Casp 7	VGKPKLFFIQACRGSEFDDGPVEADFLFAYSTVPGYYSWRGSWFVQALC
C.	intestinalis Casp.3 7 likeA	AGKPKLFFIQACRGEKRSTPPAEADFLIAHATPEEFCAWRGSRFIKALC
C.	intestinalis Casp.3 7 likeB	AGKPKLFFVQACRGHKRDTAPCQADFLIASSTPEGYSSWRGSWFIQALY
C.	intestinalis Casp.3 7 likeC	ATKPKLFFIQACRGFKLAEPPAEADFLIAQSTVPKYYSWRGSIFIQALC
C.	intestinalis Casp.3 7 likeD	ASKPKLFFVQACRGDLLDRGPVQADFLISQATAPDYYAWRGSIFIQTLC
C.	intestinalis Casp.3 7 likeE	AGKPKLFFVQACBGKEISQPPAEADILVA YSTQPGQVSVRGSVFVQTMC
н.	sapiens Casp 6	VGKPKIFIIQACRGNQHDVPPAGADFLMCYSVÄEGYYSHRGSWYIQDLC
м.	musculus Casp 6	VGKPKIFIIQACRGSQHDVPPAGADFLMCYSVAEGYYSHRGSWYIQDLC
G.	gallus Casp 6	VGKPKIFIIQACRGDKHDDPPAGADFIMCYSVAQGYFSHRGSWYIQDLC
x.	laevis Casp 6	VGKPKIFILÕACRGEKHDEPPAGADFIMCYSVAËGYYSHRGSWYIÕDLC
D.	rerio Casp 6	VGKPKIFIWÕACRGDKHDDPPAGADFIMCYSVAEGYYSHRGSWYIÕDLC
C.	intestinalis Casp.6Avs1	EGKPKIFIFŐACRGTKKNVKADGSDVLLCYAAWSGYVSYAGTOYLŐDLH
C.	intestinalis Casp. 6Avs2	KGKPKIFIFŐTCRGTRHNFDPEGSDMLLCYASWOGFVSYCGTCYLŐELH
C.	intestinalis Casp.6B	AGKPKIFLFŐACRGTLHETSPSGSDYLFCYSVAÊGYYSHRGSWFIŐDFT
H.	sapiens Casp 8	AGKPKVFFIŐACOGDNYOKGPDEADFLLGMATVNNCVSYRGTWYIŐSLC
м.	musculus Casp 8	SGKPKIFFIŐACŐGSNFŐKGPDEADFLLGMATVKNCVSYRGTWYIŐSLC
G.	gallus Casp 8	AGKPKVFFVŐACŐGDA YŐKGPSEADFLLGMTTLOD YVS YRGTWYIŐSLC
x.	laevis Casp 8	INKPKIFFIOACOGKESHPKPLEADFLTAFATVED YTSLRGSIYIOOLC
D.	rerio Casp 8	ASKPKLFFIŐACŐGDENOAGPIEADFLIGMATVEHYLSYRGSIFIŐELC
x	laevis Casp 10	TLKPKLFFIOACOGIYTHPSPKEADFLLGMSTVDGYAAYRGSWYIOALC
G	gallus Casp 10	TEKPKLFFVŐACŐGKEVORPPEEADFLLGMATIDG YASFRGTWYIŐALC
C.	intestinalis Casp.8 10 like	TGKPKIFFFŐACŐGDRTMDGPSESDFLIGHSTVPGYLSYRGSWFISTLV
H.	sapiens Casp 2	ONKPRMFFIŐACRGDETDRGPTRSDMICG YACLKGTAAMRGSWYIEALA
м.	musculus Casp 2	ONKPRMFFIOACRGDETDRGPTRSDMICGYACLKGNAAMRGSWYIEALT
G.	gallus Casp 2	ÖNKPKMFFIÖACRGDETDRGPTRSDMICGYACLKGTAAMRGSWYIEALT
x.	laevis Casp 2	ONKPRMFFIOACRGEETDRGPTOSDMICA YACLKGTVSLRGSWFVODLV
D.	rerio Casp 2	ÖNKPKMFFIÖACRGEEMDNGPORSDMICGFATLKGTAAMRGSWFIÖELN
C.	intestinalis Casp.2A	RNKPKIFFIOCCRGNNMDOGPTSSDMIIGYATLOGNAALRGSWYIOVLV
H.	sapiens Casp 9	GGKPKLFFIÕACGGEOKDĤGPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRGSWYVETID
м.	musculus Casp 9	GGKPKLFFIŐACGGEŐKDHGPTPSDILVSYSTFPGFVSWRGSWYIETLD
G.	gallus Casp 9	RGKPKLFFIŐACGGEŐKDOGPTPGDILVSYSTFPGFVSWRGSWYVETLD
x.	laevis Casp 9	RGKPKIFIIÕACGGDÕKDKGPTPSDILVSYSTFPGYVSWRGSWYVEVLD
D.	rerio Casp 9	OGKPKLFFIOACGGGEKDIGPTPSDILVSYSTFPGYVSWRGSWYVENLD
H.	sapiens Casp 1	KDKPKVIII ÕACRGDSPGVVHIEKDFIAFCSSTPDNVSWRGSVFIGRLI
M	musculus Casp 1	KDKPKVIIIÕACRGEKOGVVHIEKDFIAFCSSTPDNVSWRGSLFIESLI
G.	gallus Casp 1	MGKPKVVIIOCCRGDNIGSVHLESDFATLYSSTPDTVSWRGSVFIORLV
x.	laevis Casp 1	RNKPKVIIIÕACRGENKGGLOREADFICFCSSTPDTVSWRGSVFIŤHLI
D.	rerio Casp 1	RDKPKVILIÕACRGGEHGRVĤKEKDFISLMSCTPDTKS YRGTF YVOTLV
H.	sapiens Casp 4	KDKPKVIIVÕACRGANRGELHVEKDFIAFCSSTPHNVSWRGSIFITOLI
M.	musculus Casp 4	RDKPKVIIVÕACRGGNSGEMHVEKDFIAFYSTTPHHLSYRGSYFITŘLI
H.	sapiens Casp 5	KDKPKVIIVÕACRGEKHGELHEEKDFIAFCSSTPHNVSWRGSIFITELI
C.	intestinalis Casp.X	OKKPKIFLFOACOGDE YDMGPOKSDMLIGOATMKGFAAMRGSWYIOAFV
C.	intestinalis Casp.Y	IGRPKLIFFQCCRGGSSSRGPHMSDILVA YSTLEGDMSFRGSWFINAIA
_		

Figure 65: Alignement par MAFFT des séquences protéiques du domaine P20 des caspases de vertébrés (*Danio rerio*; *Xenopus laevis*; *Gallus gallus*; *Mus musculus*; *Homo sapiens*) et de *ciona*. Les « signatures moléculaires » communes à chaque groupe d'orthologie sont encadrées. NB : Les caspases ont été regroupées *a posteriori* suite aux résultats des analyses phylogénétiques, à l'exception de *Ciona*-casp-X et -Y.

I.1.b. Les tuniciers ont perdu la caspase 9

Compte tenu de l'absence de la caspase 9 chez *Ciona*, j'ai élargi mes analyses phylogénétiques uniquement avec les caspases-CARD à l'échelle des deutérostomiens. La démarche est réalisée de façon similaire mais l'alignement comporte le pro-domaine CARD en plus des domaines P20 et P10. Cela permet d'obtenir un alignement plus long avec davantage de sites « phylogénétiquement » informatifs, soit 200 aa. L'analyse obtenue a permis de déterminer les relations d'orthologies entre caspase-CARD de deutérostomiens (Figure 66) dont j'ai pu établir une nouvelle nomenclature (Tableau 2). Trois groupes monophylétiques présentant un soutien maximal (probabilité postérieure de 100) ressortent de la topologie, l'un comprend les caspases 9, l'autre les caspases 2 et le dernier les caspases inflammatoires. Dans chaque groupe, la phylogénie des séquences est globalement congruente avec la phylogénie des espèces.

L'analyse par inférence bayésienne (Figure 66) confirme la perte de caspase 9 chez *Ciona*, et met aussi en évidence l'absence de ce gène chez les autres tuniciers présents dans l'analyse (*Molgula occulata ; Halocynthia roretzi ; Botryllus schlosseri ; Phallusia mammillata ; Ciona savignyi*). En revanche, tous les autres taxons étudiés possèdent cette caspase. Cette topologie montre que l'absence de caspase 9 chez les tuniciers est une perte secondaire au niveau du nœud profond (ancestral) de l'ensemble du groupe.

La caspase 2 a été dupliquée au niveau du nœud profond des urochordés, qui possèdent tous deux paralogues (A et B) à l'exception notable de *Ciona* qui présente une seule Ci-*caspase 2A*. J'ai interprété ce résultat par la perte de l'hypothétique Ci-*caspase 2B*. Cependant, dans la phylogénie proposée dans la partie précédente (Figure 64), Ci-*caspX* est séquence-sœur de Ci-*caspase 2A*. Ci-*caspX* a été exclue de l'analyse réalisée avec les caspases-CARD à l'échelle des deutérostomiens (Figure 66) car son long pro-domaine n'a pas pu être identifié. De ce fait, on ne peut exclure que Ci-*caspX* est le gène paralogue de Ci-*caspase 2A*, dont la séquence soit devenue très divergente et donc, non identifiable (en tant que Ci-*caspase 2B*).

Cette analyse phylogénétique décrit également des événements évolutifs qui concernent les autres espèces étudiées. Par exemple, la caspase 9 apparait dupliquée trois fois chez l'oursin (paralogues nommés respectivement A, B et C). Le céphalocordé *Branchiostoma belcherii* possède également deux paralogues de caspase 9 (A et B).

La caspase 2 est présente chez *Branchiostoma belcherii* (deux paralogues) mais un seul paralogue est, a priori, présent chez *Branchiostoma florida* (perte possible ?). Les ambulacraires (*Strongylocentrotus purpuratus* + Saccoglossus kowalevskii) ne présentent pas de caspase 2, ce qui signifie une perte probable de cette caspase dans ce groupe important.

De ce fait, ces analyses phylogénétiques soulignent, pour les caspases-CARD à l'échelle des deuterostomiens, une évolution très complexe, avec des pertes et des duplications aussi bien pour la caspase 2 que pour la caspase 9. Ces résultats confirment que les analyses phylogénétiques sont primordiales pour différencier les types d'homologies (paralogie / orthologie) entre les espèces. A l'échelle des métazoaires, elles suggèrent des scénarios évolutifs beaucoup plus complexes pour cette famille de caspases que ceux habituellement proposés. Ainsi, se baser sur les seules similarités de séquences, comme cela a été fait le plus souvent, oblitère des informations phylogénétiques fondamentales et conduit, comme nous allons le voir, à des affirmations concernant l'évolution de l'apoptose fondamentalement discutables.

I.1.c. Le répertoire de caspases de Ciona offre des particularités intéressantes

Les analyses phylogénétiques montrent que *ciona* possède une Ci-*casp8/10*, ce qui peut être un argument appuyant la présence de la voie de signalisation extrinsèque chez cette espèce. *Ciona* ne possède qu'une seule caspase-CARD, Ci-*casp2A*, et a perdu la Ci-*casp9*. L'absence de caspase 9 pourrait remettre en cause l'existence même d'une voie mitochondriale chez la cione, et dans le cas où cette dernière serait tout de même présente, ses modalités de fonctionnement. Par conséquent, je me suis intéressé aux autres acteurs possiblement impliqués dans les voies de signalisation apoptotique chez *ciona* en me basant sur les deux voies de signalisation décrites chez les vertébrés : la voie extrinsèque (récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (mitochondriale).

0.2



Figure 66: Phylogénie réalisée par inférence bayésienne avec le modèle de substitution JTT avec le logiciel MrBayes, comprenant toutes les séquences protéiques des caspases possédant un domaine CARD uniquement, à l'échelle des deutérostomiens (*Danio rerio ; Xenopus laevis ; Gallus gallus ; Mus musculus ; Homo sapiens ; Branchiostoma floridae ; Branchiostoma belcherii ; Strongylocentrotus purpuratus ; Saccoglossus kowalevskii ; Molgula occulata ; Halocynthia roretzi ; Botryllus schlosseri ; Phallusia mammillata ; Ciona savignyi ; ciona*). Les pro-domaines sont exclus de l'alignement composé de 27 séquences et de 235 AA, lui-même fait avec MAFFT. L'alignement est traité avec Gblocks. Le soutien des nœuds correspond aux probabilités postérieures. En rouge, les caspases 2, en bleu les caspases 9, en vert les caspases inflammatoires.

 Tableau 2: Nomenclature des caspases-CARD des deutérostomiens en fonction des relations d'homologies obtenues

 selon mes analyses phylogénétiques. Les références des protéines et des gènes proviennent de la base de données

 ANISEED pour les urochordés et NCBI pour les autres espèces.

Espèce	Identifiant de la protéine	Identifiant du gène	Nom
S. purpuratus	XP_789183.3	584219	9A
S. purpuratus	XP_011661242.1 1	594735	9B
S. purpuratus	gi 780005040 ref XP_011661359.1	592436	9C
S. kowalevskii	XP 006811879.1	100376094	9
B. floridae	EEN68002.1 hypothetical protein	7243619BRAFLDRAFT 124779	2
B. belcheri	XP 019646757.1	109487213	2A
B. belcheri	XP_019642903.1	109484124	2B
B. belcheri	XP 019623612.1	109469526	9A
B. belcheri	XP_019644208.1	109485199	9B
C.robusta	KH2012:KH.C4.463.v1.A.ND1-1	KH2012:KH.C4.463Cirobu.g00006557	2A
C. savignyi	CISAVI-CG-ENS81-R15-461426- 463207-09349-P	Cisavi.g00002573Cisavi.CG.ENS81.R15.461426- 463207	2A
C. savignyi	CISAVI-CG-ENS81-R54-461275-	CISAVI-CG-ENS81-R54-461275-467018	2B
11	46/018-10343-P	C1sav1.g00009101	2.4
H. roretzi	HARORE-CG-M1P2014-S35-G03390- 01-P	Harore.g00003390	ZA
H. roretzi	HARORE-CG-MTP2014-S130- G07320-01-P	Harore.g00007320	2B
B. schlosseri	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g02816.	Boschl.g00002816	2A 1
	01.p	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g02816	_
B. schlosseri	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g08767.	Boschl.g00008767	2A 2
	01.p	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g08767	_
B. schlosseri	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g09831.	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g09831	2B
	01.p	Boschl.g00009831	
P. mammillata	PHMAMM-CG-MTP2014-S310-	Phmamm.g00007060	2A
	G07060-01-P	Phmamm.CG.MTP2014.S310.g07060	
P. mammillata	PHMAMM-CG-MTP2014-S92-	Phmamm.g00002989	2B
	G02989-01-P	Phmamm.CG.MTP2014.S92.g02989	
M. oculata	Moocul-CG-ELv1_2-S113854-g13164-	Moocul.g00013164	2A
	01-р	Moocul.CG.ELv1_2.S113854.g13164	
M. oculata	Moocul-CG-ELv1_2-S103067-g09526-	Moocul.g00009526	2B
	01-p	Moocul.CG.ELv1 2.S103067.g09526	

I.2. Les acteurs régulant l'apoptose intrinsèque chez Ciona

L'absence de la caspase 9, initiatrice spécifique de la voie mitochondriale, m'a conduit à m'interroger sur les autres acteurs potentiels de la voie mitochondriale chez *ciona*, en particulier les membres de la famille Bcl-2 et Apaf-1.

I.2.a. La cione possède des gènes de la famille Bcl-2

Une approche fondée sur une similarité de séquences des gènes apoptotiques chez *Ciona* montre la présence de trois gènes de la famille *Bcl-2* (Terajima *et al.*, 2003).

Potentiellement impliqués dans la signalisation de la voie mitochondriale, il s'agit des gènes Ci-*bax*, Ci-*bok* et Ci-*bcl-xl*. Les analyses des domaines et de la structure protéique associée appuient cette identification (Ci-Bax et Ci-Bok ont trois domaines BH, alors que Ci-Bcl-xl en possède quatre), mais l'absence d'analyses phylogénétiques ne nous permet pas de définir avec certitude s'il s'agit bien des orthologues de Bax, Bok et Bcl-xl des vertébrés.

Il a été montré que Ci-*bax* et Ci-*bcl-xl* sont fonctionnels grâce à des études sur des cellules en cultures (Takada *et al.,* 2005). En effet, l'expression ectopique de Ci-*bax* dans des cellules en cultures induit une mort par apoptose de ces dernières. Cette activité a été mise en évidence par un marquage TUNEL ainsi qu'une augmentation de l'activité de la caspase 3 évaluée avec le substrat fluorescent DEVD-AMC. Lorsque Ci-*bax* est exprimé simultanément avec Ci-*bcl-xl*, le nombre de cellules en apoptose ainsi que le niveau d'activité de la caspase 3 demeurent similaires au témoin. Il en a été déduit que Ci-*bax* est un acteur pro-apoptotique et Ci-*bcl-xl* un acteur anti-apoptotique dans les cellules en culture, ce qui est en accord avec leurs équivalents vertébrés (Terajima *et al.,* 2003 ; Takada *et al.,* 2005). De plus, les données obtenues sur des larves de ciones semblent confirmer le rôle de ces deux gènes, mais il est difficile d'analyser les résultats en raison du fractionnement des larves qui laisse penser à un problème de développement.

I.2.b. Apaf-1 n'a pas été mis en évidence chez la cione

Les comparaisons de séquences par similarité entre la cione et les vertébrés ont permis l'identification de plusieurs gènes de la famille des caspases, des Bcl-2 ou encore des récepteurs de mort (Terajima *et al.*, 2003). En revanche, en dépit de différentes tentatives, les recherches d'homologues effectuées par BLAST sur la base de similarité de séquences sur le génome de *Ciona* n'ont jamais permis de trouver le gène *apaf*-1 (Terajima 2003; Zmasek 2007). Cette absence est d'autant plus surprenante que les mêmes études ont pu confirmer l'existence de ce gène chez plusieurs espèces (*Strongylocentrotus, Nematostella, Branchiostoma*) (Zmasek *et al.*, 2007).

Ces particularités interrogent sur l'existence de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale chez cette espèce. Cependant, avant de se focaliser sur cette voie et de poursuivre sur le modèle « cione », un *a parte* est nécessaire pour déterminer ce qui, fondamentalement,

caractérise la voie mitochondriale.

I.3. Tentative de définition de la voie mitochondriale

Comme nous l'avons vu en introduction, la voie de signalisation mitochondriale est décrite chez les mammifères, le nématode et la drosophile. Cependant, j'ai mis en lumière plusieurs différences fondamentales existantes entre ces modèles classiques. De plus, j'ai souligné les biais conduisant à une vision probablement fausse mais aujourd'hui consensuelle d'une homologie de cette voie de signalisation, bouleversant une vision voulant que cette voie soit conservée. Avant de s'interroger sur le cas de *Ciona*, qui, comme je l'ai fait remarquer, semble atypique en termes de composant de la machinerie apoptotique, il me semble nécessaire de s'interroger maintenant sur ce qui est commun entre les modèles. Autrement dit, qu'est ce qui, fondamentalement, définit la voie mitochondriale ? Cette discussion permettra dans un second temps de reconsidérer le cas de la cione.

Il est intuitif de se focaliser sur la mitochondrie dans un premier temps et d'analyser l'ensemble des acteurs qui interagissent avec cette dernière. Les membres de la famille Bcl-2, que ce soit chez les mammifères, le nématode ou la drosophile, interagissent physiquement avec la mitochondrie. Cependant, la grande différence entre ces trois modèles en termes de composants de la famille Bcl-2, couplée au peu d'informations disponibles sur leurs relations d'orthologies, interdit de les considérer comme communs.

L'interaction avec la mitochondrie est en revanche partagée. Pourtant, celle-ci ne se fait pas de manière identique. En effet, la modification du potentiel de membrane et le relargage du cytochrome c sont deux caractéristiques des seuls mammifères. Avec Apaf-1 et la pro-caspase 9, le cytochrome c forme un complexe protéique. Un tel complexe, dont la fonctionnalité est l'activation de la caspase 9, existe, mais sans intervention du cytochrome c, chez le nématode et la drosophile. Nommé apoptosome chez les mammifères, ce terme est ici employé par facilité de langage pour les trois modèles. La fonction de la mitochondrie paraît donc la même entre ces modèles, à savoir la formation de l'apoptosome. Cependant, cette fonction n'est pas réalisée de la même manière, rendant ce critère difficilement opérationnel.

L'apoptosome est la plateforme protéique permettant l'activation d'une pro-caspase 9. Les deux éléments communs de l'apoptosome sont donc la caspase 9 (respectivement les protéines *Dronc* pour la drosophile et *C*ed-3 pour le nématode) d'une part et Apaf-1 d'autre part (Dark pour la drosophile et Ced-4 pour le nématode). Cependant, comme souligné dans l'introduction, nous ne

206

savons pas si les caspases-CARD de la voie mitochondriale des mammifères, de la drosophile et du nématode sont orthologues. Par conséquent, la caspase 9 comme « élément fondamental commun » doit être relativisé.

Finalement, Apaf-1 semble commun à ces trois modèles. Cette protéine permet, grâce à l'interaction entre son propre domaine CARD et celui d'une caspase initiatrice, l'activation de cette dernière. La présence et la fonction de Apaf-1 parait être le critère le moins ambigu pour définir ce que je nommerai à présent « les voies mitochondriales ». Par conséquent, si une définition générale de ces voies mitochondriales devait être tentée ici, Apaf-1 en serait certainement le point fondamental.

Pourtant, cette conclusion pose question lorsque l'on regarde la machinerie apoptotique de *Ciona*. En effet, l'absence d'Apaf-1 chez la cione devrait impliquer, « par définition », l'absence de cette voie chez cet animal.

I.4. Un focus sur la voie mitochondriale est nécessaire

La voie de signalisation mitochondriale doit être abordée au travers d'analyses phylogénétiques et à la lumière de données issues de modèles non classiques, pour comprendre son fonctionnement et son évolution.

La suite de ce chapitre propose un article (ici dans sa version française) en cours de préparation s'appuyant sur deux points :

- Des analyses phylogénétiques visant à déterminer les relations d'orthologies entre les caspases et entre les proteines Bcl-2 à l'échelle des métazoaires (en incorporant, de fait, les modèles classiques).
- Des expérimentations sur *Ciona*, dont les particularités (*i.e.* l'absence de caspase 9 et l'absence d'Apaf-1) en font un modèle idéal pour explorer le concept de voie apoptotique mitochondriale.

Ces données permettront dans un second temps de discuter des voies mitochondriales à une large échelle évolutive, en abordant leur évolution et fonctionnement.

II. ARTICLE N°3 (Version française, manuscrit en cours d'écriture et en attente d'un dernier résultat expérimental chez *Ciona*)

TITRE

Les voies de signalisation apoptotiques mitochondriales sont convergentes à l'échelle des métazoaires.

RÉSUMÉ

L'apoptose est une mort cellulaire programmée régulée par les caspases, au travers de deux voies de signalisation majeures principalement décrites chez les mammifères : la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et la voie mitochondriale (intrinsèque). La voie de signalisation mitochondriale semble présente chez tous les métazoaires et est considérée comme conservée. Elle est très bien décrite chez les mammifères, ainsi que chez le nématode et la drosophile. Plusieurs acteurs communs et fondamentaux interviennent chez ces trois modèles, à savoir en début de signalisation les protéines de la famille Bcl-2, et en aval la protéine activatrice Apaf-1 et la caspase 9. Cependant des différences importantes existent entre ces trois modèles au niveau des mécanismes de régulation impliquant la mitochondrie. Grâce à des analyses phylogénétiques, nous avons montré que dronc (drosophile) et ced-3 (nématode) ne sont pas des orthologues de la caspase 9 des vertébrés, mais sont des orthologues de la caspase 2. De plus, la caspase 9 est une acquisition propre des deutérostomiens, alors que la caspase 2 est une acquisition des bilatériens. Ces données suggèrent une évolution complexe de la signalisation apoptotique que nous avons exploré ici à travers le modèle Ciona. Cette espèce a la particularité de ne pas posséder d'Apaf-1 et d'avoir perdu la caspase 9, tandis que nous avons montré que les gènes Bcl-2 sont exprimés et que la caspase 2 est impliquée dans l'apoptose, impliquant une voie mitochondriale particulière potentielle.

Ces résultats montrent que la voie mitochondriale n'est pas conservée à l'échelle des métazoaires. En revanche, si la « boîte à outils » de la voie mitochondriale paraît varier entre les grands phylums animaux, ses fonctionnalités finales liées au maintien d'une signalisation apoptotique paraissent globalement conservées. D'un point de vue évolutif, nous suggérons que des contraintes fonctionnelles puissent être à l'origine du maintien final de la mort cellulaire par apoptose ainsi que des caractéristiques morphologiques qui y sont associées, et ce, quelle que soit la diversité des acteurs et la façon dont l'apoptose est régulée.

INTRODUCTION

En raison des différences multiples qui existent entre les modèles biologiques classiques sur la voie apoptotique mitochondriale et le manque d'analyse phylogénétique dans la littérature, nous avons émis l'hypothèse que les voies de signalisation apoptotiques sont convergentes. Pour cela nous avons réalisé des analyses phylogénétiques à partir des séquences protéiques des caspases-CARD et de la famille Bcl-2.

Nos résultats montrent que les acteurs de la machinerie apoptotique du nématode, de la drosophile et des mammifères ne sont pas orthologues, impliquant que les voies de signalisation apoptotique mitochondriales sont convergentes et non pas homologues. L'étude focalisée sur Ciona, avec l'apport de données expérimentales, confirme la particularité de sa voie de signalisation apoptotique mitochondriale et appuie la conclusion sur l'existence de plusieurs voies intrinsèques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Alignement et analyses phylogénétiques

Les jeux de données ont été construits à partir des séquences protéiques obtenues sur NCBI et ANISEED en sélectionnant des espèces de bilatériens et de cnidaires. Les séquences d'oursins proviennent de Echinobase. Pour chacune des espèces, toutes les séquences connues ou identifiées ont été utilisées. En cas de plusieurs isoformes, un seul à été choisi, celui ayant la séquence la plus longue.

Deux alignements ont été produits avec MAFFT puis nettoyés avec Gblocks et corrigés à la main. L'un comporte 66 séquences et comprend les domaines CARD, P20 et P10 pour les caspases (soit 170 acides aminés). Pour chacune des espèces présentent dans cette analyse, toutes les séquences de caspases-CARD ont été utilisées et uniquement celles-ci (Tableau 3 ; Figure 67). Cela a permis une identification des relations d'orthologies pour un certain nombre d'entre elles, permettant de les renommer (Tableau 3). En revanche, les caspases de cnidaires, utilisées comme groupe externe aux bilatériens, n'ont donc pas été renommées (Tableau 3).

L'autre comporte 66 séquences et comprend les domaines BH3, BH1 et BH2 pour la famille Bcl-2 (156 acides aminés). (Tableau 4)

Les analyses en inférence bayésienne ont été faites avec MrBayes 3.2 avec le modèle de substitution JTT et le soutien des nœuds est évalué par calcul des probabilités postérieures.

Les analyses en maximum de vraisemblance (ML) ont été réalisées avec le logiciel PhyML sous le modèle JTT. Le soutien est calculé par *bootstrap* avec 800 réplicats.

Tableau 3: Nomenclature des caspases-CARD des métazoaires en fonction des relations d'homologies obtenues selon mes analyses phylogénétiques. Les références des protéines et des gènes proviennent de la base de données ANISEED pour les urochordés et NCBI pour les autres espèces.

	Espèces	Code de la protéine	Caspase
Spongia	Amphimedon queenslandica	XP_003383519	Caspase_G-E
Cnidaria	Acropora melipora	XP_015766400	Caspase NI
		XP_015768208	Caspase NI
	Aurelia aurita	lcl c6661 fA_c02_11942 (transriptome non publié)	Caspase NI
	Exaiptasia pallida	KXJ12672.1	Caspase NI
		KXJ20965.1	Caspase NI
		KXJ12683.1	Caspase NI
	Hydra vulgaris	ACY95435.1	Caspase NI
		NP_001274285.1	Caspase NI
	Anemonia viridis	AAZ95018.1	Caspase NI
Spiralia	Aplysia californica	XP_005113266	Caspase 2
		XP_012945422.1	Caspase NI
	Biomphalaria glabrata	XP_013082356.1	Caspase
	Capitella teleta	ELU00616.1	Caspase 2
		ELT97848.1	Caspase NI
	Crassostrea angulata	AGN75137.1	Caspase 2
	Crassostrea gigas	XP_011419292	Caspase 2
		XP_011414267	Caspase NI
		XP_011449817	Caspase NI
		XP_011432762	Caspase NI
	Octopus bimaculatus	XP_014783442.1	Caspase 2
		XP_014790087.1	Caspase NI
		XP_014784582.1	Caspase NI
Chelicerata	Limulus polyphemus	XP_013788138.1	Caspase 2
		XP_013776997.1	Caspase 2
Insecta	Agrilus planipennis	XP_018324425.1	Caspase 2
	Apis melifera	XP_016771440.1	Caspase 2
	Drosophila melanogaster	CAB53565.1	Caspase 2
	Habropoda laboriosa	XP_017788772.1	Caspase 2
	Helicoverpa armigera	AEK20835.1	Caspase 2
	Papilio machaon	XP_014362236.1	Caspase 2
	Tribolium castaneum	XP_001813274	Caspase 2
Nematoda	Ascaris suum	ERG86894.1	Caspase 2
	Caenorhabditis elegans	AAG42045.1	Caspase 2
Vertebrata	Homo sapiens	AAH17839.1	Caspase 4
		AAI13407.1	Caspase 5
	Mus musculus	NP_033937.2	Caspase 1

		EDL13489.1	Caspase 2
		AAH56447.1	Caspase 9
	Xenopus laevis	NP_001081223.1	Caspase 1
		NP_001081404.1	Caspase 2
		NP_001079035.1	Caspase 9
Echinodermata	Strongylocentrotus purpuratus	XP_789183.3	Caspase 9A
		XP_011661242.1 1	Caspase 9B
		XP_011661359.1	Caspase 9C
Hemichordata	Saccoglossus kowalevskii	XP_006811879.1	Caspase 9
Cephalochardata	Branchiostoma belcheri	XP_019646757.1	Caspase 2A
		XP_019642903.1	Caspase 2B
		XP_019623612.1	Caspase 9A
		XP_019644208.1	Caspase 9B
	Branchiostoma floridae	EEN68002.1	Caspase 2
Urochordata	Botryllus schlosseri	Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g02816.01.p	Caspase 2A_1
		Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g08767.01.p	Caspase 2A_2
		Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g09831.01.p	Caspase 2B
	Ciona robusta	KH2012:KH.C4.463.v1.A.ND1-1	Caspase 2A
	Ciona savignyi	CISAVI-CG-ENS81-R15-461426-463207-09349-P	Caspase 2A
		CISAVI-CG-ENS81-R54-461275-467018-10343-P	Caspase 2B
	Molgula oculata	Moocul-CG-ELv1_2-S113854-g13164-01-p	Caspase 2A
		Moocul-CG-ELv1_2-S103067-g09526-01-p	Caspase 2B
	Phallusia mammillata	PHMAMM-CG-MTP2014-S310-G07060-01-P	Caspase 2A
		PHMAMM-CG-MTP2014-S92-G02989-01-P	Caspase 2B
	Halocynthia roretzi	HARORE-CG-MTP2014-S35-G03390-01-P	Caspase 2A
		HARORE-CG-MTP2014-S130-G07320-01-P	Caspase 2B

 Tableau 4: Nomenclature des Bcl-2 des métazoaires en fonction des relations d'homologies obtenues selon mes analyses phylogénétiques. Les références des protéines et des gènes proviennent de la base de données ANISEED pour les urochordés et NCBI pour les autres espèces.

	Espèces	Identifiant de la protéine	Bcl-2
Spongia	Amphimedon queenslandica	XP_011409569_1	Bcl-2 like
	Amphimedon queenslandica	XP_011405690_1	bok
	Amphimedon queenslandica	XP_003386733_1	bok
Cnidaria	Exaiptasia pallida	KXJ10701.1	Bax
	Nematostella vectenis	NvERTx.2.149824 (fourni par E. Röttinger)	Bax
	Hydra vulgaris	XP_012562061.1	Bax
Insecta	Drosophila melanogaster	AAF44120.1	Buffy (Bok)
		AAF26289.1	Debcl (Bok)
Nematoda	Caenorhabditis elegans	AAA20080.1	CED-9

Spiralia	Biomphalaria glabrata	XP_013083436.1	Bok
		XP_013069706.1	Bok
		XP_013096338_1	Bok
		XP_013086802.1	Bax
		XP_013096338.1	Bax
		XP_013085524.1	Bax
		XP_013070177.1	Bak
		XP_013065969.1	?
		XP_013081872.1	?
		XP_013068612.1	?
		XP_013093137.1	?
	Crassostrea gigas	EKC40007_1	Bok
		EKC18663_1	Bak bax ?
		XP_011424481_1	Bax
		XP_011439700_1	Bak
		XP_011436990_1	Mcl-1
		XP_011449013_1	?
		ACH42081_1	?
Vertebrata	Homo sapiens	AAA74466.1	Bak
		NP_001278357.1	Bax
		API71171.1	Bcl-2
		AAK48715.1	Bcl-B
		AAB09055.1	Bcl-w
		CAA80661.1	Bcl-xL
		NP_115904.1	Bok
		AAF64255.1	Mcl-1
	Mus musculus	AAB09056.1	Bcl-w
		NP_032588.1	Mcl-1
		AAH95964.1	Bcl-2
		AAA51039.1	Bcl-xL
		Q07440.1	BFL-1
		Q9Z0F3.1	Bcl-B
	Danio rerio	XP_005165978.1	Bok
		AAF66960.1	Bax
		AAY43152.1	Bcl-xl
		NP_001025424.1	Bcl-2
		NP_919375.2	Mcl-1
	Xenopus laevis	ACI47310.1	Mcl-1
		NP_001089587.1	Bak
		AAR84081.1	Bax
		BAH28834.1	Bcl-2
		NP_001139563.1	Bok

		AAI10791.1	Bcl-xl
Echinodermata	Strongylocentrotus purpuratus	SPU_006124	Bok
		SPU_010641	Bax
		SPU_014028	Bak
		SPU_0100786	Mcl-1
Tunicata	Ciona robusta	KH2012:KH.C4.794.v1.A.SL1-1	Bax
		KH2012:KH.S653.2.v2.A.SL1-1	Bcl-xl
		KH2012:KH.L87.39.v1.A.ND1-1	Bok
	Molgula oculata	Moocul.CG.ELv1_2.S96550.g08147.01.p	Bax
		Moocul.CG.ELv1_2.S112899.g12639.01.p	Bok
	Phallusia mammillata	phmamm.CG.MTP2014.S13.g00546.01.p	Bax
	Halocynthia roretzi	Harore.CG.MTP2014.S62.g12812.01.p	Bok

RÉSULTATS

Ced-3 et Dronc ne sont pas des caspases 9 mais des orthologues de la caspase 2

Les séquences de bilatériens forment un groupe homogène (probabilité postérieure de 0.65). Au sein de ce clade, **trois groupes monophylétiques apparaissent relativement soutenus:** l'un correspondant aux **caspases 9** (nœud 1 - probabilité postérieure de 0.98), l'autre correspondant aux **caspases 2** (nœud 2 - probabilité postérieure de 0.95) et le dernier contenant les **caspases inflammatoires** des vertébrés ainsi que des séquences de lophotrochozoaires (nœud 3 - probabilité postérieure de 0.68). Au sein des bilatériens, toutes les séquences analysées appartiennent à l'un de ces trois clades.

Le clade des caspases 9 (nœud 1) forme un ensemble de séquences homogènes qui est le groupe-frère de toutes les autres séquences CARD de deutérostomiens et qui sont elles-mêmes regroupées en un unique groupe monophylétique (nœud 1 et 2). Ce clade de caspase 9 contient uniquement des séquences de deutérostomiens. Il regroupe les séquences de vertébrés (*Homo sapiens, Xenopus laevis*), d'un échinoderme (*Strongylocentrotus purpuratus*), d'un hémichordé (*Saccoglossus kowalevski*) ainsi que de céphalochordés (*Branchiostoma florida, B. belcherii*). En revanche, aucune séquence de caspase-CARD d'urochordés ne s'inscrit dans ce clade en dépit des 5 espèces de Tunicata présentent dans l'analyse (*Ciona robusta, C. savignyi, Halocynthia roretzi, Botryllus schlosseri, Phallusia mammillata, Molgula oculata*).

Le clade regroupant les caspases 2 (nœud 2) est bien soutenu et comprend des séquences appartenant à l'ensemble des bilatériens : ecdysozoaires (*i.e. Drosophila, Caenorhabditis*),

lophotrochozoaires (*i.e. Crassostrea*, *Octopus*, *Biomphalaria*) ainsi que de deutérostomiens (*i.e. Branchiostoma*, *Ciona*, *Xenopus*). Mis à part le groupement entre lophotrochozoaires et deutérostomiens (pas de regroupement protostomiens), la phylogénie des séquences est congruente avec la phylogénie des espèces. Ce regroupement est certainement un artefact. En effet, les séquences d'ecdysozoaires qui divergent en premier sont vraisemblablement dûes au fait que ce groupe est connu pour avoir des séquences assez divergentes. En revanche, on remarquera au sein des ecdysozoaires un regroupement des séquences d'insectes (antennate) en groupe-frère de celle de la limule (chélicérate) avec laquelle elles forment un clade de séquences d'arthropodes ; elles-mêmes se positionnant en groupe-frère des deux séquences de nématodes. Ces données sont congruentes avec la phylogénie des espèces.

On remarquera avec intérêt que les Tunicata présentent une duplication de la *caspase 2* qui paraît suivi d'une perte chez *Ciona* qui ne possède plus qu'une unique *Ci-caspase 2A*.

Le dernier groupe de caspases forme un clade peu soutenu (nœud 3) qui comprend les séquences des caspases dites inflammatoires des vertébrés auxquelles s'associent des séquences de lophotrochozoaires. La position variable de ces séquences sensibles à la composition du groupe externe (données non fournies) invite à rester prudent sur l'affiliation de ces caspases à un groupe précis mais, quoi qu'il en soit, elles demeurent systématiquement externes aux deux clades précédents (nœud 3).

Figure 67 (ci-contre, page suivante): Phylogénie réalisée par inférence bayésienne avec le modèle de substitution JTT avec le logiciel MrBayes (5 MCMC, 800 000 générations), comprenant toutes les séquences protéiques des caspases possédant un domaine CARD uniquement, à l'échelle des métazoaires. L'alignement composé de 66 séquences et de 133 aa, lui-même fait avec MAFFT. L'alignement est traité avec Gblocks. Le soutien des nœuds correspond aux probabilités postérieures. En rouge, les **caspases 2**, en bleu les **caspases 9**, en vert les **caspases de cnidaires**, en jaune les **caspases inflammatoires** de vertébrés, en violet les **caspases de mollusques indéterminées**.




Figure 68 (ci-contre, page précédente): Phylogénie réalisée par inférence bayésienne avec le modèle de substitution JTT avec le logiciel MrBayes, comprenant toutes les séquences protéiques de la famille Bcl-2 (sauf les BH3-only) à l'échelle des métazoaires. L'alignement composé de 63 séquences et de 156 aa, lui-même fait avec MAFFT. L'alignement est traité avec Gblocks. Le soutien des nœuds correspond aux probabilités postérieures. Les séquences de *Ciona, Drosophila* et *Caenorhabditis* sont en couleur. Les Bcl-2 pro-apoptotiques sont en rouge, les anti-apoptotiques sont en bleu.

La famille Bcl-2 montre une évolution complexe avec des pertes et duplications

La topologie obtenue montre que les nomenclatures proposées par les similarités de séquences pour les deutérostomiens sont correctes (Figure 68).

Les protéines pro-apoptotiques Bok, Bak et Bax des vertébrés, mais aussi celles qui ont été nommées ainsi par similarité de séquence hors des vertébrés (*i.e.* Mollusca) forment chacune un groupe monophylétique et, dans leur ensemble, un clade (nœud 1). Les gènes anti-apoptotiques des vertébrés (et potentiellement anti-apoptotiques des autres espèces de l'analyse) forment respectivement deux autres clades. Le premier comprend les Bcl-2 -w -xl (nœud 3) et le second les Mcl-1, Bcl-B ainsi que Bfl (nœud 2).

La position de la séquence du nématode *Ced-4* indique qu'il est homologue aux antiapoptotiques formant le clade « Mcl-1, Bcl-B, Bfl » (nœud 2). En revanche, on ne peut pas identifier son orthologue chez les vertébrés qui possèdent eux-mêmes trois paralogues. Les deux séquences Bcl-2 de la drosophile, *Buffy* et *Debcl*, sont paralogues ; en lien avec notre analyse, elles sont probablement issues d'une duplication chez cette espèce. Ces deux gènes sont orthologues à Bok.

La phylogénie de la famille Bcl-2 montre que les identifications proposées pour *Ci-Bax* et *Ci-Bok* paraissent correctes, il s'agit bien d'orthologues des gènes des mammifères. Concernant *Ci-Bcl-xl*, la séquence paraît très divergente et sa position phylogénétique est moins précise. Bien que systématiquement située dans un clade de protéines non-apoptotiques dans toutes nos analyses, son insertion dans le jeu de données fait chuter la solidité de ce nœud (nœud 3). *Ci-Bcl-xl* ne peut être identifiée comme un orthologue de Bcl-xl, mais il s'agit bien d'un membre du clade regroupant les membres non apoptotiques « Bcl-2 -w -xl ».

Les séquences de mollusques (*Crassostrea gigas* et *Biomphalaria glabrata*) sont distribuées dans les trois clades (nœuds-1-2-3), indiquant la présence des gènes *bax*, *bak*, et *bok* ainsi que des membres anti-apoptotiques chez ces espèces.

Par conséquent, Bok (vertébré), Ci-bok, Buffy et Debcl sont orthologues. Bax

(vertébré) et Ci-Bax sont orthologues. Ci-Bcl-xl, Ced-9, Bcl- xl (vertébrés), Bcl-w (vertébrés) et Bcl-2 forment un groupe monophylétique de séquences « anti-apoptotiques » homologues. La présence de séquences de mollusques dans les clades Bax, Bak, Bok, Bcl-2 et Mcl témoigne de la distribution de ces gènes à large échelle évolutive.

Ciona ne possède pas d'Apaf-1

Les recherches d'homologues hypothétiques par similarité de séquences via des recherches par BLAST chez *Ciona* n'ont jamais permis de détecter le gène *apaf*-1 (Terajima 2003; Zmasek 2007). Les analyses par BLAST réciproques que j'ai effectués sur le génome et le protéome de *ciona* à partir des séquences de Apaf-1 (*Homo sapiens*), Ark (*Drosophila melanogaster*) et Ced-4 (*Caenorhabditis elegans*) n'ont donné aucun résultat, aussi bien sur NCBI que sur ANISEED. Aucune protéine ayant un domaine CARD associé à un domaine NB-ARC, la caractéristique de Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997), n'a pu être détectée. Des recherches réalisées chez d'autres espèces d'urochordés (*Botryllus schlosseri*, *Ciona savignyi*, *Halocynthia roretzi*, *Molgula oculata*, *Phallusia mammillata*), ont conduit à un résultat similaire.

Même si un résultat négatif n'est pas une preuve d'absence, au vu du grand nombre de génomes, transcriptomes et protéomes d'urochordés disponibles et analysés, on peut raisonnablement proposer que *ciona* a perdu le gène *apaf*-1, et que cette perte concerne l'ensemble des urochordés.

Les gènes bcl-2 de Ciona sont exprimés chez la larve

Les gènes de la famille *Bcl-2* de *Ciona* sont exprimés dans la larve en développement (Figure 69). Les profils d'expressions réalisés par hybridations *in situ* montrent une localisation quasiment ubiquitaire des deux pro-apoptotiques Ci-*bok* et Ci-*bax*. Cependant, l'intensité du signal semble plus marquée à l'extrémité postérieure de la queue, là où est initiée la vague apoptotique polarisée chez la larve nageante au cours de la régression caudale (Chambon *et al.,* 2002). Ci-*bcl-xl* est également exprimé de façon ubiquitaire, excepté dans l'épiderme postérieur de la queue. Ces résultats sont en accord avec le fait que le point de départ de la vague apoptotique polarisée est l'épiderme caudal postérieur.

Les données issues de RTq-PCR confirment l'expression de ces gènes aux stades LTB, mais aussi MTB, larves nageantes et larves fixées (en début de régression caudale) (Figure 70). L'expression de ces gènes au stade LTB suggère que les protéines seront présentes chez la larve nageante.



Figure 69: Hybridations *in situ* des gènes Ci-*bax*, Ci-*bok* et Ci-*bcl-xl* sur des larves LTB. Ci-*bax* et Ci-*bok* ont une expression plus forte à l'extrémité postérieure de la queue. Inversement, Ci-*bcl-xl* est exprimé de façon ubiquitaire excepté dans l'épiderme postérieur de la queue.



Figure 70: Expression relative des gènes Ci-*bax*, Ci-*bok* et Ci-*bcl-xl* par rapport aux témoins r27a et actine obtenue par RT-qPCR sur des stades MTB, LTB, larves nageantes et larves fixées qui ont initié la régression caudale. Les différences d'expression de chaque gène entre les stades n'est pas statistiquement différente pour r27a (Kruskal-Wallis chi-squared = 8, df = 8, p-value = 0.4335) et *l'actine* (Kruskal-Wallis chi-squared = 8, df = 8, p-value = 0.4335).

L'inhibiteur de caspase 9 est sans effet contrairement à l'inhibiteur de caspase 2

L'inhibiteur de caspase 9 - Z-LEHD-FMK (L) - n'a pas d'effet sur la proportion de larves fixées présentant une régression caudale, alors que l'inhibiteur de caspase 2 - Z-VDVAD-FMK (V) - présente un effet proche du contrôle positif, l'inhibiteur de pan-caspases - Z-VAD-FMK (Z) - (Figure 71). Par conséquent, on peut suggérer que la caspase Ci-casp2A soit la caspase initiatrice principalement impliquée dans la voie de signalisation apoptotique conduisant à la régression caudale. L'utilisation du Z-VAD-Fmk comme contrôle positif présente un avantage car il permet de confronter les résultats de nos deux témoins, à savoir les conditions physiologiques (DMSO) et le contrôle positif. Ainsi, on peut raisonnablement penser que si un inhibiteur n'a pas d'effet, le résultat sera identique à celui du DMSO et bien différent du Z-VAD-Fmk, et inversement. Les tests statistiques Wilcoxon Mann Whitney confirment l'absence d'effet de l'inhibiteur de caspase 9 et l'effet significatif de l'inhibiteur de caspase 2 (Tableau 5).



Effets des inhibiteurs sur la regression caudale

Figure 71: Effet des inhibiteurs de caspases sur la proportion de larves fixées avec la régression caudale en cours. L'inhibiteur de caspase 9 Z-LEHD-FMK (L) n'a pas d'effet, le résultat est identique aux témoins physiologiques (DMSO). L'inhibiteur de caspase 2 - Z-VDVAD-FMK (V) - a un effet proche du contrôle positif, l'inhibiteur de pancaspases - Z-VAD-FMK (Z).

Tableau 5: Résultats des tests statistiques Wilcoxon Mann Whitney entre les inhibiteurs de caspases spécifiques et les témoins physiologiques (DMSO) et positifs (Z-VAD-Fmk). Les différences significatives sont indiquées par une *.

Test de Wilcoxon Mann	(cas 9)	(cas 2)
Whitney	Z-LEHD-FMK	Z-VDVAD-FMK
DMSO (contrôle)	W = 41, p-value = 0.08213	W = 10, p-value = 0.009214*
Z-VAD-FMK (contrôle positif)	W = 138, p-value = 0.000131*	W = 45, p-value = 0.6294

DISCUSSION

La voie mitochondriale entre mammifères, drosophile et nématode n'est pas homologue.

L'analyse de la topologie obtenue sur les caspases-CARD à l'échelle des métazoaires montrent deux points fondamentaux (Figure 67). Premièrement, en raison de la topologie et de la distribution taxonomique, on peut conclure que la caspase 9 est spécifique des deutérostomiens (**nœud 1**), et a été acquise au nœud profond dans ce clade. En revanche, les urochordés ont perdu la caspase 9 secondairement. Deuxièmement, la distribution taxonomique et la congruence de la phylogénie des gènes et des espèces appuient le fait que la caspase 2 soit présente chez l'ancêtre commun des bilatériens (**nœud 2**).

La caspase-CARD initiatrice de la voie mitochondriale des vertébrés est la caspase 9. Or, chez les ecdysozoaires, tels la drosophile ou le nématode *C. elegans*, les caspases-CARD (*Dronc* et <u>Ced-3</u>) sont orthologues à la caspase 2 des mammifères. Ce ne sont donc pas les mêmes gènes qui interviennent dans la voie mitochondriale de ces espèces mais des gènes paralogues qui ont une histoire évolutive bien différente. La voie mitochondriale met donc en œuvre deux groupes de gènes paralogues différents au sein même des bilatériens.

Concernant les gènes de la famille Bcl-2, la position de Ced-4 (*C. elegans*) parmi les gènes anti-apoptotiques d'une part et la position de Debcl et Buffy (*Drosophila*) parmi les gènes pro-apoptotiques d'autre part sont congruents avec leurs fonctions respectives connues (Figure 68). Cependant, bien que les membres de la famille *Bcl-2* forment une famille multigénique issue, par définition, d'une séquence ancestrale hypothétique commune, ce ne sont pas les mêmes gènes de la famille qui interviennent dans la voie mitochondriale de chacun de ces modèles. L'analyse phylogénétique confirme le fait que les gènes *Bcl-2* de la drosophile (deux gènes *debcl* et *buffy*) et du nématode (un gène, *ced-9*) ne sont pas orthologues. Pourtant, ces gènes ont respectivement des homologues chez les vertébrés, mais aussi chez les mollusques, un groupe qui présente une forte

diversité dans la composition en gènes de la famille *Bcl-2* tout aussi similaire à ce qui est connu chez les mammifères (présence de pro- et anti-apoptotiques). Cette diversité génétique présente chez les mollusques qui paraît les distinguer des ecdysozoaires, pourtant phylogénétiquement proches, indique que la drosophile et le nématode ont subi différentes pertes de gènes de cette famille. Les ecdysozoaires sont bien connus pour avoir eu de nombreuses pertes de gènes au cours de leur évolution (*i.e.* les gènes *Hox*), mais les deux organismes, drosophile et nématode, n'ont pas perdu les mêmes représentants de la famille Bcl-2 (Duboule *et al.*, 2004).

Au regard de la diversité des acteurs qui interviennent dans la voie de signalisation mitochondriale, on ne peut que difficilement affirmer que cette voie soit conservée, et il semble plus approprié de parler de plusieurs voies mitochondriales. En revanche, bien que les gènes considérés comme les plus importants de la voie appartiennent à des groupes différents de paralogues, leurs séquences relativement similaires, en lien avec la conservation de domaines protéiques importants, permet de supposer la conservation de certaines fonctionnalités. Ainsi, bien qu'évolutivement divergente, les voies mitochondriales de différents phylums animaux présenteraient un ensemble de convergences fonctionnelles.

L'absence d'homologie des gènes acteurs des voies de signalisation apoptotiques expliquerait les différences fonctionnelles observées.

L'intervention de gènes non-homologues pourrait expliquer les différences de fonctionnement de la mitochondrie et de l'apoptosome entre les mammifères et les ecdysozoaires (Meier *et al.*, 2000 ; Hengartner, 2000 ; Galluzzi *et al.*, 2018). Seul Apaf-1, composant l'apoptosome, semble commun aux « trois » modèles classiquement étudiés : souris/homme, drosophile et nématode.

La protéine Apaf-1 est caractérisée, chez les vertébrés, par la présence de trois domaines qui sont un domaine CARD, un domaine NB-Ark, et des répétitions WD40 (12 répétitions chez les mammifères) (Zou *et al.*, 1997). Le domaine CARD est à l'origine du recrutement de la caspase initiatrice Dronc pour Dark (Drosophile), Ced-3 pour Ced-4 (Nématode), Caspase 9 pour Apaf-1 (Vertébrés). Les répétitions WD40 permettent l'interaction avec le cytochrome c (Zou *et al.*, 1999). Chez les mammifères, cette interaction est indispensable pour l'oligomérisation d'Apaf-1 et la formation de l'apoptosome qui intègre les pro-caspases 9. Le cytochrome c n'intervient pas chez les ecdysozoaires, et de manière intéressante, Ced-4 ne présente pas les répétitions WD40, faisant qu'une interaction physique avec le cytochrome c est par conséquent impossible.

Pourtant, la présence de la protéine Apaf-1 à une large échelle évolutive (Metazoa) est attestée (Figure 72) (Zmasek *et al.*, 2007 ; 2013). De plus, Zmasek *et al.* (2007) montrent que des gènes *apaf-*1 sont présents sous forme de plusieurs paralogues chez *Branchiostoma* (Cephalocordata) et

Nematostella (Cnidaria). Ils émettent l'hypothèse que plusieurs *apaf*-1 existaient chez l'ancêtre commun des métazoaires. Sachant qu'ecdysozoaires et mammifères ne possèdent qu'un seul paralogue, ces deux clades auraient subi des pertes au cours de l'évolution. L'hypothèse selon laquelle ce ne serait pas les mêmes paralogues qui seraient perdus est appuyée par une analyse phylogénétique par inférence bayésienne (Zmasek *et al.*, 2007). En reprenant les mêmes séquences (*Homo, Nematostella, Branchiostoma, Drosophila*), mais en racinant la topologie avec la séquence Apaf-1 d'*Amphimedon* (Porifera) (*i.e.* l'analyse de Zmasek *et al.*, 2007 est dépourvue de groupe externe), on retrouve un résultat similaire avec trois groupes d'Apaf-1, suggérant la présence de trois gènes *apaf*-1 chez l'ancêtre commun. Si tel est le cas, les *apaf*-1 des voies mitochondriales de la drosophile, du nématode et des mammifères sont bien membres de la même famille, mais ne sont pas des orthologues.

La caspase 2 est la caspase initiatrice de la voie dépendante de p53 décrite chez les mammifères, en réponse à des dommages sur l'ADN (Lassus *et al.*, 2002). De manière intéressante, il a été montré que la caspase 2 des mammifères peut se comporter comme une caspase exécutrice, notamment en participant aux clivages des protéines composant l'appareil de Golgi lors de l'exécution de l'apoptose (Degterev *et al.*, 2003 ; Roos & Kaina, 2006). Cette caspase présente également une grande modularité dans la mesure où elle est capable de déclencher aussi bien la voie extrinsèque que la voie intrinsèque chez les mammifères (Fan *et al.*, 2005 ; Zhivotovsky *et al.*, 2005 ; Bonzon *et al.*, 2006 ; Lavrik *et al.*, 2006). Sachant que *Ced-3* est orthologue de la caspase 2, cela pourrait expliquer le fait que la caspase du nématode se comporte, elle aussi, comme une caspase couplant activité initiatrice <u>et</u> exécutrice. De plus, la caspase 2 des mammifères (en opposition à la caspase 9), n'a pas besoin du cytochrome c pour s'activer. Il en est de même pour Ced-3 et Dronc. Au regard de notre analyse phylogénétique, ces différences ne sont plus surprenantes et peuvent s'expliquer par la même origine évolutive de ces caspases.

Les membres pro-apoptotiques de la famille *Bcl-2* chez les mammifères (*Bak, Bax et Bok*) ont une structure globulaire avec un centre hydrophobe, constitué des hélices alpha-2, -3, -4, -5. Cette structure permet l'interaction avec les domaines BH3 des membres anti-apoptotiques de la famille *Bcl-2* (Czabotar *et al.*, 2014). Cette interaction se déroule soit dans le cytosol, soit sur la membrane de la mitochondrie. Chez les mammifères, Bak est localisée sur la membrane de la mitochondrie, et son hélice 9 est orientée vers l'extérieur de la membrane. En revanche, Bax est localisée dans le cytosol dans les cellules saines, mais il se relocalise et s'accumule sur la membrane de la mitochondrie en cas de signalisation pro-apoptotique (Czabotar *et al.*, 2014). Ces deux protéines interagissent donc physiquement avec la mitochondrie, et participent au relargage du cytochrome c en perméabilisant sa membrane. L'absence de Bax et de Bak chez la drosophile et le nématode peut expliquer l'absence de modification du potentiel de membrane de la mitochondrie

chez ces organismes. Inversement, la non utilité de la modification de ce potentiel de membrane pourrai avoir conduit à la perte de ces deux gènes, par absence de pression de sélection.

La protéine Bok des mammifères reste cytosolique, et son rôle pro-apoptotique est plus controversé. Concernant la drosophile, le rôle de la mitochondrie est toujours débattu, et le fait qu'elle serve de plateforme pour les protéines Bcl-2 a été plusieurs fois proposé mais n'est plus considéré aujourd'hui. Or, nous venons de montrer que Debcl et Buffy sont des orthologues de Bok, qui ne se fixent pas sur la mitochondrie chez les mammifères. Par conséquent, cela peut expliquer les écueils des travaux qui se sont succédés pour tenter de montrer que Debcl et Buffy se fixent sur la membrane mitochondriale à l'instar de Bak et de Bax (Oberst *et al.*, 2008).

Cependant, le rôle pro-apoptotique de Bok chez les mammifères est de plus en plus argumenté, puisqu'il semblerait qu'il soit capable de remplacer Bak et Bax et qu'il intervient dans la voie apoptotique dépendante de p53 (Yakovlev *et al.*, 2004; Einsele-Scholz *et al.*, 2016). Par conséquent, se concentrer sur les interactions des protéines Bcl-2 de la drosophile avec p53 pourrait aider à comprendre le rôle de Debcl et Buffy, d'autant plus que p53 chaperonne la voie de signalisation dépendante de la caspase 2 chez les mammifères, caspase 2 que nous savons maintenant orthologue à Dronc.

La voie mitochondriale chez Ciona

Les gènes présents chez *Ciona* suggèrent une voie mitochondriale différente des mammifères, en raison d'une intervention de Ci-*caspase 2A*. Cependant, le fait qu'une caspase 2 soit une initiatrice potentielle ne signifie pas que la voie de signalisation de la cione soit homologue aux voies mitochondriales des ecdysozoaires. En effet, la caspase 9 est ancestrale aux deutérostomiens, et peut potentiellement intervenir dans la voie mitochondriale dans l'ensemble de ce clade (au moins ancestralement). Or, dans ce cadre, l'intervention potentielle de Ci-*caspase 2A* en tant que caspase initiatrice de la voie mitochondriale chez *Ciona* pourrait être considérée comme une exaptation ; c'est à dire une utilisation secondaire de ce gène indépendamment de sa fonction première. Cette nouvelle fonction aurait été acquise suite à la perte de la caspase 9. Or, chez la drosophile ou le nématode, qui n'ont jamais eu de caspase 9, cette fonction serait ancestrale.

Ce parallèle entre ces trois modèles montre un point fondamental, à savoir que définir une homologie de voies de signalisation en se basant sur l'intervention des mêmes gènes peut poser problème si la phylogénie de ces derniers n'est pas bien appréhendée. Cet exemple illustre la pertinence de devoir réaliser des analyses phylogénétiques lorsque l'on s'intéresse à l'évolution de voies de signalisation entre espèces différentes faisant intervenir des acteurs d'une même famille multigénique. Si la perte de la caspase 9 chez *Ciona* a conduit au recrutement de Ci-*caspase 2A*, cela implique qu'une grande modularité dans l'utilisation des acteurs apoptotiques est possible. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que Ci-*caspase 2A* est la seule caspase du génome de *Ciona* possédant un pro-domaine CARD, ce qui pourrait expliquer son recrutement préférentiellement par rapport aux autres caspases.

La présence de Ci-Pidd (KH2012:KH.S483.3 sur la base de données ANISEED) suggère que Cicaspase 2A pourrait être activée de façon similaire aux modalités connues chez les mammifères (Lin *et al.*, 2000). Chez ces derniers, Pidd, ainsi que la protéine Raidd et les pro-caspases 2 forment le PIDDosome, qui aboutira à l'activation des caspases 2 avec également une intervention de p53. La présence attestée de Ci-p53 et de Ci-Pidd suggère fortement que Ci-caspase 2A puisse être activée.

L'absence d'*apaf*-1 peut être due à la perte de la caspase 9, conduisant vraisemblablement à une diminution de la pression de sélection sur la plateforme protéique activatrice de cette dernière. Les domaines de la protéine Apaf-1 permettent l'interaction avec les pro-caspases 9 ainsi que le cytochrome c. Par conséquent, l'interaction entre ces trois facteurs pourrait induire une pression de sélection favorisant un maintien de la composition en acides aminés de leurs domaines respectifs, favorisant les interactions entre ces protéines. En revanche, s'il y a eu pertes des acteurs avec qui la protéine Apaf-1 interagit, alors les mutations au sein de ses domaines ne seront vraisemblablement plus contre-sélectionnées. Cela pourrait expliquer soit la perte d'Apaf-1, soit le fait qu'il nous soit aujourd'hui impossible de reconnaître la protéine (bien que présente) en raison des divergences structurales accumulées au cours de l'évolution.



Figure 72: Répartition des acteurs impliqués (potentiellement) dans les voies mitochondriales sur une phylogénie des espèces à l'échelle des métazoaires. Les croix noires représentent une absence. Les croix rouges (caspase 2), bleues (caspase 9) et vertes (apaf-1) représentent une absence résultant d'une perte secondaire. Les flèches représentent des duplications.

Les données accumulées à l'échelle des métazoaires montrent différents modes de régulation.

Lorsque l'on observe la distribution des acteurs (potentiellement) impliqués dans les voies mitochondriales à l'échelle des métazoaires (Figure 72), on remarque une grande modularité entre les espèces, qui concerne le nombre de gènes représentant la famille multigénique des caspases ou celle des *Bcl*-2, ainsi que dans leur fonction et interaction. Le génome de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* comprend plusieurs caspases 9 (Robertson *et al.*, 2006), les cnidaires présentent aussi bien des caspases-CARD que des membres de la famille *Bcl*-2 et des gènes *apaf*-1 (Lasi *et al.*, 2010), et la même complexité est attestée chez les spongiaires (Srivastava *et al.*, 2010). Zmasek *et al.* (2013) confirment la présence, à l'échelle des métazoaires et chez le dernier ancêtre commun hypothétique de ce groupe, de caspases ainsi que de membres de la famille *Bcl*-2 mais aussi de protéines activatrices possédant des domaines CARD ou DED permettant une interaction avec les caspases.

La présence de ces acteurs pouvant être impliqués dans la signalisation apoptotique à l'échelle des métazoaires rend les études fonctionnelles de certains organismes primordiales pour pourvoir discuter de l'évolution des voies de signalisation. En effet, se focaliser sur les mammifères, la drosophile et le nématode oblitère de fait des groupes fondamentaux. C'est le cas notamment des mollusques, qui en tant que lophotrochozoaires sont des représentants majeurs du groupe des protostomiens, avec les ecdysozoaires. Des études sur des lophotrochozoaires permettraient d'avoir une vue d'ensemble plus complète sur les voies de signalisation apoptotiques chez les protostomiens, ce qui est indispensable pour discuter ensuite des structures et mécanismes à l'échelle des métazoaires.

L'apoptose chez les mollusques est de plus en plus étudiée en raison du poids économique de certaines espèces en aquaculture. En effet, l'apoptose intervient dans le système immunitaire, raison pour laquelle son fonctionnement est étudié (Sokolova *et al.*, 2009). Les caspases sont recrutées dans le système immunitaire des mollusques. Or, les acteurs moléculaires impliqués dans le système immunitaire sont connus pour être relativement divergents et avoir une évolution rapide. Cela pourrait expliquer le regroupement probablement artéfactuel des caspases de mollusques avec les caspases inflammatoires des vertébrés (Figure 67 – **nœud 3**), elles-même impliquées dans l'immunité chez ces derniers.

Chez les mollusques, l'apoptose intervient également au cours de la métamorphose (Kiss, 2010 ; Sokolova *et al.*, 2004 ; Sokolova, 2009 Pirger *et al.*, 2008 ; Romero *et al.*, 2015 - 2011 ; Zhang & Zhang, 2011). Lors de la métamorphose de la larve de l'huître *Crassostrea angulata*, le pied subit une réorganisation majeure et le velum est perdu (Yang *et al.*, 2014). Les auteurs ont montré que ces processus se déroulent grâce à de l'apoptose et observent qu'une caspase, identifiée comme une caspase 2, est exprimée dans les tissus ou l'apoptose est présente. Notre analyse phylogénétique montre que l'identification proposée dans ce travail est valide (Figure 67) puisque la séquence correspondante s'insère dans le clade caspase 2 (**nœud 2**). La voie apoptotique dépendante de la caspase 2 est donc possiblement présente chez les mollusques tels que *Crassostrea angulata* (Bivalvia). Chez une autre espèce, l'escargot *Helix pomatia* (Gastropoda), l'apoptose est mise en évidence au niveau des glandes salivaires, et de façon concomitante avec une modification du MOMP, suggérant un relargage du cytochrome c (Pirger *et al.*,2009). Des membres de la famille Bcl-2 sont également exprimés (Pirger *et al.*,2009). Or, notre analyse phylogénétique montre que les mollusques possèdent des gènes orthologues aux gènes Bax et Bak des mammifères qui interviennent dans le relargage du cytochrome c chez ces derniers. Cela implique qu'il pourrait jouer le même rôle chez les mollusques, d'où l'observation de la MOMP. Bien que l'ensemble de ces données proviennent de plusieurs espèces de mollusques, cela suggère la présence d'une voie mitochondriale avec une caspase 2, la protéine Apaf-1 et un relargage du cytochrome c, correspondant à une voie de signalisation différente de celles déjà connues (Sokolova *et al.*, 2004 ; Pirger *et al.*, 2008 ; Sokolova, 2009 ; Kiss, 2010 ; Romero *et al.*, 2011 - 2015 ; Zhang & Zhang, 2011).

En analysant l'ensemble de nos observations et des données issues de la bibliographie à l'échelle des métazoaires, et en prenant en considération les caractères propres à chaque voie de signalisation apoptotique mitochondriale (Figure 72), il apparaît que la composition des acteurs apoptotiques et la manière dont ils interagissent varient considérablement entre les grands taxons. Cela montre clairement que l'ensemble des voies de signalisation présente des fonctionnements bien différents, que la machinerie apoptotique se caractérise par une grande modularité, faisant qu'il n'est pas possible de reconstituer une signalisation ancestrale, puisqu'elles semblent convergentes. Ainsi, il faudrait parler des voies de signalisation mitochondriales et non limiter la voie intrinsèque à un unique processus.

Les voies mitochondriales sont convergentes

Les données issues de la bibliographie et cette étude permettent de récapituler par cinq schémas les voies mitochondriales connues et/ou suggérées, qui sont autant de voies différentes et non homologues (Figure 73). La définition de la voie mitochondriale établit par le NCCD-2018 (Galluzzi *et al.*, 2018) ne peut s'appliquer qu'aux mammifères, et exclue de fait les autres groupes de métazoaires. Afin de rendre compte de la diversité des signalisations apoptotiques, il est nécessaire de réévaluer la définition si le but de celle-ci est de considérer l'ensemble des métazoaires. Cependant, les différences fondamentales mises en évidence entre les principaux groupes de bilatériens (Figure 72 et 73) rendent toute tentative de définition globale compliquée. L'intervention de la mitochondrie est un point qui semble commun mais il diffère en fonction des espèces modèles.

De plus, le rôle de la mitochondrie doit encore être évalué chez *Ciona*. L'étude d'organismes non bilatériens comme les cnidaires et les spongiaires serait cruciale pour comprendre l'évolution des acteurs apoptotiques et leurs interactions, d'autant plus que la caspase 2 est propre aux bilatériens et que les métazoaires non bilatériens possèdent des caspases-CARD.

L'absence d'acteurs orthologues communs entre ces voies mitochondriales (Figure 73) montrent une grande modularité dans le recrutement et l'utilisation des gènes impliqués dans la signalisation de l'apoptose. Les gènes impliqués sont recrutés par rapport à leurs fonctions, avec une capacité d'inhibition et d'activation des caspases afin de contrôler et de réguler l'apoptose. Ainsi, il n'est pas surprenant de retrouver des inhibiteurs comme des activateurs de caspases initiatrices chez différents organismes. En d'autres termes, quels qu'en soient les acteurs et leurs relations évolutives, c'est la fonctionnalité et probablement les interactions moléculaires liées aux caspases qui ont été sélectionnées. Or, les caspases sont également responsables des caractéristiques morphologiques propres de l'apoptose, qui s'observent à l'échelle des métazoaires.

Cela confirme que mettre de côté les caractéristiques morphologiques de l'apoptose au profit des caractéristiques moléculaires risquent d'empêcher la mise en place d'une définition applicable à l'ensemble des animaux, et qu'une définition moléculaire serait de fait trop restrictive.

Enfin, le point commun central entre toutes les voies mitochondriales présentées ici n'est pas le type de signalisation ou les acteurs apoptotiques qui interviennent, mais le résultat de la signalisation, à savoir la mort cellulaire par apoptose.

Figure 73 (ci-contre, page suivante): Représentation des voies apoptotiques mitochondriales du nématode, de la drosophile et des mammifères ainsi que des voies suggérées chez les mollusques et la cione.





La mort par apoptose, ultime étape des voies de régulation apoptotiques

Une contrainte évolutive existe vraisemblablement pour maintenir une régulation centrée sur les caspases, autrement dit une mort cellulaire présentant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose qui résultent de leurs activités.

Il a été proposé que les caractéristiques morphologiques de l'apoptose confèrent des avantages par rapport aux autres types de morts cellulaires. En effet, elle permet une gestion contrôlée de l'environnement de la cellule en état de mort en raison du maintien de l'intégrité de sa membrane plasmique, évitant un déversement désordonné du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. Cela s'oppose à la nécrose, où le déversement du contenu cellulaire dû à la rupture de la membrane plasmique provoque un stress et des perturbations importantes, avec une perte du matériel biologique. Les corps apoptotiques au contraire sont engouffrés par les cellules adjacentes et/ou les cellules immunitaires, permettant un recyclage du matériel biologique. Dans des contextes morphogénétiques comme l'embryogenèse ou la métamorphose, le recyclage du matériel pourrait être primordial pour assurer le bon déroulement du processus. La dépendance aux ressources propres de certains processus (*i.e.* une larve en métamorphose incapable de se nourrir) pourrait être un exemple de contrainte sélectionnant l'apoptose.

De plus, un tel recyclage pourrait permettre, on peut en émettre raisonnablement l'hypothèse, de limiter l'impact négatif sur l'organisme d'une blessure. L'activité des caspases, permettant le déclenchement d'une prolifération par la voie Wntβ-caténine depuis les cellules apoptotiques lors d'une blessure induite chez l'hydre (Chera *et al.*, 2010), pourrait expliquer le maintien de cette mort cellulaire participant à la régénération.

CONCLUSION

Les analyses phylogénétiques ont permis de mettre en évidence la spécificité de la caspase 9, propre aux deutérostomiens, et l'acquisition de la caspase 2 au nœud ancestral des bilatériens. Par conséquent, Dronc et Ced-3 sont des caspases orthologues à la caspase 2 des mammifères. Comme pour les caspases, nous avons montré par analyse phylogénétique que les membres de la famille Bcl-2 qui interviennent dans les voies mitochondriales ne sont pas des orthologues. Par conséquent nous proposons que les voies de signalisation mitochondriales sont convergentes. *Ciona*, par la perte de la capsases 9 et l'absence de Apaf-1, pourrait présenter une nouvelle voie de signalisation apoptotique inédite, d'autant plus que les gènes de la famille Bcl-2 sont exprimés chez la larve. Prises dans leur ensemble, les voies apoptotiques mitochondriales montrent des similarités fonctionnelles, vraisemblablement dû à des contraintes évolutives favorisant un maintien d'une mort cellulaire caspase-dépendante.

III. LA VOIE EXTRINSÈQUE CHEZ CIONA

III.1. Implication de la voie extrinsèque dans la régression caudale

L'identification de Ci-*csp8/10* (Figure 64), de 8 récepteurs de mort et d'une protéine possédant un domaine DED (et donc potentiellement activatrice, comme FADD et TRADD) permet d'émettre l'hypothèse que la voie extrinsèque est présente chez *Ciona* (Terajima *et al.,* 2003).

Le gène Ci-*csp8/10* est exprimé au stade LTB en partie postérieure de la queue de la larve, ainsi que dans le tronc comme le montre les hybridations *in situ* (Figure 74). Il est vraisemblable que la protéine soit présente plus tard chez la larve nageante et la larve fixée. Une approche par RTqPCR confirme son expression au stade LTB, mais aussi MTB, et surtout chez la larve nageante et la larve fixée (avec régression caudale initiée).

Des larves fixées ont ensuite été exposées à des inhibiteurs de caspases spécifiques afin de tester l'implication de Ci-*csp8/10* dans la régulation de la vague apoptotique conduisant à la régression caudale. Logiquement, l'inhibiteur de la caspase 8 et celui de la caspase 10 des vertébrés ont été utilisés (Tableau 6).

Comme pour les traitements RA, DEAB et SU présentés en CHAPITRE II Article 2 (page 154), j'ai évalué le nombre de larves présentant une régression caudale afin d'établir des proportions comparables entre témoins et traitements. Les traitements montrent que l'inhibiteur de caspase 8 bloque de façon significative la régression caudale, et donc l'apoptose, en opposition à l'inhibiteur de caspase 10 qui n'a pas d'effet (Tableau 6). La répartition des données montre une cohérence entre l'absence d'effet et l'impact du traitement en fonction des deux témoins physiologique et positif respectivement (Figure 75).

L'action des inhibiteurs de caspases se fait par liaison sur le site actif de l'enzyme. Un encombrement physique irréversible bloque les capacités de clivage de la caspase. Les sites actifs sont bloqués *via* l'inhibiteur qui se fixe sur le site de maturation (Figure 76). C'est ce dernier qui permet de désigner les inhibiteurs spécifiques. C'est pour ces raisons que l'inhibiteur de caspase 8 est le Z-<u>IETD</u>-FMK et celui de la caspase 10 est le Z-<u>AEVD</u>-FMK. Le site théorique de Ci-*csp8/10*, <u>VESD</u>, est beaucoup plus proche en composition d'acides aminés de celui de la caspase 8 par rapport à la caspase 10 de l'Homme (Figure 76). Cela peut expliquer l'effet de l'inhibiteur de cette caspase et l'absence d'effet pour l'autre. On peut émettre l'hypothèse que la caspase 8 des vertébrés se rapproche davantage de la séquence ancestrale, alors que pour son paralogue, la caspase 10, la séquence a divergé davantage. L'ensemble de ces données suggère fortement une implication de la voie de signalisation apoptotique extrinsèque chez *Ciona*, probablement homologue à celle des

vertébrés en raison de la présence de Ci-*csp8/10*. Cependant, les relations d'orthologies des autres acteurs sont encore à étudier.

III.2. Implication sur l'évolution de la voie extrinsèque

La présence d'un orhtologue des caspases-8 -10 chez *Ciona* indique que la voie de signalisation extrinsèque est potentiellement homologue. Cependant, tuniciers et vertébrés sont groupe-frère (olfactores), il n'est donc pas possible de postuler sur la conservation de cette voie de signalisation à plus large l'échelle évolutive. Les recherches effectuées chez plusieurs modèles hors des mammifères ont permis de mettre en évidence la présence de caspases possédant des domaines DED dans d'autres phylums comme les mollusques (Romero *et al.*, 2015), les cnidaires (Lasi *et al.*, 2010) ou encore les céphalochordés (Yuan *et al.*, 2010). Chez ces organismes, le nombre de caspases-DED peut être différent de ce qui est connu chez les vertébrés (qui en possèdent 2), comme chez *Branchiostoma lanceolatum* (3 caspases-DED) ou *Aplysia glabrata* (1 caspase-DED). Il en est de même pour les protéines adaptatrices FADD, en double exemplaire chez *Branchiostoma belcheri* par exemple (Yuan *et al.*, 2010 ; recherche personnelles par BLAST). Ces variations témoignent d'une histoire évolutive complexe qui, comme pour les caspases-CARD, ne peut être appréhendée à partir des seules similarités de séquences.

J'ai tenté de réaliser avec les caspases-DED la même approche phylogénétique qu'avec les caspases-CARD, mais je me suis heurté à la présence d'un unique domaine DED pour certaine caspase, et de deux pour d'autres. Réaliser l'alignement avec le pro-domaine implique de faire un alignement sur les domaines DED sans savoir lesquels sont homologues. Je n'ai donc pas poursuivi ce travail. De plus, les topologies que j'ai obtenues étaient difficilement interprétables en raison de la répartition des séquences sans beaucoup de congruence avec la phylogénie des espèces.

De plus, une caspase nommée caspase 18 a été mise en évidence chez les mammifères non placentaires, et est considérée comme particulièrement proche des caspases-8-10 (Eckhart *et al.,* 2008). Cela montre que rechercher en dehors des mammifères placentaires aboutira vraisemblablement à l'identification d'une diversité de caspase-DED encore insoupçonnée, illustrant le fait que les caspases-DED ne doivent pas être systématiquement considérées comme homologues aux caspases-8 et -10 des mammifères.

Enfin, les données fonctionnelles sur cette voie de signalisation sont anecdotiques hors des vertébrés. Outre nos données chez la cione, il a été montré que « Brb-caspase 8 » et Brb-FADD1 interagissent physiquement chez *Branchiostoma belcheri* (Yuan *et al.*, 2010).

233

A la lumière de ces trois points, il semble nécessaire de devoir réaliser des analyses phylogénétiques des caspases-DED à l'échelle des métazoaires, et de poursuivre les expérimentations fonctionnelles encore trop peu nombreuses en dehors des vertébrés pour discuter de l'évolution de cette voie de signalisation apoptotique.



Figure 74: Hybridation *in situ* sur des larves LTB de la caspase initiatrice Ci-*casp8/10* et des caspases exécutrices Ci-*casp3/7B* et Ci-*casp3/7C*.

Tableau 6: Résu	iltats des tests	statistiques	Wilcoxon	Mann	Whitney	entre	les	inhibiteurs	de caspases	spécifiques	s et les
témoins physiolo	ogiques (DMS	O) et positif	s (Z-VAD-	Fmk).	Les diffé	rences	sig	nificatives	sont indiqué	es par une *	*.

Wilcoxon Mann Whitney test	(csp 10)	(csp 8)		
	Z-AEVD-FMK	Z-IETD-FMK		
DMSO (control)	W = 25, p-value = 0.5214	W = 6, p-value = 5.547e-05*		
Z-VAD-FMK (positive control)	W = 36, p-value = 0.03123*	W = 61, p-value = 0.538		



Effets des inhibiteurs sur la regression caudale

Figure 75: Effet des inhibiteurs de caspases sur la proportion de larves fixées dont la régression caudale est en cours. L'inhibiteur de la caspase 10 Z-AEVD-FMK (A) n'a pas d'effet, le résultat est identique aux témoins physiologiques (DMSO). L'inhibiteur de la caspase 8 Z-IETD-FMK (I) a un effet similaire au contrôle positif, le pan-caspases inhibiteur Z-VAD-FMK (Z).

Hs-Csp. 8	S <mark>H</mark> GDKGIIYGTDGQEAPIYELTSQFTGLKCPSLAG <mark>KPK</mark> VFFI <mark>QACQGD</mark> NYQKGIP <mark>VETD</mark> SEE
Hs-Csp. 10	S <mark>H</mark> FTALQCPRLAE <mark>KPK</mark> LFFI <mark>QACQGE</mark> EIQPSVS <mark>IEAD</mark> ALN
Ci-Csp. 8/10	S <mark>H</mark> GLSGCVYGVDGLSLSTSKISKSFRPGMCSSLTG <mark>KPK</mark> IFFF <mark>QACQGD</mark> RTMDGHSAPVDD <mark>VESD</mark> GAA

Figure 76: Alignement du domaine P20 des caspases à pro-domaine DED. Comparaison réalisée entre l'homme et la cione. La signature commune des caspases est soulignée en vert, le site actif en jaune, le site d'action de l'inhibiteur en bleu. On remarque que le site d'action de l'inhibiteur, sur Ci-caspase 8/10 est très semblable à celui de Hs-Casp8 par rapport à Hs-Casp10. Un inhibiteur de caspase 8 aura vraisemblablement plus d'effet sur la Ci-caspase 8/10 que l'inhibiteur de la caspase 10.

IV. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE N°3

Plusieurs expérimentations sont en cours pour comprendre le fonctionnement de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale potentielle de *Ciona*. Premièrement, il est nécessaire de déterminer si Ci-casp2A est exprimé au cours de la régression caudale, premier élément pouvant suggérer son implication. Deuxièmement, une expérimentation est en cours pour évaluer s'il y a un relargage du cytochrome c au cours de la régression caudale de *Ciona*.

Ces deux éléments permettront d'étayer davantage notre proposition sur la voie mitochondriale potentielle de *Ciona*. Il est à noter que quelque soit le résultat, la cione représente un cas inédit soit par la présence d'une voie mitochondriale « originale » s'ajoutant à celles déjà décrites, soit par la perte secondaire de cette voie. Ce cas serait inédit et représenterait le seul modèle connu présentant la voie des récepteurs de mort (que nous avons mise en évidence) et une absence de voie mitochondriale.

La protéine Bax est fondamentale dans la modification du potentiel de membrane chez les mammifères. Sa présence chez *Ciona* suggère fortement qu'une modification de la MOMP est possible. Une modification du MOMP, couplée avec une absence de caspase 9 mais la présence de caspase 2, pourrait être une convergence avec la voie de signalisation qui semble caractériser les mollusques.

Enfin, des données préliminaires issues d'analyses phylogénétiques montrent que les caspases exécutrices des insectes, et par conséquent celles de la drosophile, sont des paralogues issus de duplications à partir d'une séquence ancestrale (données personnelles non fournies). Cette séquence ancestrale ne semble pas être une orthologue de la caspase 3 ou 7 des vertébrés contrairement à ce qui est admis, mais plutôt de la caspase 6 (Figure 77). On sait que la caspase 6 chez les mammifères a un rôle controversé, et que ce sont les caspases 3 et 7 qui sont principalement impliquées dans l'exécution de l'apoptose. Les caspases exécutrices intervenant dans les voies des mammifères et de la drosophile ne sont donc probablement pas orthologues, ce qui conforte notre conclusion sur la convergence des voies de signalisation.

L'ensemble de ces travaux illustre le besoin des approches par analyses phylogénétiques sur les familles multigéniques en biologie du développement, pour prévenir les conclusions hâtives sur l'homologie ou non des voies de signalisation. Les homologies forcées pour des raisons de similarités de séquences ou fonctionnelles provoquent des problèmes par la suite dans les discussions sur l'évolution des gènes et des voies dans lesquelles ils sont impliqués.



Figure 77: Phylogénie réalisée par inférence bayésienne avec le modèle de substitution JTT et le logiciel MrBayes avec les séquences protéiques des caspases de vertébrés (*Danio rerio*; *Xenopus laevis*; *Gallus gallus*; *Mus musculus*; *Homo sapiens*) et d'insectes (*Drosophila melanogaster*; *Tribolium castanuem*; *Bombyx mori*). Le soutien des nœuds correspond aux probabilités postérieures. L'alignement de 116 aa, composé de 57 séquence a été fait avec MAFFT sur les domaines P20 et P10 puis traité avec Gblocks. En bleu, les caspases-CARD, en rouge les caspases-DED, en vert les caspases exécutrices.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours des chapitres qui ont précédé, j'ai pu aborder un certain nombre de questions qui ont guidé ma démarche expérimentale. Je vous propose maintenant de revenir sur certains des points évoqués dans chacun de ces chapitres afin de tenter une analyse plus générale qui me permettra *in fine* de revenir sur le concept d'apoptose constructive et sur sa généralisation.

I. SYNTHÈSE SUR MES TRAVAUX

Qu'en est-il de l'apoptose durant la métamorphose de la planula de *Clytia hemisphaerica* ?

Chapitre I, page 111

Au cours du chapitre I, j'ai émis l'hypothèse que la métamorphose de *Clytia hemisphaerica* est caractérisée par la présence, de façon concomitante, de plusieurs comportements et destins cellulaires dont l'apoptose. Les principaux résultats expérimentaux concernant ce postulat sont :

- l'existence d'un profil apoptotique polarisé bien caractérisé et qui démontre la présence d'apoptose dans l'ectoderme aboral ainsi que dans l'endoderme oral. Au niveau endodermique, l'apoptose se propage vers le pôle aboral et concerne l'ensemble du tissu au moment de la fixation de la larve.

- Le maintien et la prolifération des cellules souches *i-cells* probablement mis en évidence dans l'endoderme alors que l'apoptose est encore présente.

- le fait qu'au moins une partie des *i-cells* se différencie probablement en nématocytes dans l'endoderme, puis que ces dernières « migrent » vers l'ectoderme en traversant la mésoglée au cours

de la métamorphose.

Certains de ces résultats préliminaires seront à confirmer dans le futur.

La présence, dans un même cadre biologique et spatio-temporel de ces différents comportements et destins cellulaires fait du cnidaire *Clytia hemisphaerica* un modèle biologique prometteur pour étudier les rôles morphogénétiques de l'apoptose et notamment la FCA.

La présence d'une grande diversité de caspases chez les cnidaires, qui possèdent des prodomaines courts ou longs (aussi bien des domaines DED que des CARD) fait de ces taxons des espèces extrêmement intéressantes pour étudier l'évolution des voies apoptotiques. On soulignera donc la conservation de ces acteurs fondamentaux de l'apoptose à l'échelle des eumétazoaires (Cnidaires + Bilatériens). Ce point est d'autant plus intéressant que les caspases-CARD de cnidaires ne sont pas aisément identifiables en tant que telles car leurs séquences sont très divergentes par rapport aux caspases connues chez les bilatériens. Par conséquent, *Clytia* s'avère être, en tant que cnidaire, en plus d'un « bon » modèle expérimental pour l'étude de la FCA, un organisme de choix pour explorer la probable diversification des voies de signalisation apoptotiques et leur évolution. De plus, chez cet animal, l'apoptose est particulièrement facile à induire artificiellement (grâce à l'ajout de DMSO ou d'éthanol), elle est prédictible au cours de la métamorphose de la larve, et elle est aussi présente de façon permanente (?) et continue au bout des tentacules des polypes issus de la reproduction coloniale (asexuée), offrant ainsi des cadres bien différents pour étudier l'apoptose.

La mise en évidence des fonctions constructrices de l'apoptose (FCA) chez le tunicier *Ciona intestinalis*.

Chapitre II, page 145

Nous avons émis l'hypothèse que la migration des PGC lors de la régression caudale de la cione soit de l'apoptose constructrice, puisque la migration peut être bloquée par l'exposition à un inhibiteur ubiquitaire de caspases. Lors de la métamorphose du têtard de cione, j'ai pu montrer :

- A l'aide de traitements pharmacologiques, que l'expression de Ci-*hox12* peut être modulée et que ce gène contrôle la vague apoptotique polarisée dont dépend la régression caudale.

240

- Grâce à ces traitements, il nous a été possible de contrôler la vitesse de propagation de la vague apoptotique et d'observer l'effet sur la migration des cellules germinales primordiales (PGC). Une approche statistique a permis de mettre en évidence que la vitesse de migration des PGC est corrélée avec la vitesse de propagation de la vague d'apoptose.

L'ensemble de ces données expérimentales montre que la migration des PGC chez *Ciona* entre dans la définition de la fonction constructrice de l'apoptose.

Après la mise en évidence de FCA au cours de la régression caudale, il me parait nécessaire d'identifier les cibles potentielles des caspases et leurs effets dans les cellules cibles afin de mieux comprendre comment ces protéases induisent la migration des PGC. L'identification de ces mécanismes à l'échelle moléculaire permettra dans un second temps de poursuivre les expérimentations fonctionnelles et d'effectuer des comparaisons avec les différents mécanismes de FCA mis en évidence chez d'autres métazoaires. Il nous sera ainsi permis d'émettre des hypothèses sur l'évolution de la FCA et de l'apoptose en général. Afin d'initier cette démarche, une approche par analyse transcriptomique différentielle a été réalisée durant ma thèse. Elle consistait à évaluer l'expression des gènes au cours de la régression caudale en condition physiologique par opposition à une condition avec traitement à l'inhibiteur ubiquitaire de caspases Z-VAD-Fmk (Matériels et méthodes page 247).

Les séquences issues de ce travail ont été obtenues très tardivement, alors que l'écriture de ce manuscrit était déjà largement avancée. Pour ces raisons, il n'a pas été possible d'analyser le jeu de données fourni après le séquençage dans un laps de temps raisonnable. Le faire aura vraisemblablement conduit à une analyse trop hâtive souffrant d'un manque de recul. Par conséquent, et bien que faisant partie intégrante de ma thèse, ce travail sera poursuivi ultérieurement. Il apparaît cependant que, grâce aux analyses préliminaires déjà réalisées, certains gènes d'intérêt présentent des différences d'expressions significatives entre les conditions témoin et le traitement, témoignant d'un effet de l'inhibiteur de caspases.

L'évolution convergente des voies de signalisation apoptotiques?

Chapitre III, page 193

En lien avec les différences assez importantes que j'ai pu souligner tout au long de ce travail à propos des voies décrites chez les modèles biologiques classiques (nématode, drosophile, mammifère) mais aussi sur la base des nombreux biais rencontrés dans les analyses phylogénétiques proposées de la littérature, j'ai été conduit à émettre l'hypothèse que les voies de signalisation apoptotiques mitochondriales sont convergentes à grande échelle évolutive. Cette absence de conservation parait surprenante car elle déroge avec une vision classique qui sous-tends qu'un tel processus, aussi fondamental, pourrait être fortement contraint tant dans toutes les étapes de son déroulement que dans son aboutissement ultime, la mort cellulaire. En fait, cette vision singulière fait abstraction de la variabilité intrinsèque propre à chaque organisme, de la diversification des familles de gènes qui, bien qu'héritées, sont propres à chaque organisme, et enfin de la plasticité phénotypique. D'une façon presque paradoxale, le postulat sur la conservation d'un tel processus, de son unicité, résulte non pas des faits mais d'une vision très « ordonnée » des voies de signalisation conduisant à l'apoptose. Ainsi, les rôles de la sélection naturelle mais aussi, très probablement, de contraintes évolutives de natures diverses, dont les jeux aboutissent à un type de mort cellulaire dont les caractéristiques sont similaires, sont *de facto* mis de coté. Mais revenons à nos résultats expérimentaux :

- Grâce à des approches phylogénétiques, j'ai montré que les caspases initiatrices des voies mitochondriales des modèles biologiques classiques ne sont pas orthologues, c'est-à-dire homologues au sens strict. Il en est de même pour les gènes Bcl-2.

- Ces mêmes analyses ont révélé que la cione avait probablement perdu, à l'instar des autres tuniciers, la caspase 9 ainsi que la protéine adaptatrice qui lui est associée, Apaf-1, faisant de la voie mitochondriale potentielle de *Ciona* une voie de signalisation à part entière mais singulière au même titre que chacune des voies présentes chez d'autres métazoaires (nématode, drosophile, mammifère, mollusque,...).

- Des approches expérimentales ont montré que la caspase 2 de *Ciona* intervient dans la régression caudale (inhibiteur) et que les gènes de la famille Bcl-2 sont exprimés (hybridations *in situ*).

Ces travaux montrent que les voies de signalisation apoptotiques mitochondriales sont convergentes et non homologues, suggérant que des contraintes évolutives maintiennent une mort par apoptose quelles qu'en soient les régulations moléculaires sous-jacentes. Ainsi, il existe probablement de multiples voies mitochondriales dont les acteurs ont évolué indépendamment au sein des grands phylums de métazoaires. Cependant, le rôle central de certains des acteurs conduit à s'interroger sur l'origine unique ou non de certaines « parties » de ces voies, ou sur d'éventuels recrutements de systèmes de signalisation.

Cette étude confirme que se baser uniquement sur les vertébrés ou sur tout autre groupe spécifique est problématique pour la compréhension d'un processus global, comme la mort cellulaire. Elle met aussi l'accent sur la vision caricaturale, normative, qui considère comme une référence, une norme, l'ensemble des données acquises dans un petit groupe d'animaux (voire une espèce) et à partir desquelles une généralisation est proposée pour l'ensemble des métazoaires. Du point de vue de la démarche, le propos est à relativiser. En ce qui concerne les caspases, l'identification des pro-domaines résulte naturellement d'une comparaison directe avec ceux des vertébrés qui, parce que mieux connus, servent de références. Cependant, l'identification des caspases initiatrices potentielles s'effectue grâce à la reconnaissance des pro-domaines DED et CARD. Bien que ces derniers soient présents à l'échelle des métazoaires, leur identification est rendue difficile car la structure de ces domaines s'éloigne fortement de celle des vertébrés. Par conséquent, il est possible que des pro-domaines ne soient pas reconnus car tout simplement non présents chez les vertébrés. L'existence de pro-domaine longs, qu'il n'est pas possible d'identifier, pourrait indiquer une interaction avec des protéines adaptatrices ne possédant ni domaine CARD ni domaine DED chez des espèces non-vertébrés. Ce biais, qui paraît probable, pourrait empêcher d'identifier des caspases initiatrices en dehors des vertébrés.

II. ULTIME RÉFLEXION SUR L'APOPTOSE

Les conclusions et perspectives de chacun de mes travaux sont présentées en fin de chacun des trois chapitres qui leurs sont consacrées. En revanche, il me paraît important de discuter ici certains sujets pour le moment peu ou pas abordés, car s'éloignant du cadre plus restrictif de mes travaux (articles soumis ou en préparation).

L'apoptose a été mise en évidence chez plusieurs groupes de métazoaires, aussi bien des protostomiens et des deutérostomiens que des cnidaires mais aussi des spongiaires. En d'autres termes, elle est présente chez tous les organismes chez qui elle a été recherchée. Compte tenu de cette répartition phylogénétique, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que « l'apoptose » (au sens large) est présente ancestralement chez les métazoaires, conclusion logique car la plus parcimonieuse, mais qui conduit à deux réflexions :

1) La fonction ancestrale des caspases est-elle son implication dans la signalisation apoptotique ? Autrement dit, les activités de ces protéases dans d'autres voies moléculaires, dans un cadre apoptotique ou non, sont-elles des recrutements secondaires ? ou bien, est-ce le contraire ? ou bien encore, quel lien y a-t-il entre apoptose et différenciation cellulaire ?

2) La mort cellulaire (*i.e.* par apoptose) est-elle indispensable pour la morphogenèse d'organismes pluricellulaires ?

II.1 La fonction ancestrale des caspases

Nous avons vu, au travers de l'introduction de ce manuscrit, que les caspases sont classiquement séparées en deux familles fonctionnelles, au moins chez les vertébrés, avec d'une part, les caspases inflammatoires et d'autre part, les caspases apoptotiques. Cela suggère que l'un des deux rôles puisse être ancestral et le second dérivé (ici la fonctionnalité est associée à un caractère). Pourtant, les caspases apoptotiques sont capables, à l'instar des caspases inflammatoires, d'activer des voies moléculaires autres que celles liées à l'apoptose (*i.e.* FCA).

Si l'on reporte sur un arbre phylogénétique des métazoaires les occurrences de FCA attestées ou suggérées (Figure 78), la question sur le rôle ancestral des caspases se pose puisque l'on se rend compte qu'il est plus parcimonieux de considérer la FCA comme ancestrale aux métazoaires, si l'on admet qu'elle n'a pas encore été mise en évidence au sein de certains phylums. Ces données

invitent à s'interroger sur la conclusion, peut-être prématurée, stipulant que le rôle ancestral des caspases soit leur implication dans l'apoptose. Faire un état de l'art sur l'ensemble des rôles des caspases permettrait de discuter de ce point avec plus de pertinence. De plus, outre la FCA que j'ai présentée de façon exhaustive, il a été rapporté que des caspases apoptotiques peuvent être impliquées dans la réponse inflammatoire, mais peuvent aussi contrôler des morts cellulaires autres que l'apoptose ou encore intervenir dans des cadres non apoptotiques comme la différenciation cellulaire.



Figure 78: Répartition sur un arbre phylogénétique des métazoaires de la fonction constructrice de l'apoptose attestée (\mathbb{C}) et suggérée (\mathbb{C} ?) par la littérature. La présence de FCA et donc des rôles non apoptotiques des caspases au nœud des eumétazoaires est le scénario le plus parcimonieux.

II.1.a. Les caspases apoptotiques dans le système immunitaire

La mise en évidence, de plus en plus récurrente et dans plusieurs groupes phylogénétiques de métazoaires, de la FCA montre que cantonner les caspases « apoptotiques » à un seul rôle apoptotique est trop réducteur. De plus, il apparaît que les caspases apoptotiques interviennent également dans le système immunitaire. Il me faut rappeler rapidement certains aspects de la voie d'intervention de la caspase 1 dans la réponse inflammatoire chez les mammifères, afin de présenter ensuite l'intervention des caspases apoptotiques. La pro-caspase 1 possède un pro-domaine CARD, qui permet son recrutement par une protéine adaptatrice avec qui elle forme, entre autre, l'inflammasome. Ce dernier active les pro-caspases 1, qui sont libérées dans le cytoplasme et clivent les interleukines Il-1B, une capacité que possède également la caspase 5.

De façon surprenante, la caspase apoptotique initiatrice 8 peut également cliver l'Il-1B (Maelfait *et al.*, 2008), et l'intervention des protéines adaptatrices TRADD et FADD semble également nécessaire (Lamkanfi & Dixit, 2014).

Chez la drosophile, la caspase Dredd (= Dcp-2), considérée comme orthologue (ce que tend à confirmer mes analyses phylogénétiques – résultats non fournis) à la caspase 8 des vertébrés, joue un rôle non apoptotique dans la réponse immunitaire. Les drosophiles mutantes *dredd* sont plus sensibles aux bactéries Gram- et produisent moins d'antibactériens de type drosomycine notamment (Shalini *et al.*, 2015). A l'échelle moléculaire, une interaction physique entre Dredd et Relish active cette dernière, déclenchant la réponse immunitaire (Stöven *et al.*, 2003).

Ces données montrent que la frontière entre caspases inflammatoires et apoptotiques s'efface au fur et à mesure de l'émergence de nouvelles données. Par conséquent, il est difficile aujourd'hui d'émettre une hypothèse sur la fonction ancestrale, qu'elle soit apoptotique ou bien immunitaire. De plus, bien que la discussion précédente fasse principalement état des mammifères et de la drosophile, il est reconnu que les caspases sont aussi profondément impliquées dans le système immunitaire des mollusques (Kiss *et al.*, 2010, Romero *et al.*, 2015)

Ces réponses inflammatoires, de manière surprenante, déclenchent une mort cellulaire appelée « pyroptose » chez les mammifères, montrant que l'apoptose n'est pas une mort cellulaire ayant l'exclusivité des caspases.

II.1.b. Les caspases apoptotiques dans d'autres types de morts cellulaires

La mort par pyroptose n'est pas le seul exemple de mort cellulaire chaperonnée par des

caspases. La caspase initiatrice 8 peut être impliquée notamment dans la nécroptose, un cas particulier de mort cellulaire où le taux d'activité de la caspase 8 est faible. C'est le taux de protéine cFLIP (indicateur de l'activité de la caspase 8), contrôlant la capacité de RIP1 à former le complexe protéique activateur de la pro-caspase-8 (le DISC), qui fait basculer la signalisation vers de l'apoptose ou de la nécroptose (Shalini *et al.*, 2015.).

Les caspases peuvent également intervenir dans la régulation de la « catastrophe mitotique », mort cellulaire intervenant en cas de mitose avortée ou mal régulée (Castedo *et al.,* 2004 ; Galluzzi *et al.,* 2012). Les altérations de l'ADN nucléaire entraînent l'intervention de la « *DNA-Dammage response* », avec activation de la caspase 2.

Plusieurs morts cellulaires caspase-dépendantes sont vues comme des différenciations, telles que la cornification (Candi *et al.*, 2005). Ce processus permet la formation de la couche externe de la peau chez les mammifères. Les kératinocytes qui meurent de cette façon prennent le nom de cornéocytes. Plusieurs enzymes et protéines interviennent dans ce processus, notamment les transglutaminases-1, 3 et 5 mais également la caspase 14. Les substrats de ces enzymes sont, par exemple, des filaggrines, des loricrines ou encore des involucrines, qui permettent la différenciation des kératinocytes ainsi que l'imperméabilisation de la peau. La fonction de la caspase 14 est mise en avant par Denecker *et al* (2007), qui montrent que des souris mutantes présentent des problèmes dans la composition de la *stratum corneum* (couche cornée de la peau) provoquant une plus grande sensibilité aux UVs ou à la déshydratation (Denecker *et al.*, 2008).

L'implication de plusieurs caspases dans des morts cellulaires autres que l'apoptose montre que leur activité de protéases est fondamentale dans des processus autres que la FDA, la FCA ou l'immunité. Si des morts cellulaires sont considérées comme des différenciations ultimes, les caspases apoptotiques sont également impliquées dans des différenciations non létales.

II.1.c. Les caspases apoptotiques dans la différenciation cellulaire

Chez la drosophile, on sait que la caspase initiatrice de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale, Dronc, contrôle la différenciation des SOPs (*Sensory Organ Precursors*) qui donneront les organes sensoriels que sont les macrochètes qui font partie intégrante du système nerveux périphérique. Ce sont ces structures qui sont surnuméraires après mutation de *dark*, puisque au lieu de 4 macrochètes (2 sur chaque flan), 6 sont présentes. On sait que Wingless est une protéine nécessaire pour leurs formations, et qu'elle est négativement régulée par la protéine Shaggy (Sgg46)

sous sa forme active. La protéine DmIKK (*Drosophila* IKK-related kinase), en dégradant dIAP-1, permet le déclenchement de la voie d'activation de Dronc (rappelons que, chez la drosophile, la voie d'activation des caspases passe par une levée d'inhibition). Dronc clive Sgg46, ce qui l'active et bloque Wingless. Ici, c'est un rôle non apoptotique qui est mis en avant pour la caspase Dronc, puisque c'est sa capacité à cliver et activer d'autres protéines qui permet le bon déroulement de la formation des SOPs (Kanuka *et al.*, 2005 ; Karanaga *et al.*, 2006).

Cet exemple illustre le cas de la drosophile, mais il en existe de nombreux mettant en évidence le rôle des caspases apoptotiques dans la différenciation de types cellulaires chez les mammifères. C'est le cas pour les megakaryocytes, les érythrocytes et les cellules de la lentille oculaire par exemple (Ishizaki *et al.*, 1998 ; Zermati *et al.*, 2001). Dans l'ensemble de ces cas, c'est l'énucléation par les caspases qui permet la différenciation finale.

Les cellules souches embryonnaires sont capables de se maintenir et de s'auto-renouveler. Un certain nombre de facteurs de transcription sont impliqués dans ce maintien, qui sont Oct4, Sox2 et Nanog. L'expression de ces trois gènes doit être maintenue afin de permettre le renouvellement permanent de ces cellules. En effet, en tant que facteurs de transcription, ils contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et ils inhibent ceux impliqués dans la différenciation. Or, Nanog a la particularité de se retrouver sous forme clivée dans les cellules en différenciation. L'étude des ESCs (*Embryonic Stem Cells*) a permis de mettre en évidence le rôle des caspases dans ce clivage (Fujita *et al.*, 2008). Les auteurs ont constaté l'activité des caspases grâce à une protéine qui fluoresce après clivage (EYFP), ainsi que par Western Blot. Aucun signe d'apoptose n'a été remarqué, et de manière intéressante, un traitement au Z-VAD-Fmk (pan-caspase inhibiteur) stoppe la différenciation, et ce, après que celle-ci ait été induite, confirmant ainsi le rôle des caspases. Il a été mis en évidence que la caspase apoptotique exécutrice 3 est responsable du clivage de Nanog au niveau de son domaine N-terminal de l'homéodonaine, provoquant une déstabilisation suivie de sa dégradation.

Ces exemples de différenciations caspases-dépendantes montrent que les capsases peuvent être impliquées dans des processus variés et dans des cadres non apoptotiques autres que l'immunité ou une mort cellulaire.

II.1.d. Le rôle ancestral des caspases

L'ensemble des exemples que j'ai utilisé précédemment concerne les mammifères et la drosophile, puisqu'en tant que modèles biologiques classiques, la majorité des travaux sur l'activité

des caspases portent sur ces deux types de modèles expérimentaux. Ils montrent pourtant déjà que le rôle des caspases semble fondamental dans nombre de processus, et que le limiter à la réponse inflammatoire, ou bien à l'apoptose, est trop restrictif. Ces exemples non-exhaustifs, complétés avec les éléments que j'ai présentés en introduction de ce manuscrit, mettent en évidence que les caspases peuvent intervenir dans la régulation de plusieurs comportements ou destins cellulaires, dans des cadres apoptotiques ou non, et être responsables de morts cellulaires autres que l'apoptose.

Pris dans leur globalité, ces données montrent qu'il est difficile de statuer sur la fonction ancestrale des caspases comptetenu de leur diversité. Il apparaît clairement que l'activité de protéase de ces protéines offre nombre de possibilités dans leurs utilisations qui pourraient expliquer leurs recrutements dans des voies moléculaires aussi variées au cours de l'évolution. Surtout, cela laisse vraisemblablement une grande place à la convergence, notion qui prend tout son sens à la lumière des travaux présentés en CHAPITRE III et montrant que les voies de signalisations apoptotiques mitochondriales ne sont pas homologues.

Par conséquent, les propriétés fonctionnelles des caspases font que cette famille multigénique est peut être exposée aux exaptations (c'est-à-dire, à des changements globaux de fonctions tout en conservant la même structure).

La vision historique des caspases qui les voit impliquées dans l'apoptose, couplée au fait que plus de la moitié d'entre-elles participe à sa régulation (chez les mammifères), laisse supposer un rôle ancestral apoptotique, avec par la suite des recrutements secondaires dans d'autres voies moléculaires. Cependant, cette vision découle du fait que les caspases ont été principalement étudiées dans un cadre apoptotique. De plus, faire des inférences évolutives nécessite d'abord de mieux connaître leurs fonctions chez des groupes autres que mammaliens ou ecdysozoaires. Par conséquent, si les fonctions des caspases étaient répertoriées sur un arbre phylogénétique pour en déduire un scénario évolutif, il serait compliqué de statuer sans s'exposer à des biais importants. De plus, même si les cas d'organismes chez qui la FCA a été mise en évidence (ou encore les cas d'implication des caspases dans le système immunitaire) sont moins nombreux que ceux présentant de la FDA, leurs répartitions phylogénétiques au sein des métazoaires impliquent que ces fonctions soient largement distribuées et probablement découvertes dans le futur chez d'autres taxons.

Enfin, nous avons vu que les caspases sont impliquées dans plusieurs types de morts cellulaires. Parmi celles-ci, l'apoptose semble prépondérante. On pourrait émettre l'hypothèse que le rôle dans l'apoptose est ancestral, et que la capacité des caspases à induire de la mort cellulaire a abouti à un recrutement secondaire dans la réponse immunitaire. L'idée d'un rôle ancestral des caspases dans la mort cellulaire (impliquant que les rôles non apoptotiques de celles-ci soient

secondaires) est fondée sur le fait que de nombreux auteurs affirment que la pluricellulairité nécessite d'avoir, pour être viable, un mécanisme de contrôle des cellules orchestré par de la mort cellulaire programmée.

Dans un tel cadre, l'étude des rôles morphogénétiques de l'apoptose et des fonctions diverses des caspases, doit être abordée chez des organismes présentant des positions phylogénétiques clés pour nous éclairer sur les rôles ancestraux de ces protéases, tels que les spongiaires, les placozoaires ou encore les cnidaires.

II.2 La mort cellulaire, un prérequis pour la pluricellularité ?

Les organismes unicellulaires représentent la majorité des êtres vivants en terme de biodiversité, et sont majoritaires dans les trois grands domaines du vivant que sont les bactéries, les archées et les eucaryotes.

Cependant, plusieurs fois au cours de l'évolution et de façon indépendante fut acquis la pluricellularité. Celle-ci implique un haut degré de coordination, de communication et d'interaction entre les cellules de l'organisme. Plusieurs auteurs suggèrent (voire affirment) au travers des revues sur l'apoptose, que la présence de mort cellulaire programmée (*i.e.* par apoptose) est essentielle pour un organisme pluricellulaire, permettant, par un « suicide altruiste » des cellules, la régulation globale des populations cellulaires. Cette idée parait logique et facile à accepter, mais la discuter pourrait éclairer sur une vision qui semble également admise de fait.

Si des acquisitions convergentes de la pluricellularité ne manquent pas dans les phylums actuels (Metazoa, Chlorobionta, Fungia), les données paléontologiques témoignent de la présence d'organismes pluricellulaires sans représentants actuels comme le groupement fossile Gabonionta daté de 2.1 milliards d'années (Paléoprotérozoïque ; Rhyacien de la République gabonaise) (El albani *et al.*, 2010) ou encore les faunes de l'Ediacarien, dernière période du Protérozoïque et précédant le Cambrien, qui sont largement documentés en espèces mais pour la majorité unique en leur genre. Les métazoaires, comprenant actuellement environ 1.35 millions d'espèces, sont avérés par *Kimberella* (Glaessner & Wade, 1972), daté de 555 millions d'années (Néoprotérozoïque – Ediacarien d'Australie et Fédération de Russie) (Martin *et al.*, 2000), sachant que des traces possibles de spongiaires ont été trouvées vers 645 Ma (Néoprotérozoïque – Cryogénien ; Varangien d'Australie). Cependant, l'âge moléculaire estimé du clade est de 940 millions d'années (Néoprotérozoïque – Tonien) (Nikoh *et al.*, 1997). Les métazoaires ne sont donc pas les premiers

organismes pluricellulaires apparus au cours de l'évolution.

La pluricellularité implique la cohabitation de populations cellulaires différentes, avec possiblement l'apparition de cellules égoïstes (ou « tricheuses ») qui peuvent mettre à mal la cohérence de l'organisme. Ainsi la présence de mort cellulaire pourrait avoir un rôle de prévention (Moreno & Rhiner, 2014).

La théorie darwinienne pluricellulaire est une théorie voyant la sélection naturelle s'appliquer au niveau cellulaire, avec une sélection des populations cellulaires dites les plus aptes, parmi plusieurs (Moreno & Rhiner, 2014).

Il est par exemple bien documenté qu'une compétition existe entre neurones pour avoir accès aux ressources, comme la nutrition ou bien encore l'espace. Un tel mécanisme provoque la multiplication d'une population cellulaire au détriment des autres, qui peuvent être éliminées (Levi-Montalcini, 1987).

Chez la souris, il a été montré que les cellules pluripotentes de l'épiblaste, lors de leurs différenciations, présentaient un taux d'apoptose particulièrement élevé, indiquant que certaines cellules filles prolifèrent aux détriments d'autres qui sont éliminées. L'ajout artificiel d'une population cellulaire supplémentaire (*iMOS-System*) a induit une « sur-compétition » pouvant être bloquée par inhibition de l'apoptose. Par conséquent, le succès d'une population cellulaire dépend aussi de sa capacité à éliminer les autres par apoptose (Claveria *et al.*, 2013). Un tel mécanisme pourrait être un avantage adaptatif indéniable, d'autant plus que l'apparition de « cellules tricheuses » chez les organismes pluricellulaires (*i.e.* cancer) est souvent dûe à des problèmes de contrôle des populations cellulaires, conséquence de défauts d'apoptose.

De manière intéressante, de la mort cellulaire programmée existe chez d'autres phylums pluricellulaires tels que les plantes (Reape & McCabe, 2010).

Plusieurs type de morts cellulaires ont été décrits dans ce phylum, avec notamment l'une d'entre elle considérée comme « de type apoptotique » (AL-PCD – *Apoptotic-like Programmed Cell Death*). Bien que les caspases ne soient pas présentes en dehors des métazoaires, la présence de métacaspases, des protéases clivant sur un résidu aspartate, est attestée. Elles sont impliquées dans l'AL-PCD chez les plantes, mort cellulaire qui résulte notamment d'une surconcentration de ROS. De manière intéressante, comme pour les métazoaires, cette mort cellulaire est également impliquée dans le système immunitaire.

La mitochondrie semble avoir une place centrale dans la régulation de la AL-PCD. De plus, un rétrécissement cellulaire conduisant à une condensation du cytoplasme puis une fragmentation nucléaire est observé. Mais surtout, la présence de « vacuoles » semble indiquer que le matériel
biologique peut être recyclé et qu'il n'y pas déversement du contenu cellulaire à l'instar de l'apoptose.

La présence de mort cellulaire programmée chez les phylums d'organismes pluricellulaires tend à confirmer qu'elle a une place prépondérante dans l'établissement de la pluricellularité. De plus, le fait que chez les plantes également le recyclage soit l'une des caractéristiques de l'AL-PCD, ainsi que la prévention du déversement du contenu cellulaire soit non contrôlée, témoignent de l'importance potentielle de ses caractéristiques.

Ces éléments, suggérant que la mort cellulaire programmée semble avoir une place importante dans l'émergence de la vie pluricellulaire, font que l'apoptose pourrait être une mort cellulaire avantageuse aboutissant à une sélection positive de celle-ci, d'où sa présence et son maintien chez (tous ?) les phylums de métazoaires.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'ensemble des expérimentations et des analyses effectuées au cours de ma thèse est regroupé dans cette partie, dans le but d'en faciliter la lecture.

I. CIONA INTESTINALIS

Matériel biologique

Les adultes de *Ciona intestinalis* ont été collectés durant la période de reproduction de Mars à Septembre à la Station de Biologique de Roscoff (Finistère, France). Elles sont ensuite maintenues en aquarium en eau de mer artificielle (ODM) à une salinité de 35 ‰ et à une température de 18°C. Les gamètes sont obtenus par dissection d'abord de l'oviducte (gamètes femelles) puis du spermiducte (gamètes mâles). La fécondation est réalisée en mélangeant les gamètes mâles et femelles issus d'individus différents. L'ensemble de l'ODM utilisé pour la fécondation et le développement des larves est filtré à 0,22 µm.

Protocole de fécondation :

 Disséquer les ciones afin d'obtenir séparément des ovocytes (Falcon 50) et du sperme (Eppendorf).

- Rincer les ovocytes dans 20 mL d'ODM.
- Activer le sperme pendant 10 min par ajout de quelques gouttes d'ODM contenant des ovocytes.

 Enlever le surnageant dans le Falcon 50 une fois les ovocytes décantés, puis ajouter 20mL d'ODM.

- Faire la fécondation en ajoutant 2 à 3 gouttes de sperme activé en faisant des fécondations

croisées.

- Laisser décanter 10 min.
- Enlever le surnageant,
- Rincer les ovocytes fécondés en ajoutant 30/40 mL d'ODM.
- Laisser décanter 20/30 min.
- Enlever le surnageant, ajouter 20 mL d'ODM complémentée avec 0,1M d'hépès à pH 8.
- Mettre en boîte de Pétri (préalablement trempée dans de l'ODM une nuit).

Déchorionation des ovocytes:

Les zygotes sont déchorionés par traitement enzymatique juste après la fécondation grâce à une agitation modérée constante dans 10 ml d'ODM contenant 1% de Thioglycolate de sodium et 0,05 % de Pronase E, et dont le pH a été porté à 10 par ajout de NaOH. La réaction est stoppée par ajout de 1 mL de Glycine à 1 M. Les zygotes sont ensuite rincés cinq fois en ODM contenant 0,5% de *« bovin serum albumin »* (BSA), puis déposés dans une boîte de Pétri recouverte d'agar *low melting* 1.5 % et contenant de l'ODM à 0,1 M d'hépès et 0,05 % de BSA, dans laquelle le développement va se dérouler jusqu'au stade voulu.

<u>Électroporation</u>:

Les zygotes sont électroporés 10 min. avant la première division. Les zygotes sont contenus dans 100 μ L d'ODM complémentée avec 0,1 M d'HEPES et 0,5 % de BSA, puis sont ajoutés 200 μ L de D-Manitol à une concentration de 0,96 M ainsi que 50 μ L de TE contenant 60 μ g de plasmides d'intérêt.

L'électroporation se fait avec l'électroporateur BioRad GenePulsrerXcell (protocole *SquareWave*) à 25 V, 32 ms dans des cuvettes de 4 mm.

Fixation et stockage :

Les larves utilisées pour les marquages TUNEL sont fixées en tampon phosphate (PBS - *phosphate-buffered saline*) 1X contenant 3,7 % de formaldéhyde durant 30 min. à température ambiante (RT – *Room Temperature*). Pour les autres marquages immunofluorescents, elles sont fixées en PBS 1X contenant 4 % de paraformaldéhyde pendant 30 min. et à température ambiante (20°C). Les larves utilisées pour les hybridations *in situ* sont fixées 2 h à 4°C en MEM-PFA (4% paraformaldéhyde, 0,1 M MOPS pH 7,4, NaCl 0,1 M, EGTA 1 mM, MgSO4 2 mM, Tween-20 0,05 %).

Après fixation, les larves sont rincées trois fois en PBS et déshydratées par bains successifs de PBS/éthanol jusqu'à atteindre 100 % d'éthanol. Elles sont stockées en éthanol 100% à -20°C. La réhydratation se fait par bains PBS/éthanol successifs jusqu'à atteindre 100 % de PBS.

Marquage TUNEL et immunomarquages VASA:

Les marquages TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP nick end labelling) sont réalisés avec le kit Roche *In Situ* Cell Death Detection Kit (Fluorescein) selon les consignes du fabricant. Les larves sont perméabilisées avec du PBS contenant 0.2 % de Triton X-100 durant 30 min. puis rincées 3 fois en PBS. Le marquage est ensuite réalisé dans 125 µL de mélange réactionnel contenant l'enzyme terminal transférase et les nucléotides fluorescents (Enzyme solution plus Label solution) pendant 1h15 min. à 37°C en chambre humide. Le contrôle négatif est lui incubé avec la solution contenant uniquement les nucléotides fluorescents (sans enzyme, bruit de fond éventuel). Avant le marquage, le contrôle positif est lui exposé pendant 10 minutes à une solution de DNAse grade I à une concentration de 1 mg/ml de à RT afin de générer des cassures qui seront toutes marquées par la réaction TUNEL. Les larves sont ensuite rincées 3 fois en PBS.

Après le marquage TUNEL les larves sont incubées toute la nuit à 4°C dans du PBS contenant 0,1% de Tween-20 (PBT), 3 % de BSA et l'anticorps primaire CiVH (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006) à une concentration de 1/500^e. La solution est ensuite récupérée et conservée à 4°C (peut être réutilisée plusieurs fois). Les larves sont ensuite rincées 3 fois 1 h en PBT. Les échantillons sont incubés 2h à RT en PBT 3 % BSA contenant du Hoecht (1/1000) et l'anticorps secondaire (1/10 000). Les larves sont rincées 3 fois en PBS et montées entre lame et lamelle dans le milieu de montage, le Mowiol.

Traitements pharmaceutiques des larves

Après éclosion les larves sont distribuées en petite boîte de Pétri dans un volume de 3 mL d'ODM. Trois réplicats techniques sont réalisés par traitements et par fécondation (une fécondation étant un réplicat biologique). Lorsqu'il y a un maximum de larves fixées et juste avant le début de la régression caudale (la queue des larves ne bouge plus), l'ODM est remplacée par de l'ODM contenant les traitements pharmaceutiques. Les traitements visant à moduler la régression caudale sont appliqués avec une concentration finale de : 10 μ M de SU-5402, 1,5 μ M d'acide rétinoïque (RA) et 150 μ M de diéthylaminobenzaldehyde (DEAB).

Tous les inhibiteurs de caspases sont utilisés à une concentration finale de 10 μ M (Z-AEVD-Fmk, Z-IETD-Fmk, Z-LEHD-Fmk, Z-VAD-Fmk, Z-VDVAD-Fmk) Ces traitements sont renouvelés toutes les deux heures.

<u>RT-PCR</u>

La RT-PCR a été effectuée avec la SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (18064014 - ThermoFisher Scientific) selon le protocole du fabricant. L'ajout de 1µL de RnaseOUT (10777019 - ThermoFisher Scientific) a été effectué pour une durée de 30 min. à 37°C avant amplification.

Extraction d'ARN et préparation RNAseq

Les larves à l'éclosion, pour chaque fécondation, ont été divisées en deux lots. Après fixation des larves, un lot a été maintenu en ODM et utilisé comme témoin physiologique. Le second a été exposé à l'inhibiteur pan-caspases Z-VAD-Fmk, avec un renouvellement du traitement toutes les 2 h. Deux stades ont été analysés, initiation de la régression caudale et mi-régression. Nous avons donc réalisé quatre points, avec pour chacun trois réplicats biologiques soit 12 séquençages.

L'ARN a été extrait avec le RNAqueousTM-Micro Total RNA Isolation Kit (AM1931 – ThermoFisher Scientific) selon le protocole du fabricant. Un traitement DNAse a été fait avec le TURBO DNA-*free*TM Kit (AM1907 - ThermoFisher Scientific). L'ARN a été purifié une seconde fois avec le kit RNeasy MinElute Cleanup Kit (74204 – Qiagen) selon le protocole du fabricant. L'élution a été réalisée dans 16 μ L d'H2O.

La qualité a été estimée à l'Experion RNA HighSens (700-7155 – BioRad) à partir d'1 μ L (0,1 μ L d'ARN avec 0,9 μ L d'H2O) selon le protocole du fabricant. La concentration a été évaluée au NanoDrop.

L'extraction de l'ARN pour les RT-qPCR a été effectuée de la même façon que celui pour le RNA seq.

<u>q-PCR</u>

Programme q-PCR sur machine Biorad:

Activation 10 min
40 cycles d'amplification:
15 s à 95°C
10 s à 60°C
20 s à 72°C
Courbes de fusion réalisées par une acquisition tous les 0,5°C de 65°C à 95°C.

Mix q-PCR:

10 microL / puits

Echantillons		T- négatifs	
SyBrGreen	5	SyBrGreen	5
Fw	0.5	Fw	0.5
Rv	0.5	Rv	0.5
H2O	2	H2O	4
cDNA	2	cDNA	0

Gamme q-PCR

	cDNA + H	[20
<u>D</u>		38
1/5	20	80
1/25	20	80
1/50	30	30
1/100	30	30
1/200	30	30
1/400	30	30

La gamme de départ (D), comprend 3 μ L de cDNA (1 μ L issu respectivement de MTB, LTB, larve nageante) dans 17 μ L d'eau.

Les cDNA des échantillons d'intérêts ont été utilisés après dilution au 1/50.

L'expression des gènes cibles a été évaluée pour 4 stades : MTB, LTB, larves nageantes et larves fixées (avec régression caudale initiée). Pour chaque stade (sauf larves fixées), trois réplicats biologiques ont été effectués (sauf pour les larves fixées représentées par une seul réplicat). Pour chaque réplicat biologique trois réplicats techniques ont été réalisés.

L'expression d'un échantillon a été calculée avec la moyenne des trois réplicats techniques correspondants. Les différences d'expression entre les stades ont été évaluées avec des tests statistiques Kruskal-Wallis avec le logiciel R 2.14.1.

Les gènes standards sont *r27a* (Castellano *et al.*, 2014) et l'*actine* (Vizzini *et al.*, 2008). Les fragments font entre 140 et 160 paires de bases.

Nom du gène	Référence	Amorce	Séquence
actine	AJ297725	forward	TGATGTTGCCGCACTCGTA
		reverse	TCGACAATGGATCCGGT
r27a	KYOTOGRAIL2005.209.6.1	forward	ATCCACCCTTCACCTTGTG
		reverse	GGAGATCTTGCCATTTTCA
Ci-bok	KH.L87.39.v1.A.SL2-1	forward	GCGACAAATCGGATACGTGT
		reverse	TGCAGTCAACAGCCATAGCA
Ci-bax	KH.C4.794.v1.A.SL2-1	forward	TGTACTGGGGCAACATCGA
		reverse	GCTCAACTGGGCTGTTCTC
Ci-casp. 8/10	KH.C8.550.v1.A.SL1-1	forward	AAGACTGCTTTGTGTGCGTG
		reverse	GGCAGGCTTGGAAGAAAAATAT
Ci-bcl-xl	KH2012:KH.S653.2	forward	GGAGGTGGAAGACAACCATG
		reverse	CACCCAGTAAGCTCGGTGT

II. CLYTIA HEMISPHAERICA

Matériel biologique

Les méduses sont élevées au laboratoire de l'UMR7138 Evolution Paris Seine (Île-de-France, France). Elles sont produites à partir des colonies de polypes Z4B (femelles) et Z10 (mâles). Tous les animaux (méduses, polypes et larves planulas) sont maintenus dans une eau de mer artificiel (ODM) à 18°C avec une salinité de 37 ‰. Les méduses matures (2 mois de croissance environ) sont maintenues dans le noir, puis sont exposées à la lumière pour déclencher la production des gamètes qui seront libérés au cours des deux heures suivantes. Les gamètes mâles et femelles sont collectés séparément. La fécondation et le maintien des embryons puis des larves se font dans une ODM filtrée à 0,22 µm.

L'obtention de la larve en métamorphose se fait, trois jours après fécondation, par ajout de 1 μ L du neuro-peptide GLW-amide par mL d'eau de mer.

Fixation et stockage

Les larves utilisées pour les immuno-marquages sont fixées en PBS 1X contenant 4 % de paraformaldéhyde durant 30 min. à RT. Après fixation les larves sont rincées trois fois en PBS et déshydratées par bains successifs de PBS/éthanol jusqu'à atteindre 100 % d'éthanol. Elles sont stockées en éthanol 100 % à -20°C. La réhydratation se fait par bains PBS/éthanol successifs jusqu'à atteindre 100 % de PBS.

Marquage TUNEL

Les marquages TUNEL sont effectués avec le kit Roche *In Situ* Cell Death Detection Kit (TM Red) selon les consignes du fabricant. Les larves sont perméabilisées dans du PBS contenant 0,2 % de Triton X-100 durant 20 min. (40 min. pour les polypes) puis rincées 3 fois en PBS-Tr. Le marquage se fait dans 100 µL de mélange réactionnel contenant l'enzyme terminal transférase et les nucléotides fluorescents (*Enzyme solution* plus *Label Solution*) pendant 1 h à 37°C en chambre humide. Le contrôle négatif est lui incubé avec la solution contenant uniquement les nucléotides fluorescents (sans enzyme, bruit de fond éventuel). Avant le marquage, le contrôle positif est lui exposé pendant 10 min. à une solution de DNAse grade I à une concentration de 1 mg/ml de à RT afin de générer des cassures qui seront toutes marquées par la réaction TUNEL. Les larves sont ensuite rincées 3 fois en PBS Tr puis incubées en PBS avec DAPI au 1/1000. Trois rinçages en PBS-Tr sont effectués.

Le marquage TUNEL a été réalisé après un marquage YL1/2.

Marquage à la phalloïdine

Les larves planulas utilisées pour les marquages phalloïdine n'ont pas été déshydratées ni congelées après fixation (stockage jusqu'à 1 semaine à 4°C en PBS). Les larves planulas ont été incubées 45 min. en PBS à RT contenant de la phalloïdine au 1/200 et du DAPI au 1/1000. Trois rinçages en PBS Triton 0,01% ont ensuite été réalisés avant le montage en Mowiol entre lame et lamelle.

Immunomarquages YL1/2

Après réhydratation les larves ont été incubées 2h à RT en PBS Tr contenant 1 % de *bovin serum albumin* (BSA). L'anticorps primaire (AC1) a été dilué dans du PBS Tr BSA au 1/1000 (YL1/2). L'incubation a duré 4h à RT ou une nuit à 4°C. Les larves ont ensuite été rincées trois fois 15min en PBS Tr. L'anticorps secondaire (AC2) a été dilué au 1/2000 pour une incubation identique à celle de l'AC1. Le contrôle négatif n'a pas été exposé à l'AC1 mais incubé uniquement avec l'AC2. Les larves planulas ont été rincées 6 fois en PBS Tr contenant du DAPI au 1/1000 dans le 6^{ème} bain. Enfin trois rinçage en PBS Tr. ont été réalisés avant le montage en Mowiol entre lame et lamelle.

Hybridation in situ

Les larves planulas ont été fixée 2 h à 4°C dans du PBT contenant 3,7 % de formaldéhyde, 0,2 % de glutaraldehyde. Deux protocoles ont été suivis, l'un basée sur l'utilisation du formamide (Jager *et al.*, 2011) et l'autre sur celui de l'urée (Sinigaglia *et al.*, 2017).

Marquage EdU

Les marquages EdU (*Ethynyl deoxyUridine*) ont été fait avec le kit Click-iT[™] EdU Alexa Fluor[™] 555 Imaging Kit. Le protocole a été suivis selon les recommandations du fabricant. Les larves planulas ont été incubées en ODM contenant de l'EdU durant 30 min. depuis l'induction de la métamorphose (GLW-amide). Trois rinçages en ODM ont été effectués, puis les larves ont été fixées en paraformaldéhyde puis rincées en PBST. Elles ont été maintenu une nuit à 4°C dans du PBST, puis rincées en PBST contenant 3 % de BSA. Après perméabilisation, trois rinçages en PBST avec 3 % de BSA ont été effectués. La détection a été réalisée suivant les recommandations du fournisseur, puis a été suivi de rinçages en PBST-3 % BSA. Les échantillons ont été incubés 15 min. en PBST contenant du DAPI, puis rincés trois fois en PBST et montés entre lame et lamelle.

III. TRAITEMENTS DES DONNÉES

Comptage et statistiques

Au sein des différents traitements effectués sur les larves de ciones, les larves ont été comptées afin d'obtenir la proportion de larve avec la régression caudale en cours en opposition aux larves pour lesquelles celle-ci n'a pas commencé. Les comptages ont été réalisés respectivement 2 h, 4 h, 6 h. Toutes les statistiques ont été faites avec le logiciel R 2.14.1.

Pour chaque expérimentation, une comparaison entre tous les traitements a été effectuée avec un test de Kruskal-Wallis, puis chaque condition a été comparée aux témoins avec un test de Wilcoxon Mann-Whitney. Ces mêmes tests ont été réalisés pour les données d'expression obtenues par q-PCR, la longueur relative de l'endoderme caudal de *Ciona* et la position relative des PGCs de *Ciona*.

Imagerie

Les images ont été obtenues au microscope photonnique confocal Leica TCS SP5 et Olympus BX61. Les images ont été analysées et traitées avec les logiciels ImageJ 1.46a-1 et LAS AF Lite de Leica.

Recherches et traitement de séquences

Les séquences utilisées pour les analyses phylogénétiques proviennent des bases de données NCBI, ANISEED et Echinobase. La séquence Nev-Bax a été généreusement fournie par Éric Röttinger. Les séquences sont, soit des caspases déjà identifiées et caractérisées dans la littérature, soit des caspases identifiées comme telles par prédiction, soit des gènes issus de résultats de recherche par BLAST réciproque.

Pour chaque séquence, la présence des domaines P20 et P10 a été vérifiée par les programmes ScanProsite et InterPro. Les séquences n'ayant seulement qu'un domaine P10 n'ont pas été retenues. De la même manière, les séquences ayant un domaine P20, mais qui ne possèdent pas de sites actifs n'ont pas été retenues. Sont ainsi éliminés les faux positifs potentiels.

La même approche a été effectuée pour les séquences de la famille Bcl-2, ainsi que les protéines adaptatrices (*i.e.* Apaf-1).

Les séquences ont été alignées avec le logiciel MAFFT, et nettoyées avec Gblocks.

Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques effectuées par maximum de vraisemblance ont été faites avec le logiciel PhyML à partir de Seaview, avec le modèle de substitution JTT. L'analyse a commencé à partir d'un arbre obtenu par Neighbour-Joining, et le soutien des nœuds a été estimé à l'aide de

bootstrap réalisés à partir de 800 tirages. L'arbre final optimal a été construit avec le meilleur résultat obtenu entre le NNI (*nearest-neighbor interchange*) ou le SPR (*subtree pruning and regrafting*).

Les analyses effectuées en inférence bayésienne ont été réalisées avec le logiciel MrBayes 3.2 avec le modèle de substitution JTT. Les analyses ont été initiées avec 5 chaînes de Markoff Monte Carlo avec autant de générations que nécessaires pour obtenir une fréquence de déviation inférieure à 0.03. Le soutien des nœuds a été estimé par calcul des probabilités postérieures.

BIBLIOGRAPHIE

- Accordi F, Chimenti C. (2001). Programmed cell death in the pancreas of Bufo bufo during metamorphosis. *J Anat.* 199:419–427.
- Agosti CG & Stidwill RP. (1991). *In vitro* migration of *Hydra* nematocytes: The influence of the natural extracellular matrix (the mesoglea), of collagen type IV and type I, laminin, and fibronectin on cell attachment, migration parameters, and on patterns of cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 20:215-227.
- Agostini M, Tucci P, Melino G. (2011). Cell death pathology: Perspective for human diseases. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol 414, Issue 3, 28 October 2011, Pages 451-455.
- Alcivar A, Hu S, Tang J & Yang X. (2003). DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death, *Oncogene*, 22, 291–297.
- Altmann, CR, Brivanlou AH. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int. Rev. Cytol.* 203, 447–482.
- Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT. (2009). Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila. Cell Stem Cell.* 4, 49-61.
- Ameisen JC. (1996). The origin of programmed cell death. Science 272, 1278-1279.
- Ameisen JC. (2000). La sculpture du vivant. Edition *Points*.
- Appeltans W, Ahyung ST, Anderson G, Angel MV *et al.*, (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current biology*. Vol 22, Issue 23, Pages 2189-2202.
- Atkinson BG. (1975). Biochemical and histological changes in the respiratory system of Rana catesbeiana larvae during normal and induced metamorphosis. *Dev Biol* 45:151–165.
- Atsumi G, Tajima M, Hadano A, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I. (1998). Fas-induced arachidonic

acid release is mediated by Ca2+–independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(22): 13870–13877.

- Atsumi G, Murakami M, Kojima K, Hadano A, Tajima M, Kudo I. (2000). Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 18248–18258.
- **Babonis** LS & Martindale MQ. (2017). PaxA, but not PaxC, is required for cnidocyte development in the sea anemone *Nematostella vectensis EvoDevo*, 8:14. DOI 10.1186/s13227-017-0077-7.
- **Bello** BC, Hirth F & Gould AP. (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron*, 37, 209–219.
- Bergmann A, Steller H. (2010). Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Science Signaling*, 3(145):re8. http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.3145re8. scisignal.3145re8 [pii].
- Berrill N J. (1929). Studies in tunicate development. I. General physiology of development of simple ascidians. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol*, 218, 37-78.
- **Bilak** A, Uyetake L, Su TT. (2014). Dying cells protect survivors from radiation-induced cell death in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 10(3):e1004220.
- **Birnbaum** MJ, Clem RJ, Miller LK. (1994). An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motif. *J Virol*, 68:2521-2528.
- Bodo F, & Bouillon J. (1968). Étude histologique du développement embryonnaire de quelques hydroméduses de Roscoff: *Phialidium hemisphaericum* (L.), *Obelia* sp. Péron et Lesueur, Sarsia eximia (Allman), Podocoryne carnea (Sars), Gonionemus vertens Agassiz. *Cahiers de Biologie Marine*, 9, 69–104. 9, 161.
- Bonzon C, Bouchier-Hayes L, Pagliari LJ, Green DR, Newmeyer DD. (2006). Caspase-2–induced Apoptosis Requires Bid Cleavage: A Physiological Role for Bid in Heat Shock–induced Death. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 17, 2150 –2157.
- **Böttger** A, Alexandrova O. (2007). Programmed cell death in Hydra. *Semin. Cancer Biol.* 17, 134–146.
- **Braw** RH & Tsafiri A. (1980). Follicles explanted from pentobarbitonetreated rats provide a model for atresia. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59 259–265.
- **Brennecke** J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1):25–36.
- Briggs DEG, Erwin DH. & Coillier FJ. (1994). The Fossils of the Burgess Shale. *Smithsonian Institute Press*, Washington, DC.
- **Brunetti** R, Gissi C, Pennati R, Caicci F, Gasparini F. & Manni L. (2015). Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: ciona robusta and *Ciona intestinalis. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53,

186–193.

- Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (2002). *Invertebrates*. Sinauer, Sunderland, MA, 2nd Ed.
- **Bump** NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, Licari P, Mankovich J, Shi L, Greenberg AH, Miller LK, Wong WW. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, vol. 269, No. 5232, pp. 1885-1888.
- **Byrum**, C.A. (2001) An analysis of hydrozoan gastrulation by unipolar ingression. *Dev Biol*, 240, 627–640.
- Campbell RD. (1974). Cell Movements in Hydra. Amer. Zool. 14, 523-535.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *NatRev Mol Cell Biol 2005; 6: 328–340.*
- **Castedo** M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* ; 23: 2825–2837
- **Castellano** I, Ercolesi E, Palumbo A. (2014). Nitric Oxide Affects ERK Signaling through Down-Regulation of MAP Kinase Phosphatase Levels during Larval Development of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *PlosOne*, Vol 9, Issue 7, e102907.
- Chabry L. (1887). Contribution à l'embryologie normale et teratologique des Ascidies simples. *J. Anat. Physiol.* (Paris), 23, pp167-319.
- Chambon JP, Soule J, Pomies P, Fort P, Sahuquet A, Alexandre D, Mangeat PH, Baghdiguian S. (2002). Tail regression in *Ciona intestinalis* (Protochordate) involved a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. *Development*, 129:3105–3114.
- Chambon JP, Nakayama A, Takamura K, McDougall A, Satoh N. (2007). ERK- and JNK-signalling regulate gene networks that stimulate metamorphosis and apoptosis in tail tissue of ascidian tadpoles. *Development*, 134:1203–1219
- Chen JY, Huang DY, Peng QQ, Chi HM, Wang XQ, & Feng M. (2003). The first tunicate from the Early Cambrian of South China. *PNAS*. Vol. 100no. 14, 8314 8318.
- Chen S, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo MW, Kitajewski J, Wang CY. (2001).
 WNT-1 Signaling Inhibits Apoptosis by Activating β-Catenin/T Cell Factor–Mediated Transcription. *The Journal of Cell Biology*, Vol 152, Number 1, pp 87–96.
- Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, Martinou JC, Galliot B. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive *Hydra* head regeneration. *Dev. Cell.* 17, 279-289.
- Chiba S, Awazu S, Itoh M, Chin-Bow ST, Satoh N, Satou Y, Hastings KEM. (2003). A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. IX. Genes for muscle structural proteins. *Dev Genes Evol*. DOI 10.1007/s00427-003-0324-x.

- Chistyakov VG, Kalmykova NA, Nesov LA, & Suslov GA. (1984). On the Presence of Vendian Sediments in the Middle Reaches of the Onega River and Possible Existence of Tunicates (Tunicata: Chordata) in the Precambrian. *Vestn. Leningr. Univ.* no. 6, pp. 11–19.
- Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Böttger A, David CN. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr. Biol*, *9*, 959–962.
- Clarke PGH & Clarke S. (2012). Nineteenth century research on cell death. *Experimental Oncology* 34, 139–145.
- Claveria C, Giovinazzo G, Sierra R, Torres M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature*, 500:39-44.
- **Cloney** RA. (1978). Ascidian metamorphosis: Review and analysis. In: Chia F-S, Rice ME, editors. Adhesion and metamorphosis of marine invertebrate larvae. *Amsterdam: Elsevier*. pp 255–282.
- Cloney RA. (1982). Ascidian larvae and the events of metamorphosis. *Am Zool*, 22:817–826.
- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. J*, 326, 1–16.
- Collin R. (1906). Histolyse de certains neuroblastes au cours du développement du tube nerveux chez le poulet. *C. R. Soc. Biol*, 60: 1080–1.
- Collin R. (1906). Recherches cytologiques sur le développement de la cellule nerveuse. Névraxe 1906; 8: 181–309.
- Collins AG, Schuchert A, Marques AC, Jankowski T, Medina M, & Schierwater B. (2006). Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology*, 55 (1), 97–115, doi:10.1080/10635150500433615.
- **Conklin**, EG. (1905). The organisation and cell lineage of the ascidian egg (Styela partita). *Journ. Acad. Sc. Philadelphia.* ser. 2, vol. 13
- Conradt B & XueD. (2005). Programmed cell death. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology.*
- Cooper DM, Granville DJ, Lowenberger C. (2009). The insect caspases. Apoptosis, 14, 247–256.
- **Courtiade** J, Pauchet Y, Vogel H & Heckel DG. (2011). A comprehensive characterization of the caspase gene family in insects from the order Lepidoptera. *BMC Genomics*, 12:357
- **Crook** NE, Clem RJ, Miller LK. (1993). An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger like motif. *J Virol*, 67:2168-2174.
- **Cuvillier** O, Edsall L, Spiegel S. (2000). Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent fas-induced apoptosis of type II jurkat T cells. *J Biol Chem*. 275:15691–15700.
- **Cuvillier** O, Levade T. (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood*, 98 (9):2828-36.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein

family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol 15, pages 49–63.

- Darling JA, Reitzel AR, Burton PM, Mazza ME, Ryan JF, Sullivan JC, Finnerty JR. (2005). Rising starlet: The starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *BioEssays*, 27: 211 221.
- **Davidson** B, Wallace SES, Howsmon RA, Swalla BJ. (2003). A morphological and genetic characterization of metamorphosis in the ascidian *Boltenia villosa*. *Dev Genes Evol*. 213:601–611.
- Dawd DS & Hinchliffe JR. (1971). Cell death in the 'opaque patch' in the central mesenchyme of the developing chick limb: a cytological, cytochemical and electron microscopic analysis. *Embryol exp. Morph.* Vol. 26, 3, pp. 401-424.
- **Degnan** BM, Souter D, Degnan SM, Long SC. (1997). Induction of metamorphosis with potassium ions requires development of competence and an anterior signaling center in the ascidian Herdmania momus. *Dev Genes Evol*, 206:370–376.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. 2003. A decade of caspases. Oncogene. 22:8543–8567.
- **Dehal** P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A, Davidson B, Di Gregorio A, Gelpke M, Goodstein DM, et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science*, 298, 2157–2167.
- **Delsuc** F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439(7079):965-8.
- **Delsuc** F, Philippe H, Tsagkogeorga G, Simion P, Tilak MK, Turon X, López-Legentil S, Piette J, Lemaire P, Douzery EJP. (2018). A phylogenomic framework and timescale for comparative studies of tunicates. *BMC Biol.*;16(1):39.
- **Denecker** G, Hoste E, Gilbert B, Hochepied T, Ovaere P, Lippens S et al. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat. Cell Biol.* 9: 666–674.
- Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 180, No. 3, 451–458.
- **Denton** D, et al. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol*, 19:1741–6.
- **Deveraux** QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC: (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J*, 18:5242-5251.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388:300-304.
- **Diez del Corral** R, Olivera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, et al. (2003). Opposing FGF and Retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation and segmentation during body axis extension. *Neuron*, 40: 65–79.

- **Diez del Corral** R, Storey KG. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *BioEssays*, 26: 857–869.
- **Dodge** JC & Badura LL. (2002). 5HT and 5HIAA dialysate levels within the arcuate nucleus of the hypothalamus: relationship with photoperiod-driven differences in serum prolactin and luteinizing hormone in the Siberian hamster. *Brain Research* 946 171–178.
- **Domsch** K, Papagiannouli F, Lohmann I. (2015). The HOX–Apoptosis Regulatory Interplay in Development and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 114.
- Duan H, Dixit VM (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*, 385, 86 89.
- **Duboule** D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development*, 134, 2549-2560, doi:10.1242/dev.001065.
- **Dunn** S, Phillips W, Spatafora J, Green D, Weis V. (2006). Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution. *J Mol Evol*, 63:95–107.
- Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A et al. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol*, 25: 831–841.
- Edinger L A., Thompson B C. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*. 16:663-669.
- Einsele-Scholz S, Malmsheimer S, Bertram K, Stehek D, Johanning J, Manz M, Danial PT, Gillissen BF, Schulze-Osthoff K, Essmann F. (2016). Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Journal of Cell Science*, 129, 30_54 doi:10.1242/jcs.19394.
- El Albani A, *et al.* (2010). Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature* vol 466, pages 100–104.
- Ellis HM, Horvitz HR. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. *elegans*. *Cell*, 44: 817–829.
- Ellis R.E., Yuan J.Y., Horvitz H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663–698.
- Elmore S.(2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35:495–516.
- Estabel J, Mercer A, Konig N, Exbrayat JM. (2003). Programmed cell death in Xenopus laevis spinal cord, tail and other tissues, prior to, and during, metamorphosis. *Life Sci*, 73:3297–3306.
- Estévez-Calvar N, Romero A, Figueras A, Novoa B. (2013). Genes of the Mitochondrial Apoptotic Pathway in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One*, 8(4): e61502. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061502.

- Fan TJ, Han LH, Cong RS & Liang J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727.
- Faunes F & Larrain J. (2016). Conservation in the involvement of heterochronic genes and hormones during developmental transitions. *Dev Biol*, 416, issue 1, 3-17.
- Fedonkin M A, VickersRich P, Swalla BJ, Trusler P, & Hall M. (2012). A New Metazoan from the Vendian of the White Sea, Russia, with Possible Affinities to the Ascidians. *Paleontological Journal*. Vol. 46, No. 1, pp. 1–11.
- Felix W. (1889). Über Wachsthum der quergestreiften Muskulatur nach Beobachtungen am Menschen. Z *Wissenschaft* Zool ; 48: 224–59.
- Flemming W. (1885). Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat Entwickl.* 221–44.
- Fogarty CE & Bergmann A. (2015). The Sound of Silence: Signaling by Apoptotic Cells. *Curr Top Dev Biol.*, 114: 241–265.
- Fourrage C, Swann K, Gonzalez Garcia JR, Campbell AK, Houliston E. (2014). An endogenous green fluorescent protein-photoprotein pair in *Clytia hemisphaerica* eggs shows co-targeting to mitochondria and efficient bioluminescence energy transfer. *Open Biol*, 4:130206. doi: 10.1098/rsob.130206.
- Freeman G. (1981). The role of polarity in the development of the hydrozoan planula larva. *Dev Genes Evol*, 190, 168–184.
- Fuchs Y and Steller H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular cell biology*. Vol 16. 329-344.
- Fujita J, Crane AM, Souza MK, Dejosez M, Kyba M, Flavell RA, Thomson JA, Zwaka TP. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, Vol 2, Issue 6, 595–601.
- Furuta I, Porkka-Heiskanen T, Scarbrough K, Tapanainen J, Turek FW & Hsueh AJ 1994 Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters. *Biology of Reproduction*, 51 1315–1321.
- **Galluzzi** L, et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 19:107–20.
- **Galluzzi** L, et al. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*. 22:58–73.
- **Galluzzi** *et al.* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25:486–541.
- Ganan Y, Macias D, Basco RD, Merino R & Hurle JM. (1998). Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of msx gene expression in the developing autopod. *Dev. Biol.* 196, 33–41.
- Gaston S, Menaker M. (1967). Photoperiodic control of hamster testis. *Science*, 158:925-928.

- Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, Ipendey E, Teillon J, Volovitch M, Vriz, S. (2013). Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep.* 3:2084. doi: 10.1038/srep02084.
- Gavrieli Y., Sherman Y. & Ben-Sasson S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493–501.
- **Ghayur** T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A et al. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, 386: 619–623.
- Gionti M, Ristoratore F, Di Gregorio A, Aniello F, Branno M, Di Lauro R. (1998). *Dev. Genes Evol.* 207, 515–523.
- Gissi C, Hastings KEM, Gasparini F, Stach T, Pennati R, Manni L. (2017). An unprecedented taxonomic revision of a model organism: the paradigmatic case of *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis. Royal Swedish Academy of Sciences, 46, 5, pp 521–522.*
- **Goessling** W, et al. (2009). Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell*, 136:1136–1147.
- **Grant** P, Clothier RH, Johnson RO, Ruben LN (1998) In situ lymphocyte apoptosis in larval Xenopus laevis, the South African clawed toad. *Dev Comp Immunol*, 22:449–455.
- Gräper L. (1914). Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. Arch Zellforsch. 12: 373–94.
- Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, et al. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *The FASEB Journal*, 22(8):2629–2638. http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-107169.
- Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., et al. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107, 27–41.
- **Gurtner** GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453:314–321.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. (2003). Apoptosis the p53 network. *Journal of Cell Science*, 116, 4077-4085. doi:10.1242/jcs.00739.
- Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. (1995). *Drosophila* Homologs of Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Proteins Function to Block Cell death. *Cell*, vol 83, pp 1253-1262.
- Hedgecock EM, JE Sulston, JN Thomson. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, Vol. 220, Issue 4603, pp. 1277-1279.
- Hellis HM & Horvitz HR. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. *elegans*. Cell, Vol 44, Issue 6, pages 817-829.
- Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. Vol 407.

- Hernandez-Martinez R and Covarrubias L. (2011). Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. *Develop. Growth Differ*. 53, 245–258.
- Hernandez-Martinez R, Castro-Obregon S., and Covarrubias L. (2009). Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 136: 3669-3678.
- Hoffmann K. (1973). The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage color in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus).*J Comp Physiol*, 95:267-282.
- Hoffmann K. (1981). The role of the pineal gland in the photoperiodic control of seasonal cycles in hamster. In: Follett BK, Follett DE (eds.), Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles. *Bristol: Scientechnica*. 237-250.
- Horie T, Shinki R, Ogura Y, Kusakabe T, Satoh N, Sasakura Y. (2011). Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. Nature 469:525–528.
- Horvitz HR, Moyed, Sternberg PW. (1982). Programmed cell death in nematode development. *Neuroscience Commentaries*, Vol. 1, pp. 56-65.
- Horvitz HR. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode c*elegans. Cancer Res.* 59: 1701-1706.
- Hoshino ZI & Tokioka T. (1967). An unusually robust Ciona from the northeastern coast of Honsyu Island, Japan. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 15, 275–290.
- Hotta K, Mitsuhara K, Takahashi H, Inaba K, Oka K, Gojobori T, Ikeo K. (2007). A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. *Dev Dyn*, 237:1790–1805.
- Houliston E, Momose T, Manuel M. (2010). *Clytia hemisphaerica*: a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends Genet* (4):159-67. doi: 10.1016/j.tig.2010.01.008.
- Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO Journal*, Vol.18 No.13 pp.3586–3595, 1999.
- Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Stennicke HR, Hammock BD, Reed JC. (2001). Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1499:191-198.
- Hueber SD, Lohmann I. (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *BioEssays: News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 30, 965–979.
- Ikuta T, Yoshida N, Satoh N, Saiga H. (2004). *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 101, 15118–15123.
- Ikuta T, Saiga H. (2005). Organization of Hox genes in ascidians: present, past, and future. Dev. Dyn.: Off. *Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 382–389.

- Ikuta T, Satoh N, Saiga H, (2010). Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development*, 137, 1505–1513.
- Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem*, 273:32479 –32486.
- Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC. (1998). A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol*, 140(1):153-158.
- Ishizuya-Oka A, Ueda S. (1996). Apoptosis and cell proliferation in the Xenopus small intestine during metamorphosis. *Cell Tissue Res*, 286:467–476.
- Ishizuya-Oka A, Hasebe T, YB Shi YB. (2010). Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. *Apoptosis*, 15:350–364.
- Jacobson MD, Weil M. & Raff MC. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347–354.
- Jager M, Quéinnec E, Le Guyader H, Manuel M. (2011). Multiple *Sox* genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. *EvoDevo*, 2:12.
- Jaklevic B, Uyetake L, Wichmann A, Bilak A, English CN, Su TT. (2008). Modulation of ionizing radiationinduced apoptosis by bantam microRNA in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 320(1): 122–130. http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.043.
- Jeffery WR. (2002). Programmed cell death in the ascidian embryo: Modulation by FoxA5 and Manx and roles in the evolution of larval development. *Mech Dev*, 118:111–124.
- Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS. (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, 124, 4673–4683.
- Kanuka H, Kuranaga E, Takemoto K, Hiratou T, Okano H, Miura M. (2005). *Drosophila* caspase transduces Shaggy/GSK-3b kinase activity in neural precursor development. *EMBO* J.24, 3793–3806.
- Karaiskou A, SwallaBJ, Sasakura Y, Chambon JP. (2015). Metamorphosis in Solitary Ascidians. *Genesis* 53:34–47.
- Kawai N, Ogura Y, Ikuta T, Saiga H, Hamada M, Sakuma T, Yamamoto T, Satoh N, Sasakura Y. (2015). Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. *Dev Biol* 403(1):43-56.
- Kenyon C. (1986). A gene involved in the development of the posterior body region of C. *elegans*. *Cell*, 46, 477–487.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.

- Kerr JF, Harmon B, Searle J. (1974). An electronmicroscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J Cell Sci*, 14:571–585.
- Kiss T. (2010). Apoptosis and its functional significance in mollusks. *Apoptosis*, 15, 313e321.
- **Knosp** WM, Scott V, Bachinger HP & Stadler HS. (2004). HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. *Development*, 131, 4581–4592.
- Kocot KM, Tassia MG, Halanych KM, Swalla BJ. (2018). Phylogenomics offers resolution of major tunicate relationships. *Mol Phylogenet Evol*, 166-173.
- Kondo T, Zakany J, Innis JW, & Duboule D. (1997). Of fingers, toes and penises. *Nature*, 390, 29.
- Koussoulakos S. (2004). Vertebrate limb development: from Harrison's limb disk transplantations to targeted disruption of Hox genes. *Anat. Embryol.* 209, 93–105.
- **Kroemer** G, et al. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 12 (Suppl 2):1463–67.
- **Kroemer** G, et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*.16:3–11.
- **Kroiher** M, Plickert G, Müller WA. (1990). Pattern of cell proliferation in embryogenesis and planula development of *Hydractinia echinata* predicts the postmetamorphic body pattern. *Roux Arch Dev Biol*, 199(3):156-163. doi: 10.1007/BF01681488.
- Kumar S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14, 32–43.
- **Kuranaga** E, Kanuka H, Tonoki A, Takemoto K, Tomioka T, Kobayashi M, Hayashi S, Miura M. (2006). *Drosophila* IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell*, Vol 126, Issue 3, pp 583-596.
- **Kuss** P, Villavicencio-Lorini P, Witte F, Klose J, Albrecht AN, Seemann P, et al. (2009). Mutant Hoxd13 induces extra digits in a mouse model of synpolydactyly directly and by decreasing retinoic acid synthesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 146–156.
- **Kuznetsov** S, Lyanguzowa M. and Bosch TCG. (2001). Role of epithelial cells and programmed cell death in Hydra spermatogenesis. *Zoology*. 104:25-31.
- **Kuznetsov** SG, Anton-Erxleben F, Bosch TCG. (2002). Epithelial interactions in Hydra: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extra-cellular matrix. *J. Exp. Biol.* 205, 3809–3817.
- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. (2002). A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ*; 9: 358–361.
- Lamkanfi M, Dixit VM. (2014) .Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5):1013-22. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007.

- Lasi M, David CN, Bottger A. (2010). Apoptosis in pre-Bilaterians: Hydra as a model. *Apoptosis*. 15:269–278.
- Lasi M, Pauly B, Schmidt N, Cikala M, Stiening B, Kasbauer T, Zenner G, Popp T, Wagner A, Knapp RT, et al. (2010). The molecular cell death machinery in the simple cnidarian Hydra includes an expanded caspase family and pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Cell Res*, 20:812–825.
- Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*, 297, 1352–1354.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, Vol 13, pages 397–411.
- Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, et al. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 113(6):717–730.
- Lavrik IN, Golks A, Baumann S, KrammerPH. (2006). Caspase-2 is activated at the CD95 deathinducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood*, vol 108, num 2559-565.
- Leclère L, Jager M, Barreau C, Chang P, Le Guyader H, Manual M, Houliston E. (2012). Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia*. *Developmental Biology*, 364, 236–248.
- Lecointre G, Le Guyader H. (2018). Classification Phylogénétique du Vivant. Edition 4, Tome 2. Belin.
- Leitz T, Morand K. and Mann M. (1994). Metamorphosin A, a novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractinia echinata*. *Dev. Biol.* 163, 440-446.
- Leitz T. (1997). Induction of settlement and metamorphosis of Cnidarian larvae: signals and signal transduction. *Inv. Reprod. Dev.* 31, 109-122.
- Levi-Montalcini R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. Science, 237:1154-1162.
- Lewis EB. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 276, 565–570.
- Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY. (2010). Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci. Signal.* 3, ra13.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES & Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, Vol. 91, 479–489.
- Li Z, Huang H, Li Y, Jiang X, Chen P, Arnovitz S, et al. (2012). Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood*, 119, 2314–2324.
- Lin Y, Ma W & Benchimol S. (2000). Pidd, a new death-domain–containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature genetics*, Vol 26.

- Lindsten T, Ross A J, King A, Zong W X, Rathmell JC, Shiels H A, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, Macgregor GR & Thompson CB. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* 6, 1389–1399.
- Lockshin RA, Williams CM. (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J. Insect Physiol.* 10, 643.
- Lockshin RA & Williams CM. (1965). Programmed cell death—V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology*, Vol 11, Issue 7, Pages 831-844.
- Lockshin RA (1969). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *J. Insect Physiol*, 15, 1505–1516.
- Lockshin RA & Zakeri Z. (1994). Programmed cell death: early changes in metamorphosing cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 72(11-12): 589-596.
- Lohmann I, McGinnis N, Bodmer M, McGinnis W. (2002). The *Drosophila* Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell*, 110, 457–466.
- Lorda-Diez CI, Montero J A, Garcia-Porrero J A and Hurle J M. (2015). Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* 59: 55-62 (2015) doi: 10.1387/ijdb.150065jh.
- Macias D, Gañan Y., Sampath TK, Piedra ME, Ros MA & Hurle JM. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*, 124, 1109-1117.
- **Maelfait**, J. *et al.* (2008). Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1β maturation by caspase-8. *J. Exp. Med.* 205, 1967–1973.
- Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev. Biol.* 344, 7–15.
- Martin MW, Grazhdankin DV, Bowring SA, Evans DAD, Fedonkin MA. (2000). Age of Neoproterozoic Bilatarian Body and Trace Fossils, White Sea, Russia: Implications for Metazoan Evolution. *Science*, Vol. 288, Issue 5467, pp. 841-845.
- Martin V, Chia FS, Koss R. (1983). A fine structural study of metamorphosis of the hydrozoan Mitrocomella polydiademata. *J Morphol*, 176(3):261-287. doi: 10.1002/jmor.1051760303.
- Martin VJ, & Archer WE. (1986). Migration of interstitial cells and their derivatives in a hydrozoan planula. *Dev Biol.* 116, 486-496.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. (2002). The Inflammasome: A Molecular PlatformTriggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL. *Molecular Cell*, Vol. 10, 417–426.
- Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* ; 14: 1929–1934.

- Martinon F & Tschopp J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, 14, 10–22.
- Matsunobu S, Sasakura Y. (2015). Time course for tail regression during metamorphosis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* ;405(1):71-81.
- Matthysse AG, Deschet K, Williams M, Marry M, White AR, Smith WC. (2004). A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc Natl Acad Sci* ;101(4):986-91.
- Mayorova TD, Kosevich IA, Melekhova OP. (2012). On some features of embryonic development and metamorphosis of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Russian Journal of Developmental Biology*, Vol 43, Issue 5, pp 271–285.
- Meier P, Finch A, Evan G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801.
- Michibata M. (1984). Comparative study on amounts of trace elements in the solitary ascidians, *Ciona intestinalis* and Ciona robusta. Camp Eidwm. Phlsrol. 78A.No. 2,pp.285-288.
- **Minnich** B, Bartel H, Lametschwandtner A (2002) How a highly complex three-dimensional network of blood vessels regresses: the gill blood vascular system of tadpoles of Xenopus during metamorphosis. A SEM study on microvascular corrosion casts. *Microvasc Res*, 64:425–437.
- Mire P, & Venable S. (1999). Programmed cell death during longitudinal fission in a sea anemone. *Inv. Biol.* 118: 319-331.
- **Miura** K, Fujibuchi W, Ishida K, Naitoh T, Ogawa H (2011). Inhibitor of Apoptosis Protein Family as Diagnostic Markers and Therapeutic Targets of Colorectal Cancer. *Surg Today*, 41:175–182.
- Mochizuki K, Sano H, Kobayashi S, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T. (2000). Expression and evolutionary conservation of nanos-related genes in Hydra. *Dev. Genes Evol.* 210, 591–602.
- **Mochizuki** K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T. (2001). Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in Hydra. *Dev. Genes Evol.* 211, 299–308.
- Moffatt-Blue CS, Sury JJ, Young KA. (2006). Short photoperiod-induced ovarian regression is mediated by apoptosis in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Reproduction* (2006) 131 771– 782.
- Monier B, Gettings M, Gay G, Mangeat T, Schott S, Guarner A, Suzanne M. (2015). Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature*, Vol. 518, 245–250.
- Montero JA, & Hurle JM. (2010). Sculpturing digit shape by cell death. Apoptosis, 15, 365–375.
- Moreno E, Rhiner C. (2014). Darwin's multicellularity: from neurotrophic theories and cell competition to fitness fingerprints. *Curr Opin Cell Biol.*; 31:16-22. doi: 10.1016/j.ceb.2014.06.011.
- Morga B, Renault T, Faury N, Arzul I. (2012). New insights in flat oyster Ostrea edulis resistance against the parasite Bonamia ostreae. *Fish Shellfish Immunol*. 32; 958e968.
- Moya A, Sakamaki K, Mason BM, Huisman L, Forêt S, Weiss Y, Bull TE, Tomii K, Imai K, Hayward DC, Ball EE, Miller DJ. (2016). Functional conservation of the apoptotic machinery from coral to man: the diverse and complex Bcl-2 and caspase repertoires of *Acropora millepora*. *BMC*

Genomics, 17:62.

- Nakajima K, Fujimoto K, Yaoita Y. (2005). Programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Semin Cell Dev Biol* 16:271–280.
- Nakayama A, Satou Y, Satoh N. (2001). Isolation and characterization of genes that are expressed during *Ciona intestinalis* metamorphosis. *Dev Genes Evol*. 211:184–189.
- Nakazawa K, Yamazawa T, Moriyama Y, Ogura Y, Kawai N, Sasakura Y, Saiga H. (2013). Formation of the digestive tract in *Ciona intestinalis* includes two distinct morphogenic processes between its anterior and posterior parts. *Dev Dyn*, 242:1172–1183.
- Nezis IP, et al. (2009). Cell death during *Drosophila* melanogaster early oogenesis is mediated through autophagy. *Autophagy*, 5:298–302.
- Nicholson DW, (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 6, 1028 1042.
- Nikoh N, Iwabe N, Kuma K, Ohno M, Sugiyama T, Watanabe Y, Yasui K, Shi-cui Z, Hori K, Shimura Y, Miyata T. (1997). An Estimate of Divergence Time of Parazoa and Eumetazoa and That of Cephalochordata and Vertebrata by Aldolase and Triose Phosphate Isomerase Clocks. *Journal of Molecular Evolution*, Vol 45, Issue 1, pp 97–106.
- Nishikawa A, Hayashi H. (1995). Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamor-phosis of the frog Xenopus laevis. *Differentiation*, 59:207–214.
- Noetzel W. (1895). Die Rückbildung der Gewebe im Schwanz der Froschlarve. Arch mikrosk Anat.
 45: 475–512
- **Oberst** A, Bender C, Green DR. (2008). Living with death: The evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ*, 15: 1139–1146.
- **Ohsawa** S, et al. (2009). Caspase-9 activation revealed by semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J Neurosci*, 29:11385–11392.
- Oikemus SR, McGinnis N, Queiroz-Machado J, Tukachinsky H, Takada S, et al. (2004). *Drosophila* atm/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *Genes & development*, 18: 1850–1861.
- **Ortolani** G. (1955). The presumptive territory of the mesoderm in the ascidian germ. *Expetientia*. 11, 445-446.
- Ota S, Zhou ZQ, Keene DR, Knoepfler P & Hurlin PJ. (2007). Activities of N-Myc in the developing limb link control of skeletal size with digit separation. *Development*, 134,1583–1592.
- **Pajni-Underwood** S, Wilson CP, Elder C, Mishina Y and Lewandoski M. (2007). BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signalling *Development*, 134, 2359-2368. doi:10.1242/dev.001677
- **Pasini** A, Manenti R, Rothbacher U, Lemaire P. (2012). Antagonizing retinoic acid and FGF/MAPK pathways control posterior body patterning in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *PLoS One*, 7, e46193.

- **Pearson** JC, Lemons D & McGinnis W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics*, Vol 6, pages 893–904.
- **Pellettieri** J, Fitzgerald P, Watanabe S, Mancuso J, Green DR, Sanchez Alvarado A. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev. Biol.* 338, 76-85.
- **Pennati** R, Dell'Anna A, Pagliara P, Scarì G, PirainoS, De Bernardi F. (2013). Neural system reorganization during metamorphosis in the planula larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria). *Zoomorphology*, Vol 132, Issue 3, pp 227–237.
- **Pennati** R, Ficetola GF, Brunetti R, Caicci F, Gasparini F, Griggio F, Sato A, Stach T, Kaul-Strehlow S, Gissi C. & Manni L. (2015). Morphological differences between larvae of the *Ciona intestinalis* Species Complex: hints for a valid taxonomic definition of distinct species. *PLoS One*, 10, 22.
- **Pirger** Z, Racz B, Kiss T. (2009). Dopamine-induced programmed cell death is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation in snail salivary gland cells. *Biol Cell*, 101(2):105–116.
- **Plickert** G, Kroiher M. and Munck A. (1988). Cell proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Development*, 103, 795-803.
- Plickert G, Schetter E, Verhey-van-Wijk N, Schlossherr J, Steinbüchel M, Gajewski M. (2003). The role of alpha-amidated neuropeptides in hydroid development--LWamides and metamorphosis in H. echinata. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 439–450.
- **Prévost** J-L, Lebert H. (1844) Mémoire sur la formation des organes de la circulation et du sang dans les batraciens. *Ann Sci Nat*, 3e série 1: 200–25.
- **Ravichandran** K S. (2003). "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell*, 113:817–820.
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GQ, Pickup DJ. (1992).
 Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1β converting enzyme. *Cell*, Vol 69, Issue 4, Pages 597-604.
- **Reape** TJ, McCabe PF. (2010). Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, Vol 15, Issue 3, pp 249–256.
- **Rebscher** N, Volk C, Teo R, Plickert G. (2008). The germ plasm component vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian *Hydractinia echinata*. *Dev. Dyn.* 237, 1736–1745.
- **Reddien** PW, and Horvitz, H.R. (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* 2, 131–136.
- Reed JC. (2000), Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology*, Vol. 157, No. 5. pp 1415-1430.
- Reed J C, Doctor KS, and Godzik A. (2004). The Domains of Apoptosis: A Genomics Perspective. *Sci STKE*. (239):re9.
- Richier S, Sabourault C, Courtiade J, Zucchini N, Allemand D, Furla P. (2006). Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *FEBS J*. 273,

4186-4198.

- Robertson AJ, Croce J, Carbonneau S, Voronina E, Miranda E, McClay DR, Coffman JA. (2006). The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology*, 300, 321 – 334.
- **Romanelli** D, Casartelli M, Cappellozza S, Eguileor M de, Tettamanti G. (2016). Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis. *Scientific Reports*, 6:32939.
- **Romero** A, Estevez-Calvar N, Dios S, Figueras A, Novoa B. (2011). New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in Mytilus galloprovincialis, *PLoS One*, 6, e17003.
- Romero A, Novoa B, Figueras A. (2015). The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. Fish & Shellfish Immunology, 46, 79-87.
- Roos WP & Kaina B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. TRENDS in Molecular Medicine, Vol.12 No.9, 440-450.
- **Rosati** F, de Santis R. (1978). Studies on fertilization in the Ascidans. I. Self-sterility and specific recognition between gametes of *Ciona intestinalis*. *Exp Cell Res*. 1978 Mar 1;112(1):111-9.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. (1997). The cIAP-1 and cIAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*, 16:6914-6925.
- **Ryoo** H, Gorenc T, Steller H (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* 7:491–501.
- Sachs LM, Abdallah B, Hassan A, Levi G, De Luze A, Reed JC, Demeneix BA. (1977). Apoptosis in Xenopus tadpole tail muscles involves Bax-dependent pathways. *The FASEB Journal*, Vol. 11, No. 10.
- Sakamaki K, Imai K, Tomii K, MillerDJ. (2015). Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *Bioessays*, 37: 767–776.
- Sallmann FR, Bourassa S, Saint-Cyr J, Poirier GG. (1997). Characterization of antibodies specific for the caspase cleavage site on poly(ADP-ribose) polymerase: specific detection of apoptotic fragments and mapping of the necrotic fragments of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Cell Biol*, 75(4):451-6.
- Salvensen VS & Dixit VM. (1997). Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. Cell, Vol. 91, 443–446.
- Sandgren EP, et al. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albuminplasminogen activator transgene. *Cell*, 66:245–256.
- **Santos** DE, Azevedo DO, Campos LAO, Zununcio JC, Serrao JE. (2015). Melipona quadrifasciata (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma*, 252:619–627.

- Sasakura Y, Yamada L, Takatori N, Satou Y, Satoh N. (2003). A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VII. Molecules involved in the regulation of cell polarity and actin dynamics. *Dev Genes Evol*. DOI 10.1007/ s00427-003-325-9.
- Sasakura Y, Kanda M, Ikeda T, Horie T, Kawai N, Ogura Y, Yoshida R, Hozumi A, Satoh N, Fujiwara S. (2012). Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development* 139:2156–2160.
- Sasakura Y, Mita K, Ogura Y, Horie T. (2012). Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Develop. Growth Differ*. Vol 54, pp 420-437.
- Satoh N. (1994). Developmental Biology of Ascidians. Cambridge University Press.
- Satoh N. (2014). Developmental Genomics of Ascidians. *Wiley-Blackwell*.
- Schmich J, Trepel S, Leitz T. (1998). The role of GLWamides in metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Dev Genes Evol*, 208(5):267-73.
- Schreiber AM, Brown DD (2003) Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. Proc Natl Acad Sci USA 100:1769–1774.
- Schwartz LM & Truman JW. (1982). Peptide and steroid regulation of muscle degeneration in an insect. *Science*, Vol. 215, No. 4538, pp. 1420-1421.
- Schwerk C & Schulze-Osthoff K. (2003). Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology*, 66, issue 8, 1453–1458.
- Scott WJ, Ritter EJ, & Wilson JG. (1977). Delayed appearance of ectodermal cell death as a mechanism of polydactyly induction. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 42, 93–104.
- Scott WJ, Ritter EJ, & Wilson JG. (1980). Ectodermal and mesodermal cell death patterns in 6mercaptopurine riboside-induced digital deformities. *Teratology*, 21, 271–279.
- Seipel K, Yanze N, Schmid, V. (2004). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish Podocoryne carnea. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1–8.
- Seipp S, Schmich J, Leitz T. (2001). Apoptosis a death inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in H. echinata (Cnidaria, Hydrozoa). *Development* 128, 4891–4898.
- Seipp S, Wittig K, Stiening B, Böttger A, Leitz T. (2006). Metamorphosis of H. echinata (Cnidaria) is caspase-dependent. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 63–70.
- Seipp S, Schmich J, Kehrwald T, Leitz T. (2007). Metamorphosis of *Hydractinia echinata*—natural versus artificial induction and developmental plasticity. *Dev. Genes Evol.* 217, 385–394.
- Seipp S, Schmich J, Will B, *et al.*, (2010). Neuronal Cell Death during Metamorphosis of *Hydractina echinata* (Cnidaria, Hydrozoa), *Invert. Neurosc*, vol. 10, no. 2,pp. 77–91.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, Vol 22, pages 526–539.

- Shenkar N, Swalla BJ. (2011). Global diversity of Ascidiacea. PLoS One. 2011; vol 6 (6):e20657.
- Shirae-Kurabayashi M, Nishikata T, Takamura K, Tanaka KJ, Nakamoto C, Nakamura A. (2006). Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in *Ciona intestinalis*. Development 133:2683–2693.
- **Siegmund** B. (2002). Interleukin-1beta converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Biochem Pharmacol*; 64: 1–8.
- Simmen MW, Leitgeb S, Clark VH, Jones SJM & Bird A. (1998). Gene number in an invertebrate chordate. *Proc. Natl. Acad. Sci*, Vol. 95, pp. 4437–4440.
- Sinigaglia C, Thiel D, Hejnol A, Houliston E, Leclère L. (2018). A safer, urea-based in situ hybridization method improves detection of gene expression in diverse animal species. *Dev Biol*, Vol 434, Issue 1, pp 15-23.
- Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, Angerer LM, Arnone MI, Burgess DR, Burke RD, et al. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314: 941–952.
- Sokolova IM, Evans S, Hughes FM. (2004). Cadmium induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol*, 207: 3369-3380.
- Sokolova IM. (2009). Apoptosis in molluscan immune defense. *Inv Surviv J*, 6:49–58.
- **Spagnuolo** A, Ristoratore F, Di Gregorio A, Aniello F, Branno M, Di Lauro R. (2003).Unusual number and genomic organization of Hox genes in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Gene*, 8;309(2):71-9.
- Spiegel S, Milstien S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:397–407.
- Srivastava M, Simakov O, Chapman J, Fahey B, Gauthier MEA, Mitros T, Richards GS, Conaco C, Dacre M, Hellsten U, et al. (2010). The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature*, 466: 720–726.
- Stöven S, Silverman N, Junell A, Hedengren-Olcott M, Erturk D, Engström, Maniatis T, Dan Hultmark D. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-κB factor Relish. *PNAS*, 100 (10) 5991-5996.
- Suganuma I, Ushiyama T, Yamada H, Iwamoto A, Kobayashi M, Ikeda M. (2011). Cloning and characterization of a dronc homologue in the silkworm, *Bombyx mori. Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 909-921.
- Sulston J. E., H. R. Horvitz. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans.Dev. Biol*, 56, 110-156.
- Sulston JE. (2003). *Caenorhabditis elegans*: The Cell Lineage and Beyond (Nobel Lecture). *Chem BioChem*, 4, 688-696.

- Swalla BJ, Cameron CB, Corley LS, Garey JR. (2000). Urochordates are monophyletic within the deuterostomes. *Syst Biol.* ;49(1):52-64.
- Tait SWG & green DR. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 11, pages 621–632.
- **Takada** N, Yamaguchi H, Shida K, Terajima D, Satou Y, Kasuya A, Satoh N, Satake M, Wang HG. (2005). The cell death machinery controlled by Bax and Bcl-XL is evolutionarily conserved in *Ciona intestinalis*. *Apoptosis*, 10:1211–1220.
- **Tapanainen** JS, TillyJL, Vihko KK, Hsueh AJW. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 7:643-650.
- Tata J.R. (1966). Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol*, 13, 77–94.
- Tatian M, Lagger C, Demarchi M, Mattoni C. (2011). Molecular phylogeny endorses the relationship between carnivorous and filter-feeding tunicates (Tunicata, Ascidiacea). *Zoologica Scripta*, 40, 6, pp 603–612.
- **Terajima** D, Shida K, Takada N, Kasuya A, Rokhsar D, Satoh N, Satake M, Wang HG. (2003). Identification of candidate genes encoding the core components of the cell death machinery in the *Ciona intestinalis* genome. *Cell Death Differ* 10:749–753.
- **Thornberry** NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, *et al.* (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1β processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998). Caspases: Enemies within. Science 281,1312–1316 (1998).
- **Thurber** VR & Epel D. (2007). Apoptosis in early development of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus. *Dev Biol.* 2007 Mar 1;303(1):336-46.
- **Tinel** A, Tschopp J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843–846.
- Tiret L, Le Mouellic H, Maury M, & Brulet P. (1998). Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of Hoxc-8-deficient mice. *Development*, 125, 279–291.
- Toyama, Y., Peralta, X. G., Wells, A. R., Kiehart, D. P. & Edwards, G. S. (2008). Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 321, 1683–1686.
- **Truman** JW, Thorn RS, Robinow S. (1992). Programmed neuronal death in insect development. *Journal of Neurobiology*, Vol. 23, No. 9, pp. 1295-1311.
- Tschopp J, Irmler M, Thome M. (1998). Inhibition of Fas death signals by Flips. Curr Opin Immunol, 10:552–558.
- Tseng AS, Adams DS, Qiu D, Koustubhan P, Levin M. (2007). Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 301, 62-69.

- **Turek** FW, Cauter EV. Rhythms in reproduction. (1988). In: Knobil E, Neill J (eds.), The Physiology of Reproduction. *New York: Raven Press*; 1789-1830.
- Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. (2000). Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol. Genet. Metab.* 69, 85–100.
- Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*, 2(7):reviews3009.1–3009.10.
- Vizzini A, Pergolizzu M, Vazzana M, et al. (2008). FACIT Collagen (1alpha-chain) Is Expressed by Hemocytes and Epidermis During the Inflammatory Response of the Ascidian *Ciona Intestinalis*. *Dev Comp Immunol*, 32 (6):682-92.
- Vogt C. (1842). Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricans). Jent und Gassmann, Solothurn.
- Vriz S, Reiter S, Galliot B. (2014). Cell death : a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol*, 108: 121-151.
- Walther M, Ulrich R, Kroiher M, Berking S. (1996). Metamorphosis and pattern formation in *Hydractinia echinata*, a colonial hydroid. *Int J Dev Biol*, 40(1):313-22.
- Watanabe H, Hoang VT, Mättner R, Holstein TW. (2009). Immortality and the base of multicellular life: lessons from cnidarian stem cells. Semin. *Cell Dev. Biol.* 20, 1114–1125.
- Weiler-Stolt B. (1960). Über die Bedeutung der interstitiellen Zellen für die Entwicklung und Fortpflanzung mariner Hydroiden. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org*, 152(4):398-454. doi: 10.1007/BF00576346.
- Weill M, Philips A, Chourrout D, Fort P. (2005). The caspase family in urochordates: Distinct evolutionary fates in ascidians and larvaceans. *Biol Cell*. 97:857–866.
- Weis VM and Buss LW. (1987). Ultrastructure of Metamorphosis in *Hydractinia echinata*. *Postilla*. 199: 1-20.
- Weismann A. (1863). Die Entwicklung der Dipteren im Einach beobachtungen an Chironomous spec: Musca vonitoria und Pulex Canis. Z. wiss. Zool. 14: 187–336.
- Weismann A. (1864). Die nachembryonale Entwicklung der Musciden nach Beobachtungen an Musca vomitoria und Sarcophaga carnaria. Z. wiss. Zool. 14: 187–336.
- Wittig K, Kasper J, Seipp S, Leitz T. (2011). Evidence for an instructive role of apoptosis during the metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Hydrozoa). *Zoology* 114,11–22.
- Wolenski FS, Layden MJ, Martindale MQ, Gilmore TD, Finnerty JR. (2013). Charac- terizing the spatiotemporal expression of RNAs and proteins in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Nat Protoc*, 8:900–15.
- Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR. and Paul Martin P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127, 5245-5252.

- Xiao F, Bai Y, Chen Z, Li Y, Luo L, Huang J, et al. (2015). Downregulation of HOXA1 gene affects small cell lung cancer cell survival and chemoresistance under the regulation of miR-100. *European Journal of Cancer*, 50, 1541–1554.
- Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI. (2004).BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem*, 279(27):28367-74.
- Yamaguchi, Y. & Miura, M. (2013). How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell. Mol. Life Sci*, 70, 3171–3186.
- Yang B, Li L, Pu F, You W, Huang H, Ke C. (2015). Molecular cloning of two molluscan caspases and gene functional analysis during Crassostrea angulata (Fujian oyster) larval metamorphosis. *Mol Biol Rep*, 42:963–975. DOI 10.1007/s11033-014-3833-y.
- Yang Y, Wang C, Zhang P, Gao K, Wang D, Yu H, et al. (2013). Polycomb group protein PHF1 regulates p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 529–539.
- Youle RJ & Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59.
- Yuan D, Nakanishi N, Jacobs DK, Hartenstein V. (2008). Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia*. *Dev. Genes Evol*. 218, 525–539.
- Yuan J & Yankner BA. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*. Vol 407: 802-9.
- Yuan S, Liu H, Gu M, Xu L, Huang S, Ren Z, Xu A. (2010). Characterization of the Extrinsic Apoptotic Pathway in the Basal Chordate Amphioxus. *Science Signaling*, Vol. 3, Issue 139, pp. Ra66, DOI: 10.1126/scisignal.2000906.
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*, 193 (2): 247–54
- Zhan A, Macisaac HJ & Cristescu ME. (2010). Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology*, 19, 4678–4694.
- Zhang J, Pan M, Sun Z, Huang S, Yu Z, Liu D Zhao, D Lu C. The genomic underpinnings of apoptosis in the silkworm, Bombyx mori. *BMC Genom*. 11, 611.
- **Zhang** LL, Li L, Zhang GF. (2011). Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the Crassostrea gigas apoptosis system. *Dev Comp Immunol*, 35:603–610.
- **Zhao** X, et al. (2006). Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281:29357–29368.
- Zhivotovsky B, Orrenius S. (2005). Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, issue 3, 859–867.
- Zmasek CM, Zhang Q, Ye Y, Godzik A. (2007). Surprising complexity of the ancestral apoptosis network. *Genome Biol*, 8: R226.

- **Zmasek** CM, Godzik A. (2011). Strong functional patterns in the evolution of eukaryotic genomes revealed by the reconstruction of ancestral protein domain repertoires. *Genome Biol*, 12: R4.
- Zmasek CM, Godzik A. (2013). Evolution of the Animal Apoptosis Network. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5:a008649.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, & Wang X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. *elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3. *Cell*, Vol. 90, 405–413.
- Zucker I, Johnston PG, Frost D. (1980). Comparative, physiological, and biochronometric analyses of rodent seasonal reproductive cycles. *Prog Reprod Biol.* 5:102-133.