



HAL
open science

Conservation entre Cnidaires et Bilatériens d'une voie mécanosensible induisant la formation de l'endomésoderme

Tatiana Merle

► **To cite this version:**

Tatiana Merle. Conservation entre Cnidaires et Bilatériens d'une voie mécanosensible induisant la formation de l'endomésoderme. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS510 . tel-03070794

HAL Id: tel-03070794

<https://theses.hal.science/tel-03070794>

Submitted on 16 Dec 2020

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**

Spécialité : Physique

École doctorale n°564: Physique en Île-de-France

réalisée

UMR Physico-Chimie Curie

sous la direction de Emmanuel FARGE

présentée par

Tatiana MERLE

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Sujet de la thèse :

**Conservation entre Cnidaires et Bilatériens d'une
voie mécanosensible induisant la formation de
l'endomésoderme**

soutenue le 14 Décembre 2018

devant le jury composé de :

M. Timo BETZ	Rapporteur
M. Patrick LEMAIRE	Rapporteur
M ^{me} Delphine DUPREZ	Examinatrice
M. Loïc LE GOFF	Examineur
M. Emmanuel FARGE	Directeur de thèse

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vii
I Introduction	1
I.1 L'embryogenèse, régulations biochimiques et mécaniques	3
I.1.1 Régulation par les principes physiques	3
I.1.2 Contrôle génétique de l'embryogenèse	5
I.1.2.1 Régulation par des cascades biochimiques	5
I.1.2.2 Contrôle génétique de la morphogenèse biomécanique grâce au réseau contractile d'acto-myosine	7
I.1.3 L'embryogenèse, une boucle de régulation génétique et méca- nique	10
I.1.3.1 Renforcement des tissus grâce à la mécanotransduc- tion	11
I.1.3.2 Induction de la morphogenèse biomécanique grâce à la mécanosensibilité de la Myo-II	13
I.1.3.3 Induction mécanosensible de la spécialisation cellu- laire	14
I.2 Conservation d'une voie mécanotransductionnelle induisant la spéci- fication du mésoderme chez les bilatériens	18
I.2.1 Evo-Devo	18
I.2.2 Conservation de l'induction mécanique de la β -caténine chez les bilatériens	19
I.2.2.1 Mésoderme	19
I.2.2.2 La voie Wnt canonique (cWnt)	20

I.2.2.3	Conservation de l'induction mécanique suite aux premiers mouvements morphogénétiques	21
I.2.2.4	Hypothèse de travail	25
I.3	<i>Nematostella vectensis</i> : un organisme modèle pour étudier l'évolution du mésoderme	26
I.3.1	Présentation générale de <i>Nematostella vectensis</i>	26
I.3.2	Développement de l'embryon précoce	28
I.3.2.1	Gastrulation, aspects mécaniques	30
I.3.2.2	Aspects génétiques	32
I.3.2.3	Mécanosensibilité de l'expression de Brachyury dans l'embryon précoce de <i>Nematostella</i>	34
I.3.3	Difficultés liées à <i>Nematostella</i> , nécessité de l'outil informatique	36
I.4	Hypothèse de la thèse : émergence mécaniquement induite du mésoderme	37
II	Materiels et méthodes	39
II.1	Méthodes expérimentales biologiques	40
II.1.1	Culture et ponte de <i>Nematostella Vectensis</i>	40
II.1.2	Micro-injection des embryons	41
II.1.3	Rétablissement des forces mécaniques	44
II.1.3.1	Compression globale uniaxiale	44
II.1.3.2	Compressions orientées	45
II.1.4	Output : gènes et protéines	46
II.1.4.1	<i>In situ</i> hybridization et RT-qPCR pour l'observation des ARN	46
II.1.4.2	Immunofluorescence indirecte pour l'observation des protéines	48
II.2	Analyse d'image, Développements méthodologiques	50
II.2.1	Automatisation de l'analyse à l'échelle tissulaire	51
II.2.2	Squelettisation avec DisPerSE	55
II.2.3	Segmentation : Analyses à l'échelle cellulaire	58
II.2.4	Exemples d'utilisation	60
II.2.5	Listes des algorithmes utilisés dans la thèse	64
III	Résultats	67
III.1	Forces mécaniques et phosphorylation de la β cat	69

III.1.1	Caractérisation spatio-temporelle de la p- β cat chez l'embryon précoce de <i>Nematostella vectensis</i> autour de la gastrulation	69
III.1.1.1	Observations de la p- β cat lors du développement par immunofluorescence	70
III.1.1.2	Corrélation p- β cat/actine	73
III.1.1.3	La transition Blastula/Constriction : Etude du recrutement de la p- β cat en début de gastrulation . .	76
III.1.1.4	Etude de la nucléarisation de la p- β cat	80
III.1.1.5	Résumé des résultats obtenus grâce à la caractérisation	82
III.1.2	Blocage et restauration des forces mécaniques par injection du morpholino de Strabismus	83
III.1.2.1	Blocage de la gastrulation par injection de StbmMO	83
III.1.2.2	Restitution des forces mécaniques par compression globale uniaxiale	89
III.1.2.3	Résumé des résultats obtenus grâce aux injections de StbmMO et aux compressions mécaniques . . .	93
III.1.3	Anticipation des forces mécaniques dans les WT	94
III.2	Gènes sous contrôle de la p- β cat	98
III.2.1	Résultats	100
III.2.1.1	Le cas Dishevelled	100
III.2.1.2	Autres gènes, cibles potentielles de p- β cat	103
III.2.2	Discussion	107
IV	Conclusion	111
IV.1	Résumé de la thèse	112
IV.1.1	Contexte et principaux résultats	112
IV.1.2	Résumé des résultats et proposition d'un modèle de la voie mécanosensible pY654- β cat	114
IV.2	Discussion	118
IV.2.1	Mécanismes responsables du mouvement d'invagination. . .	118
IV.2.2	Déclenchement mécanosensible d'une voie de transcription .	121
IV.3	Conclusion	123
A	Liste des abréviations	125
B	Merle and Farge (2018)	129

Bibliographie

139

Résumé

L'émergence du mésoderme est une transition évolutive importante mais dont l'origine est encore mal comprise. Précédemment, l'équipe a identifié une voie mécanosensible induisant la différenciation du mésoderme chez des embryons bilatériens. Les contraintes mécaniques des premiers mouvements morphogénétiques induisent un changement de conformation de la β caténine jonctionnelle, permettant sa phosphorylation par les Src-family kinases. Elle est alors relarguée des jonctions adhérentes, transloque dans le noyau et déclenche des voies de transcription menant à l'expression des gènes mésodermaux.

Pour tester les origines évolutives de cette voie mécanosensible, nous avons travaillé sur le cnidaire, *Nematostella vectensis*, dont le dernier ancêtre commun avec les bilatériens remonte à plus de 600 millions d'années. Nous avons testé l'activation de la voie mécanosensible β caténine suite à la gastrulation.

Par immunofluorescence, nous avons montré que la β caténine est phosphorylée sur le son site tyrosine Y654 (pY654- β caténine) dans les cellules constrictées du futur endomésoderme en début de gastrulation. Nous avons observé que l'inhibition de la densification du réseau d'actine -par injections de morpholinos de *Strabismus* (*StbmMO*)- inhibe la pY654- β caténine. Cette phosphorylation est mécanosensible puisque nous avons ramené les niveaux de pY654- β caténine à la normale en comprimant mécaniquement les embryons inhibés.

Grâce à une analyse informatisée, nous avons révélé que les signaux d'actine jonctionnelle et de pY654- β caténine sont positivement corrélés. Nous postulons que les tensions induites par le réseau d'actomyosine, nécessaires à l'invagination du blastopore, activent la voie β caténine.

Nous avons commencé à tester la fonctionnalité de cette voie en identifiant des gènes dont l'expression est modifiée par injections de StbmMO.

Les résultats de cette thèse indiquent que la voie mécanosensible β caténine semble être conservée et remonterait donc à plus de 600 millions d'années.

Abstract

The mesoderm's emergence is an important -but still poorly understood- evolutionary transition. Previously, the team identified a mechanosensitive pathway inducing mesoderm specification in bilaterian embryos. The mechanical constraints of the first morphogenetic movements induce a conformational change of the junctional β catenin protein allowing its phosphorylation on its Y654 site by Src-family kinases. The β catenin protein is then released from the junctions, translocates into the nucleus and triggers mesodermal gene expression.

To test the evolutionary origins of the mechanosensitive β catenin pathway, we worked on the cnidarian *Nematostella vectensis*, who diverged from bilaterians more than 600 million years ago. We tested the activation of the β catenin mechanosensitive pathway by endogenous mechanical cues and its role in endomesoderm specification.

By carrying out immunofluorescence imaging at the gastrulation stage, we showed that the β catenin protein is phosphorylated on its Y654 site (pY654- β catenin) in the constricted cells of the future endomesoderm. We observed that the inhibition of the actin network densification -upon morpholinos injections (StbmMO)-inhibits the pY654- β catenin. This phosphorylation is mechanosensitive since we rescued pY654- β catenin levels to normal by compressing inhibited embryos.

Through computer analysis, we found that the junctional actin signals and the pY654- β catenin signals are positively correlated. We postulate that the tensions induced by the actomyosin network, necessary for blastopore invagination, trigger the mecanosensitive β catenin pathway.

We also identified genes whose expression are altered by StbmMO injections and

so maybe by mechanical constraint inhibition.

These results indicate that the β catenin mechanosensitive pathway seems to be conserved in a cnidarian and therefore probably dates back more than 600 million years.

Chapitre I

Introduction

Contents

I.1	L'embryogenèse, régulations biochimiques et mécaniques	3
	
I.1.1	Régulation par les principes physiques	3
I.1.2	Contrôle génétique de l'embryogenèse	5
I.1.2.1	Régulation par des cascades biochimiques	5
I.1.2.2	Contrôle génétique de la morphogenèse biomécanique grâce au réseau contractile d'acto-myosine	7
I.1.3	L'embryogenèse, une boucle de régulation génétique et mécanique	10
I.1.3.1	Renforcement des tissus grâce à la mécanotransduction	11
I.1.3.2	Induction de la morphogenèse biomécanique grâce à la mécanosensibilité de la Myo-II	13
I.1.3.3	Induction mécanosensible de la spécialisation cellulaire	14
I.2	Conservation d'une voie mécanotransductionnelle induisant la spécification du mésoderme chez les bilatériens	18
I.2.1	Evo-Devo	18
I.2.2	Conservation de l'induction mécanique de la β -caténine chez les bilatériens	19
I.2.2.1	Mésoderme	19
I.2.2.2	La voie Wnt canonique (cWnt)	20

I.2.2.3	Conservation de l'induction mécanique suite aux premiers mouvements morphogénétiques	21
I.2.2.4	Hypothèse de travail	25
I.3	Nematostella vectensis : un organisme modèle pour étudier l'évolution du mésoderme	26
I.3.1	Présentation générale de <i>Nematostella vectensis</i>	26
I.3.2	Développement de l'embryon précoce	28
I.3.2.1	Gastrulation, aspects mécaniques	30
I.3.2.2	Aspects génétiques	32
I.3.2.3	Mécanosensibilité de l'expression de Brachyury dans l'embryon précoce de <i>Nematostella</i>	34
I.3.3	Difficultés liées à <i>Nematostella</i> , nécessité de l'outil informatique	36
I.4	Hypothèse de la thèse : émergence mécaniquement induite du mésoderme	37

I.1 L'embryogenèse, régulations biochimiques et mécaniques

L'embryogenèse consiste en l'élaboration d'un être vivant multicellulaire. Durant ce processus, les cellules de l'organisme se divisent à partir d'une seule cellule œuf et se différencient progressivement pour finir par former l'organisme entier. Lors de la différenciation, les cellules -qui possèdent toutes le même code génétique- acquièrent une forme et des propriétés mécaniques propres ainsi qu'une fonction précise.

Depuis la découverte du génome, étudier l'embryogenèse consiste principalement à tenter de comprendre les signaux permettant d'exprimer une partie du génome plutôt qu'une autre, qui permet l'élaboration de la forme et du destin cellulaire. Dans cette quête, l'établissement des formes et des fonctions biochimiques ont longtemps été considérés comme déconnectés.

I.1.1 Régulation par les principes physiques

Pendant l'antiquité déjà, on étudiait le développement de l'embryon. C'est Aristote qui, le premier rédige un traité d'embryologie dans lequel il décrit le développement de l'embryon de poulet étape par étape, proposant que chaque étape est nécessaire au bon développement de la suivante. Ses observations feront date dans l'histoire de l'embryologie car il introduit la notion de cascades développementales induisant le développement. Pendant les siècles qui suivent, on décrit l'établissement des formes comme étant simplement le produit de paramètres mécaniques. Si bien, qu'au 19^{ème} siècle naît en Allemagne une science de l'embryogenèse entièrement basée sur l'influence de la mécanique, la *Entwicklungsmechanik*, inspirée par les travaux de Wilhelm Roux ([Roux, 1881](#)).

En détruisant certaines parties de l'embryon, en en transplantant d'autres, en variant des paramètres physiques (comme la pression, la température, etc.) ou chimiques, les scientifiques comme Wilhelm Roux ou Stéphane Leduc ([Leduc, 1910](#)) cherchent minutieusement à comprendre le développement de l'embryon sur la base de concepts avant tout physiques.

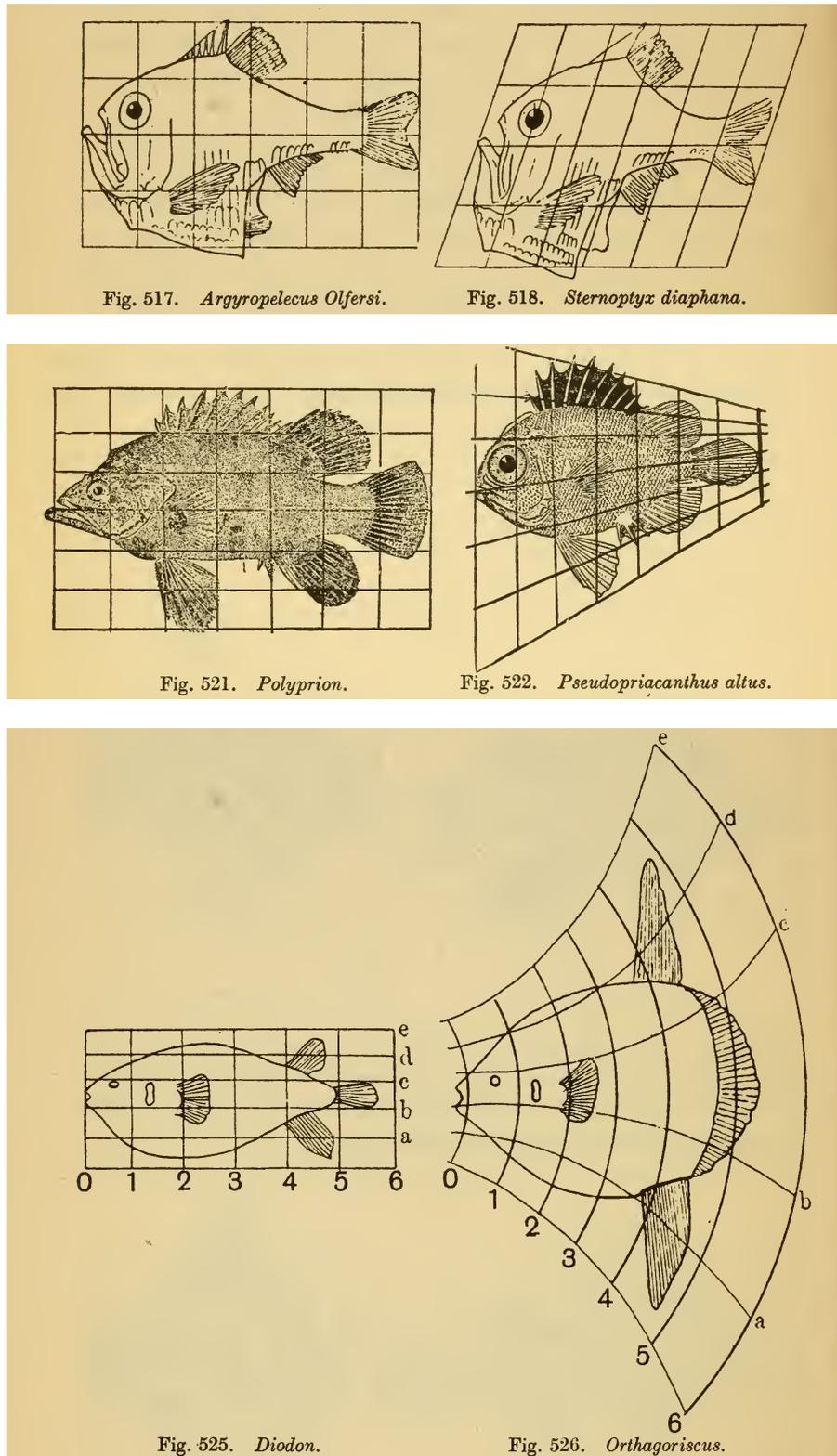


Fig. I.1 Illustration de la théorie des transformations, extrait de l'ouvrage *On Growth and Form*, Thompson (1917 puis 1942)

Au début du 20^{ème} siècle, le biologiste et mathématicien D'Arcy Thompson publie la première version (1917) de "On Growth and Form" (Thompson, 1942), ouvrage qui aura un accueil retentissant. Il y décrit les formes des êtres vivants à travers le prisme des sciences mathématiques, en associant la phyllotaxie (étude de l'implantation des rameaux d'une plante) et la suite de Fibonacci par exemple, ou encore la forme des cornes de bovidés avec les spirales logarithmiques. Dans la lignée de la *Entwicklungsmechanik*, l'élaboration des formes selon lui n'obéit qu'aux lois physiques, à l'image de l'analogie qu'il fait entre la forme des bulles de savon et les agrégats cellulaires; analogie toujours étudiée de nos jours.

Le chapitre "The Theory of Transformations" retiendra particulièrement l'attention. Selon Thompson, certaines différences morphologiques entre les espèces sont plus facilement explicables par déformation, que par le réarrangement de chacune des parties. Par exemple, en appliquant une déformation de cisaillement, le *Argyropsocus Olfersi* devient un *Sternopyxdiaphana*, deux poissons de la même famille (cf.Fig.I.1).

Ainsi, la morphogenèse et la spécification cellulaire -peu caractérisée avant l'avènement de la biologie moléculaire, étaient, au 20^{ème} siècle, encore considérées comme deux phénomènes indépendants.

I.1.2 Contrôle génétique de l'embryogenèse

I.1.2.1 Régulation par des cascades biochimiques

C'est beaucoup plus récemment, et grâce aux travaux de T. Hunt Morgan sur la théorie chromosomique de l'hérédité, que E.B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E. Wieschaus établissent à la fin des années 70 que, dans l'embryon de drosophile, les toutes premières étapes de la morphogenèse sont régulées génétiquement (Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980).

L'embryon est d'abord divisé en différentes régions grâce à ce que A.M. Turing avait appelé des "morphogènes", molécules de signalisation déterminant le destin cellulaire grâce à leur concentration (Turing, 1952). Ensuite seulement, les différentes régions sont modelées. La morphogenèse est donc contrôlée génétiquement par ce que l'on nommera des gènes maîtres du développement embryonnaire.

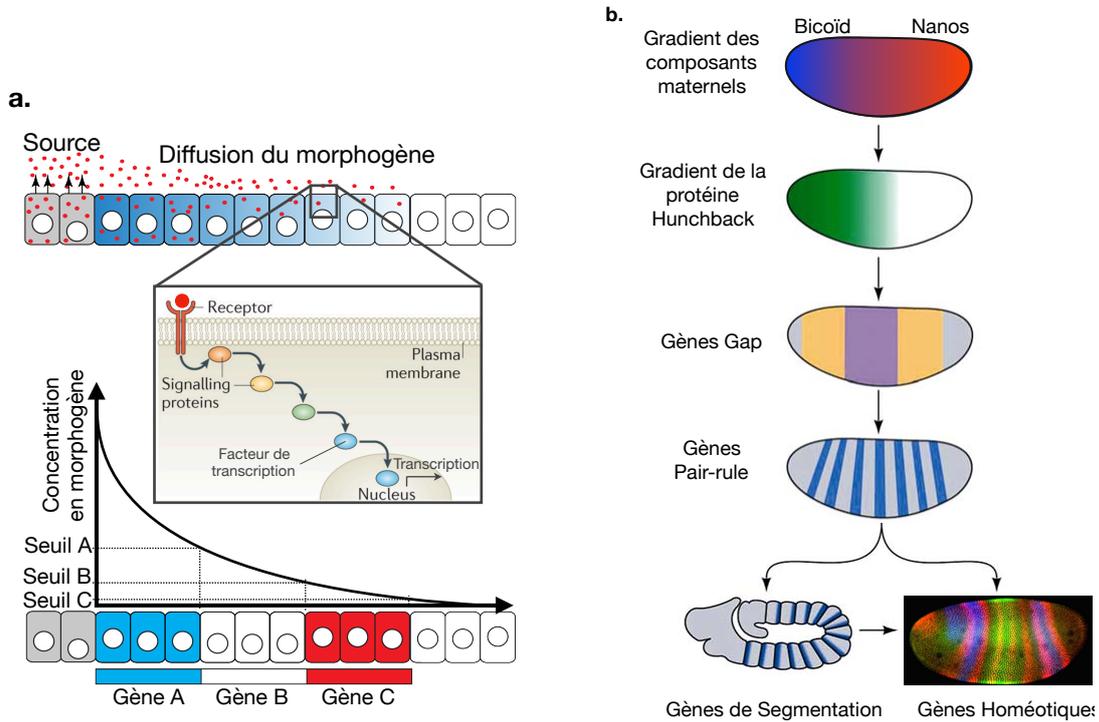


Fig. I.2 **Contrôle génétique de la spécialisation cellulaire et de la morphogénèse.**

a. Modèle du "French Flag" : l'expression de certains gènes est contrôlée par la concentration de morphogènes émis par une source. Les morphogènes diffusent alors à travers le *yolk* (comme représenté ici) mais il a été aussi proposé qu'ils puissent aussi être transporté par transcytose à travers les cellules. En fonction de sa concentration, des cascades de signalisation différentes sont déclenchées pouvant entraîner la transcription de gènes spécifiques.

b. Cascades génétiques : certains morphogènes comme *Bicoid* sont présents maternellement sous forme de gradient. Ce morphogène est un facteur de transcription qui entraîne une cascade de régulation biochimique et génétique qui permet de générer non seulement les gènes homéotiques, mais également la morphogénèse des segments. Adapté de [DuFort et al. \(2011\)](#)

Dans l'embryon de drosophile, la régulation génétique de la morphogénèse n'est pas directe. Elle se fait grâce à la diffusion sur de longues distances (à l'échelle tissulaire) de morphogènes qui peuvent agir comme facteurs de transcription ou d'inhibition de gènes en aval, en fonction de leur concentration, en déclenchant des cascades de signalisation. Ces gènes contrôlent alors toute une machinerie moléculaire complexe qui régule aussi la forme des cellules, leur tension corticale, les forces qu'elles exercent sur leurs voisins, etc... *Bicoid* est le premier morphogène à avoir

été identifié (Driever and Nüsslein-Volhard, 1988). Sa concentration maternelle régule les premières étapes de l'embryogenèse de la drosophile, en déclenchant une cascade de régulation biochimique permettant d'établir les motifs génétiques, mais aussi la structuration géométrique sous forme de segments (cf. Fig.I.2).

Le réseau de régulation génique (GRN pour "Genetic Regulatory Network") est complexe et à été largement étudié ces trente dernières années.

Dans l'embryon de drosophile, l'invagination du mésoderme est contrôlée par l'expression des gènes *twist* et *snail* (Leptin, 1991). Les gènes *bicoïd*, *nanos* et *torso-like*, quant à eux, sont nécessaires aux mouvements de convergence-extension (C&E) au début de la gastrulation de l'embryon drosophile (Irvine KD, 1994). Dans différentes espèces, les mouvements de C&E sont aussi régulés de manière génétique, et des gènes ont été identifiés : *wnt-5a* chez le Xénope (Moon et al., 1993) et *silberblick/wnt11* et *wnt5* chez le poisson zèbre (Heisenberg et al., 2000).

I.1.2.2 Contrôle génétique de la morphogénèse biomécanique grâce au réseau contractile d'acto-myosine

La régulation génétique des formes des cellules et de leur propriétés mécaniques se fait grâce au contrôle du cytosquelette cellulaire. Le contrôle génétique du cytosquelette est décrit dans la publication Munjal and Lecuit (2014).

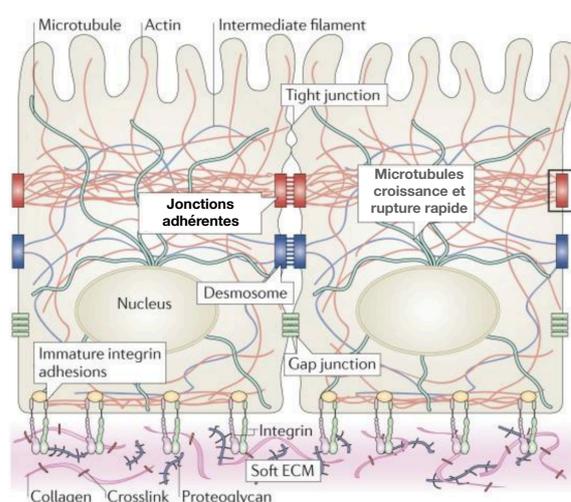


Figure I.3 – Organisation cellulaire Les cellules épithéliales adhèrent à la matrice extra-cellulaire à travers les intégrines. Elles adhèrent aussi entre elles grâce à différents types de jonctions, les "tight junctions" les desmosomes, les "gap junctions" et les jonctions adhérentes. A l'intérieur de la cellule, l'architecture, les propriétés mécaniques et le transport de protéines sont organisées par les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine.

Illustration issue de DuFort et al. (2011)

- **L'actine**

Le cytosquelette est composé principalement de trois types de molécules structurales : les filaments intermédiaires, qui assurent la résistance mécanique cellulaire, les microtubules, qui dirigent le transport et organisent spatialement les différents composants cellulaires et les filaments d'actine.

L'actine est une protéine extrêmement conservée chez les eukaryotes, présente dans la quasi totalité des cellules du corps. L'actine est composée de monomères capables de s'assembler entre eux afin de former de longs filaments polarisés. A une extrémité, notée (+), les monomères s'attachent alors qu'à l'autre extrémité, les monomères se dissocient de la structure filamenteuse.

Ces filaments peuvent s'assembler entre eux. Cet assemblage est régulé par des complexes de protéines, comme par exemple Arp2/3 qui permet la nucléation de nouveaux filaments liés aux autres et ainsi de construire un réseau branché, ou encore la myosine (cf. point suivant). Une très bonne synthèse de ces processus peut être trouvée dans le livre *Biologie Moléculaire de la cellule*, [Alberts \(1993\)](#).

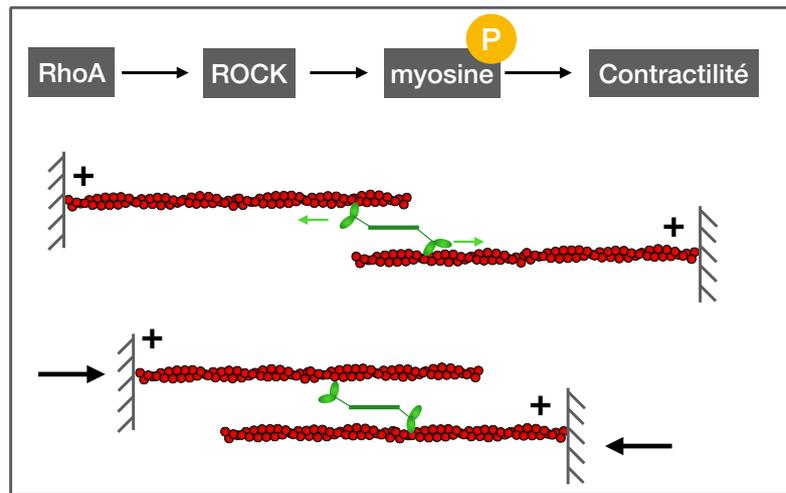
Grâce à ces protéines de liaison, les filaments d'actine sont organisés en différentes structures dans les cellules endothéliales comme les fibres de stress qui sont des assemblages de filaments pouvant exercer des forces. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement à **l'actine corticale**, composée de filaments désordonnés d'actine formant un maillage sous la membrane et à la **ceinture d'adhérence** qui est un réseau contractile d'actine sur la périphérie (intérieure) de la cellule, lié aux jonctions adhérentes.

- **La myosine-II**

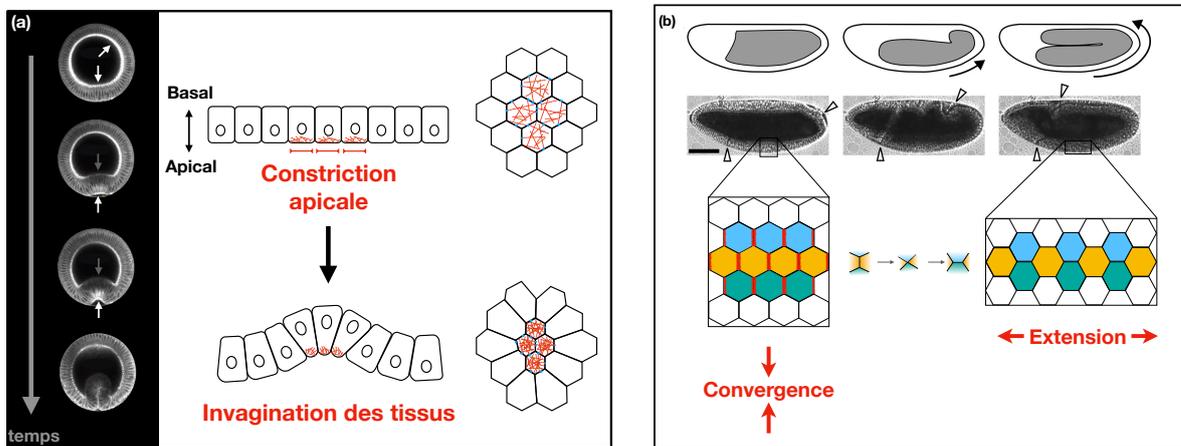
La myosine-II (Myo-II) se lie aux filaments d'actine et permet de d'activer la contractilité de ceux-ci. La myosine peut exercer des forces sur les filaments d'actine, et ainsi transmettre ces forces aux jonctions cellulaires et même au noyau.

La myosine agit comme un moteur moléculaire grâce à ses deux têtes globulaires. Chacune des têtes contient deux sites de liaison ; un avec l'actine et un avec l'ATP. Grâce à l'hydrolyse de l'ATP en ADP, elle peut changer de conformation, et "avancer" le long des filaments vers la partie (+). Comme elle est liée, grâce à sa chaîne légère à d'autres protéine de myosine, elles-même liées à des filaments d'actine, elle peut ainsi tirer les filaments, ce qui exerce des forces sur le cortex cellulaire.

La concentration locale de Myo-II est régulée génétiquement, permettant ainsi la modification des formes cellulaires. La voie de signalisation implique RhoA, qui permet d'activer ROCK (Rho-associated protein kinase), induisant ainsi la phosphorylation de la Myo-II, et son activité contractile.



(1) La voie de signalisation Rho permet d'activer l'activité contractile de la myosine-II



(2) Exemples dans l'embryon précoce de drosophile (a) Invagination du mésoderme grâce à la constriction apicale des cellules (b) Mouvements de C&E permettant l'élongation de la bande germinale grâce à la polarisation du réseau d'acto-myosine induisant l'intercalation cellulaire

Fig. I.4 Morphogenèse biomécanique générée par le contrôle génétique de l'activité contractile de l'acto-myosine

Par exemple, dans l'embryon de drosophile, les protéines Twist et Snail permettent l'accumulation médio-apicale de Myo-II dans les futures cellules du mésoderme. La maille d'acto-myosine rétrécit les apex cellulaires, entraînant un rétrécissement apical qui déclenche l'invagination de l'épithélium (Dawes-Hoang, 2005). Dans la même espèce, le même type de processus est à l'œuvre pour l'invagination de l'endoderme postérieur (Young et al., 1991). Ce mécanisme est également conservé entre les espèces, car on le retrouve C-Elegans ou les ascidies par exemple. Chez ces dernières, l'invagination de l'endoderme a lieu en deux phases distinctes. L'aplatissement apical des cellules de l'endoderme est suivi par leur rétrécissement dans l'axe apico-basal. Ces deux étapes sont régulées par le contrôle génétique de la Myo-II ; phosphorylée une fois pour la myosine apicale et deux fois pour la myosine jonctionnelle (Sherrard et al., 2010).

La contractilité du réseau d'acto-myosine peut aussi réguler des processus d'élongation des tissus comme la bande germinale de l'embryon de drosophile grâce aux mouvements de convergence-extension (C&E). L'acto-myosine jonctionnelle est polarisée le long des parois, et rétrécit les jonctions cellulaires selon une direction particulière forçant les cellules à s'intercaler entre leurs voisines (cf. Fig.I.4). Ainsi, grâce au seul réarrangement des jonctions cellulaires, le tissu s'allonge dans une direction.

Ces résultats ont montré de façon intéressante que la morphogenèse de l'embryon, qui obéit aux lois de la physique newtonienne, est aussi le produit de régulations biochimiques. Grâce à un contrôle génétique de molécules appelées morphogènes, des machineries cellulaires se mettent en place pour introduire à un stade de développement donné les forces internes nécessaires au développement.

I.1.3 L'embryogenèse, une boucle de régulation génétique et mécanique

Inversement, il a été démontré dans les années 2000 que des cascades biochimiques peuvent être déclenchées ou contrôlées par les contraintes mécaniques grâce à la mécanotransduction, processus par lequel une cellule transforme un stimulus mécanique en un signal biochimique. La mécanotransduction peut influencer le développement embryonnaire à différents niveaux : les contraintes mécaniques peuvent réguler la machinerie cellulaire déjà existante (post-transcriptionnelle), mais elle

peut aussi influencer le destin cellulaire en induisant (ou en réprimant) l'expression de gènes.

Le contrôle physique de la morphogénèse et de la spécification cellulaire permet d'assurer la robustesse de l'embryogenèse de la même manière que le gradient des morphogènes. En effet, pour les morphogènes ou pour les contraintes, nous avons affaire à des régulations à l'échelle tissulaire. Peu importe le nombre exacte de cellules d'un organe, ces mécanismes permettent d'en assurer la reproductibilité malgré des tailles pouvant varier (Uygur et al., 2016). Cependant, les contraintes mécaniques peuvent se propager beaucoup plus rapidement que les morphogènes ne diffusent, et les morphogènes ne peuvent pas diffuser facilement dans tout type de tissu. Les contraintes mécaniques pourraient donc prendre le relais de la diffusion des morphogènes dans ce genre de situation afin de transmettre des informations sur de grandes distances et extrêmement rapidement.

Devant la variété des mécanismes observés et pour les besoins de cette thèse, nous nous intéressons ci-après à quelques processus spécifiques de mécanotransduction, à savoir la mécanosensibilité de la myosine et son impact sur la morphogénèse et la mécanosensibilité de la β cat et son rôle dans l'expression génique.

I.1.3.1 Renforcement des tissus grâce à la mécanotransduction

Nous avons vu que la Myo-II a un fort impact sur les propriétés mécaniques de la cellule grâce à son activité contractile. Cependant, l'activité de la Myo-II peut elle-même être régulée par les contraintes mécaniques.

- **La mécanosensibilité de la Myo-II aide au renforcement des tissus**

Le comportement mécanosensible de la Myo-II a d'abord été observé en culture cellulaire (Effler et al., 2006). *In vivo*, une simple aspiration par micropipette dans l'ectoderme de l'embryons de drosophile augmente la concentration jonctionnelle de Myo-II, ce qui suggère un renforcement mécanosensible des jonctions. De la même manière, la concentration en Myo-II augmente *in vivo* dans le tissu ectodermique en réponse aux mouvements morphogénétiques C&E de la gastrulation chez les embryons de drosophile Fernandez-Gonzalez et al. (2009).

La Myo-II est aussi stabilisée grâce aux tensions au niveau de l'anneau de cicatrisation d'une blessure pendant l'embryogenèse de la drosophile (Kobb et al., 2017).

La tension de l'anneau contractile augmente et génère la fermeture de la plaie. Lors de l'invagination du mésoderme dans l'embryon de *C-elegans*, il a été montré que les jonctions adhérentes sont renforcées par les tensions ce qui permet de préserver l'intégrité des tissus (Zhang et al., 2011).

- **La mécanotransduction aux jonctions cellulaires aide au renforcement des tissus**

Les jonctions cellule-cellule ou cellule-matrice sont des vecteurs de transmission des forces et donc logiquement, un lieu privilégié de mécanotransduction. Les cellules sont liées entre elles et à la matrice extra-cellulaire (ECM) grâce à des complexes protéiques trans-membranaires, reliés au cytosquelette. Ce sont donc ces jonctions qui sont capables de transmettre les forces de cellules en cellules (ou entre l'ECM et la cellule). Les E-cadhérines sont les molécules trans-membranaires qui lient les cellules entre elles : à l'extérieur de la cellule, elles sont liées à d'autres E-cadhérines, à l'intérieur, elles sont reliées au cortex d'acto-myosine grâce à l' α - et la β -caténine (α -cat et β -cat).

L'activité mécanotransductionnelle de ces structures lors du développement peut amener à renforcer le cortex d'acto-myosine.

Le rôle important que jouent les jonctions cellulaires dans le renforcement du cytosquelette a été observé *in vivo* dans des embryons précoces de poissons zèbres. Chez les mutants présentant une α -caténine dont le domaine central est déficient -domaine connu pour être mécanosensible en culture cellulaire- les contraintes mécaniques dues à la gastrulation entraînent des défauts d'élongation et de C&E (Han et al., 2016). En culture cellulaire, soumise à une force supérieure à 5pN, la conformation de l' α -cat est modifiée : la protéine "s'ouvre" et des effecteurs tels que la Vinculine y ont alors accès, ce qui permet le renforcement actif -grâce à l'acto-myosine- des jonctions adhérentes (Yao et al., 2014). Un processus moléculaire similaire a donc été proposé pour assurer l'intégrité de la morphogenèse et des mouvements de C&E face aux contraintes générées par les mouvements morphogénétiques embryonnaires du début du développement (Han et al., 2016).

D'autres voies participent au renforcement des tissus lors de la morphogenèse, comme la voie de signalisation mécanosensible Yap/Taz (Dupont et al., 2011) qui s'est avérée nécessaire au maintien de la forme générale de l'embryon de poisson zèbre. La protéine ARHGAP18 activant la Rho GTPase préserve la rigidité du

tissu embryonnaire contre les déformations induites par la gravité dans un processus dépendant de Yap/Taz [Porazinski et al. \(2015\)](#).

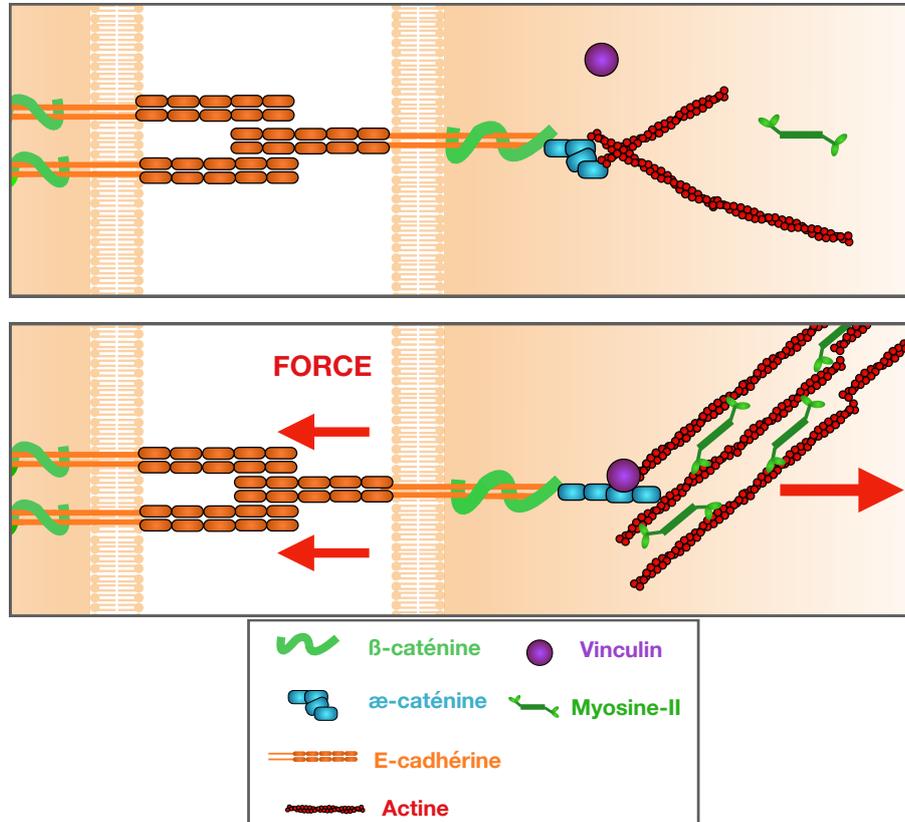


Fig. I.5 *Mécanosensibilité des jonctions adhérentes.*

Soumise à des forces l' α -caténine change de conformation et ouvre un site de liaison à la Vinculine. La Vinculine se lie aux filaments d'acto-myosine.

Figure inspirée de [DuFort et al. \(2011\)](#)

I.1.3.2 Induction de la morphogénèse biomécanique grâce à la mécanosensibilité de la Myo-II

La mécanosensibilité de Myo-II n'est pas seulement impliquée dans le renforcement tissulaire suite aux mouvements morphogénétiques endogènes. Elle déclenche également des mouvements morphogénétiques en réponse aux contraintes mécaniques développées par les mouvements morphogénétiques de l'étape précédente.

Par exemple, juste avant l'invagination du mésoderme de l'embryon de drosophile, les pulsations des apex cellulaires induites par Snail permettent de stimuler mécaniquement la Myo-II et induisent son accumulation médio-apicale régulée.

C'est cette accumulation qui permet de réduire les apex des cellules et de déclencher l'invagination du mésoderme (cf. Fig.I.4). Les pulsations des apex inhibent mécaniquement l'endocytose de Fog et accentuent son exocytose, probablement grâce à l'augmentation de la tension des membranes, déclenchant ainsi la voie Rho en aval menant à une accumulation médio-apicale de la Myo-II (Pouille, 2009; Mitrossilis et al., 2017). De plus, l'invagination du mésoderme, qui est le tout premier mouvement morphogénétique chez la drosophile, et qui est, comme nous venons de la voir, déclenchée mécaniquement, active aussi l'invagination de l'endoderme postérieur (Mitrossilis et al., 2017)

Ainsi, la mécanosensibilité de la Myo-II est au cœur d'une cascade biomécanique auto-induite de mouvements morphogénétiques. Cela permet, non seulement de renforcer les tissus soumis aux contraintes de la morphogenèse, mais aussi de déclencher des mouvements morphogénétiques.

Le rôle de la mécanotransduction lors du développement ne s'arrête pas là cependant. Les contraintes mécaniques peuvent aussi influencer la spécialisation cellulaire en déclenchant des cascades de signalisation entraînant une activité transcriptionnelle.

I.1.3.3 Induction mécanosensible de la spécialisation cellulaire

Les premiers travaux rapportant une induction mécanotransductionnelle de l'expression génique à différents stress mécaniques (Yang et al., 2000; Rauch et al., 2002; Hove et al., 2003; Farge, 2003) datent du début des années 2000 .

L'induction mécanique de la spécialisation cellulaire lors du développement a été observée dans différentes espèces et sous différentes formes, c'est à dire que le stimulateur mécanique peut varier de nature. Par exemple, il a été montré que la compression des tissus provoque la différenciation du tube gastrique antérieur de la larve de drosophile de façon vitale (Farge, 2003; Desprat, 2008). La formation des dents dans l'embryon de souris est aussi régulée par les contraintes mécaniques de la compression tissulaire lors du développement (Mammoto et al., 2011). Lors de la formation du cœur du poisson-zèbre, la pression générée par le flux sanguin peut modifier l'expression de plusieurs gènes (North et al., 2009; Hove et al., 2003; Peralta et al., 2013). La pression hydrostatique peut également influencer l'expression génique (Yang et al., 2000; Planas-Paz et al., 2012; Olsen et al., 2011) ou

encore, la pression osmotique peut modifier la tension de la membrane plasmique qui est importante pour l'endo et l'exo-cytose de protéines pouvant activer des voies transcriptionnelles [Rauch et al. \(2002\)](#). Les plantes ne sont pas en reste ; chez *Arabidopsis thaliana*, des voies mécanotransductionnelles ont été identifiées permettant une boucle de régulation entre la croissance du méristème et l'expression du gène *shoot meristemless*, qui définit l'identité même du méristème ([Landrein et al., 2015](#)). Ces exemples sont récapitulés dans la review [Chan et al. \(2017\)](#).

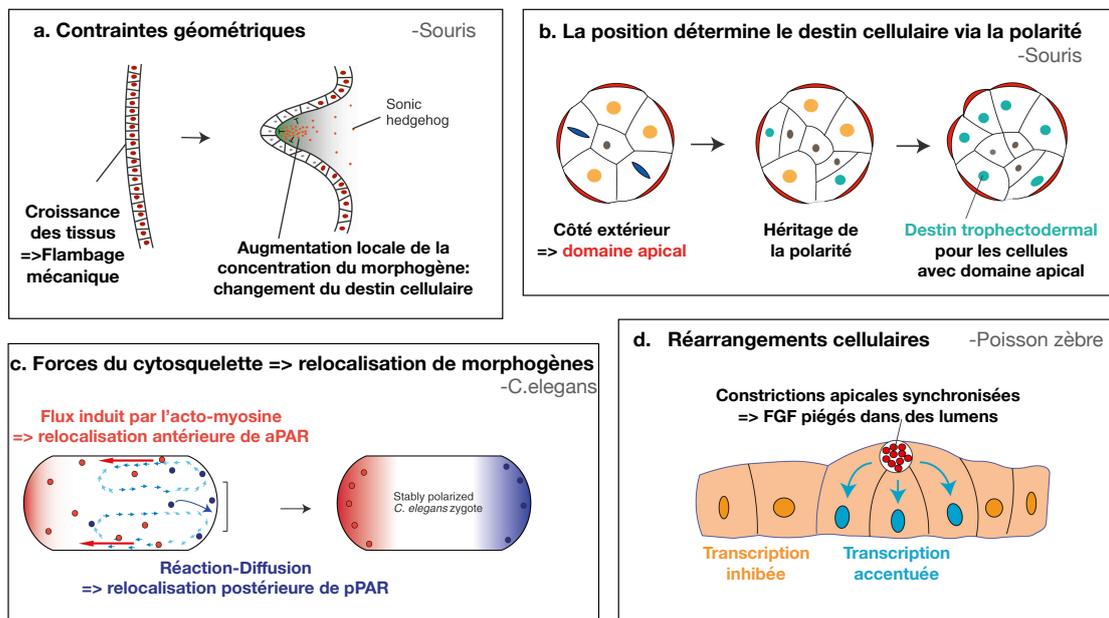


Fig. I.6 **Mécanotransduction affectant le destin cellulaire lors du développement** (a) Dans l'intestin de l'embryon de souris, la croissance des tissus induit leur flambage mécanique. Dans les zones contraintes, le morphogène Shh s'accumule, et inhibe la différenciation cellulaire. ([Shyer et al., 2015, 2013](#)) (b) Dans l'embryon précoce de souris, au stade huit-cellules, le domaine apical, qui se forme sur la couche externe de l'embryon, est hérité la cellule-fille externe. Cette cellule deviendra une cellule du trophectoderme, c'est à dire de la couche externe. ([Nishioka et al., 2009; Maître et al., 2016](#)) (c) Dans le zygote de *C. elegans*, l'acto-myosine redistribue la protéine aPAR vers la partie antérieure par advection, tandis que la protéine pPAR est transportée vers la partie postérieure de l'embryon-cellule par réaction-diffusion. ([Naganathan et al., 2014; Goehring et al., 2011](#)) (d) Dans le primordium de la ligne latérale, la constriction apicale synchronisée des cellules entraîne l'emprisonnement de FGF dans des micro-lumens. FGF accentuera la transcription de ces cellules tandis qu'elle sera inhibée dans les cellules environnantes. ([Durdu et al., 2014](#))
 Adapté de [Chan et al. \(2017\)](#)

Plusieurs mécanismes moléculaires ont été identifiés. Voir les exemples de la Fig.I.6.

Devant la variété des phénomènes existants, nous nous intéresserons à un mécanisme bien caractérisé et important pour le sujet de cet étude, la mécanosensibilité de la β cat.

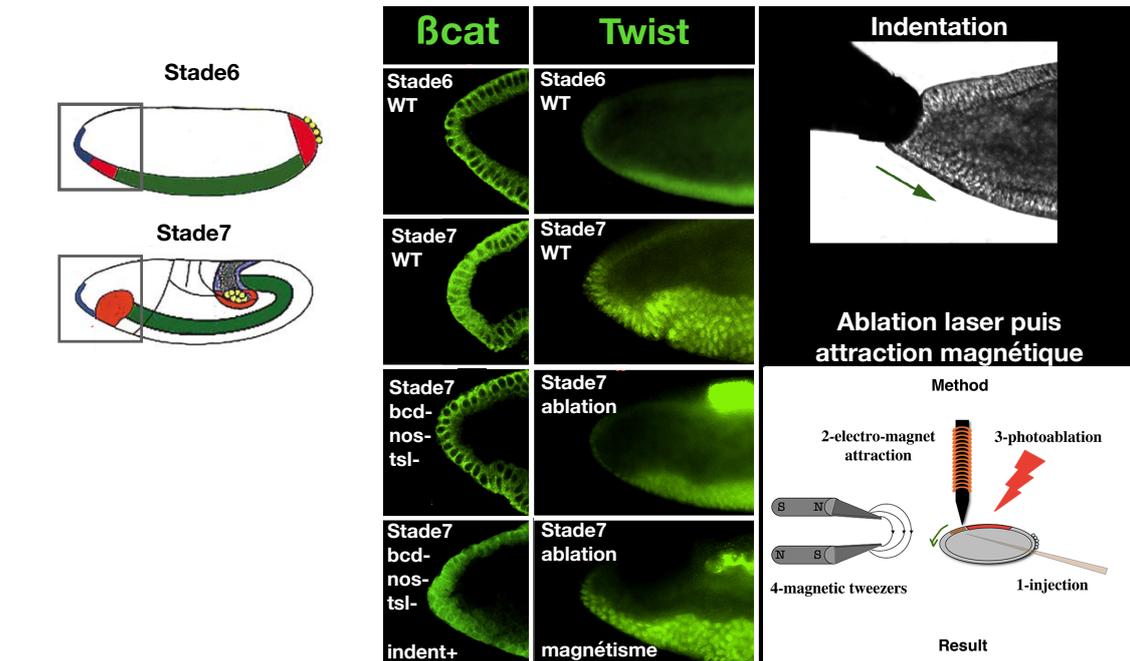
● Mécanosensibilité de la β caténine

La β caténine joue un rôle important dans la conversion de l'information mécanique en information transcriptionnelle. Comme nous l'avons vu, cette protéine permet de faire la liaison entre les E-cadhérines et le cytosquelette d'acto-myosine.

La mécanosensibilité de la β cat a récemment été observée dans plusieurs processus de développement distincts (Farge, 2003; Brunet et al., 2013; Shyer et al., 2017; Röper et al., 2018).

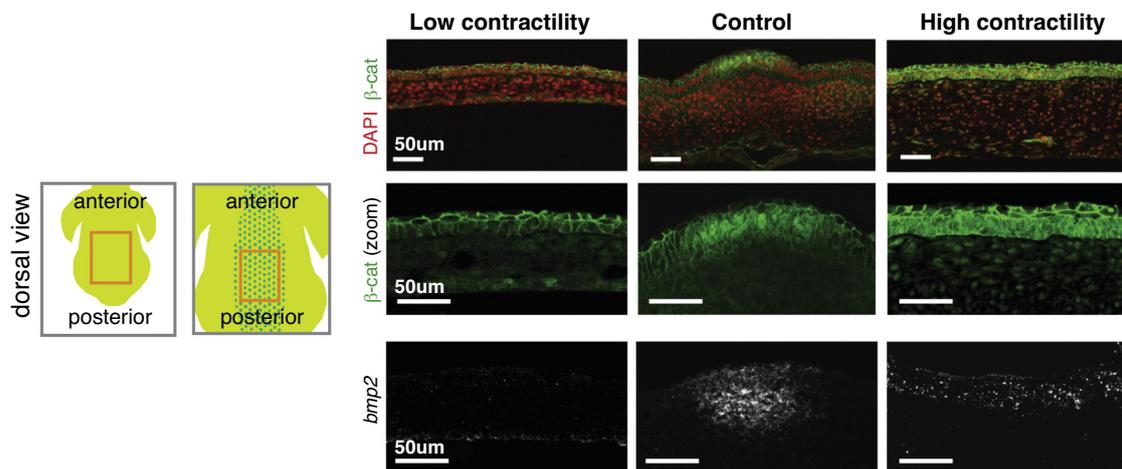
Par exemple, lors de la gastrulation d'embryons de drosophile, les contraintes mécaniques développées par les mouvements de C&E induisent l'activation de la β caténine. Sa translocation dans le noyau et son activité de cofacteur de transcription avec Tcf conduit à l'expression du gène *twist* dans l'endoderme antérieur et joue un rôle vital dans la différenciation fonctionnelle des cellules de l'intestin au stade larvaire (Farge, 2003; Desprat, 2008). Comme nous le verrons plus en détail (Part.I.2.2.3), ce processus est aussi impliqué dans l'expression de Twist lors de la spécification du mésoderme. La phosphorylation mécaniquement induite du site Y654 de la β cat provoque le relargage de la β cat jonctionnelle dans le cytoplasme puis sa translocation dans le noyau (Brunet et al., 2013; Röper et al., 2018). De même, au cours du développement osseux des embryons de souris, *sox9* est exprimée en aval de l'activation mécanique de la β cat en réponse à l'activité spontanée du muscle pour prévenir la différenciation osseuse dans les articulations (Kahn, 2009).

Plus récemment, il a été montré que la β cat amorce aussi la différenciation des follicules des plumes au cours du développement du poulet (Shyer et al., 2017). En effet, en réponse au flambage de l'épiderme sous tension -due à la Myo-II- la β cat est phosphorylée sur le site Y654 et transloque dans le noyau des domaines cellulaires pliés. Lorsque l'activité contractile de Myo-II est bloquée par la blebbistatine, aucun flambage des tissus n'a été observé et par conséquent, l'activation de la β cat et l'expression de son gène cible *bmp2* (connu pour être en amont de la différenciation des cellules folliculaires) sont inhibés. Voir Fig.I.7.



(1) *Expression de twist par la mécanosensibilité de la β cat dans l'endoderme antérieur de l'embryon de drosophile* (Farge, 2003; Desprat, 2008)

Lorsque l'on inhibe les contraintes mécaniques créées par les tissus environnants par ablation, ou en utilisant un triple mutant de *bcd*, *nos* et *tsl*, la β cat n'est plus nucléarisée et l'expression de *twist* est inhibée. On peut restaurer ces deux phénomènes par en rétablissant les contraintes mécaniques, par indentation ou par manipulation magnétique.



(2) *Expression de *bmp2* induite par la mécanosensibilité de la β cat dans la différenciation des follicules du poulet*

Dans l'embryon de poulet, le flambage des tissus induit le relargage de la β cat dans la cellule et l'expression du gène folliculaire *bmp2*. Ces deux phénomènes sont inhibés lorsque les contraintes mécaniques sont bloquées.

Adapté de (Shyer et al., 2017)

Fig. I.7 La mécanosensibilité de la β cat à l'origine de l'expression génique dans différents contextes développementaux

I.2 Conservation d'une voie mécanotransductionnelle induisant la spécification du mésoderme chez les bilatériens

I.2.1 Evo-Devo

L'Evo-Devo, pour "Evolutionary Developmental Biology" est l'étude de l'évolution des organismes à travers le développement embryonnaire. A partir de la compréhension des relations d'ancestralité entre espèces (phylogénie), l'étude comparée du développement embryonnaire vise à inférer les mécanismes développementaux ancestraux.

Avec la découverte des boîtes homéotiques, l'Evo-Devo a pris une tournure particulière. Les gènes *hox*, d'abord découverts dans l'embryon de drosophile ont été identifiés chez un vertébré, le Xénope, en 1984 (Carrasco et al., 1984). Ces gènes structurant le développement antéro-postérieur sont extrêmement conservés chez les bilatériens (Ayala et al., 1998). Plus récemment, des gènes *hox* ont été identifiés chez le cnidaire *Nematostella vectensis*; permettant ainsi de dater leur apparition à plus de 600 millions d'années (Ryan et al., 2007).

Ainsi, des animaux lointains dans l'arbre phylogénétique et morphologiquement très disparates, partagent des sets de gènes extrêmement conservés, servant de "boîtes à outils" régulant le développement embryonnaire. Ces découvertes montrent que "L'Ureumétazoa" (ancêtre de bilatériens et des cnidaires) était un organisme complexe possédant ces "boîtes à outils" ou "sets de gènes" régulant le développement embryonnaire.

La grande conservation de ces sets de gènes et la diversité des espèces semblent à première vue contradictoires. Selon Sean Carroll (et Roy Britten, Eric Davidson et Allan Wilson avant lui), la grande diversité des espèces actuelles s'expliquent moins par des mutations des régions codantes du génome que par des variations dans les mécanismes contrôlant l'expression de ces sets de gènes par des mutations cis-régulatoires. Utilisés à des moments différents du développement et dans des parties différentes de l'embryon, ces sets conservés expliquent selon eux les changements évolutifs (Carroll, 2005). Cette vue reste néanmoins controversée car peu d'expériences ou d'observations permettent à ce jour de valider cette hypothèse

(Coyne, 2005). Une bonne synthèse peut être trouvée dans la revue [Stern and Orgogozo \(2008\)](#).

I.2.2 Conservation de l'induction mécanique de la β -caténine chez les bilatériens

I.2.2.1 Mésoderme

Lors de la gastrulation, des épithéliums sont compartimentalisés lors de réarrangements tissulaires ; ce sont les feuilletts germinaux embryonnaires. Ce processus peut s'effectuer par migration cellulaire, par délamination (divisions orientées), embolie (invagination), épibolie (englobement), ou prolifération. La forme ancestrale de gastrulation est débattue, mais l'hypothèse majoritaire reste l'invagination ([Jägersten, 1955](#); [Wolpert, 1992](#); [Hyman, 1923](#); [Herman, 1997](#); [Lane, 2005](#)). Les cellules des différents feuilletts sont non seulement séparés spatialement, mais elles expriment également des gènes différents ; elle se spécialisent. On parle de gènes mésodermaux, endodermaux ou ectodermaux.

L'**endoderme** donne naissance aux organes digestifs et aux voies respiratoires, le **mésoderme** donne les muscles, les cellules sanguines et la plupart des organes internes (excepté donc les organes digestifs et les voies respiratoires), et l'**ectoderme** donne naissance au système nerveux et à l'épiderme.

L'émergence du mésoderme est considérée comme une innovation évolutive majeure. En effet, elle a permis une grande complexification du règne animal ([Martindale, 2004](#)).

Les animaux sont divisés en deux groupes : les diploblastes (composés des cnidaires, des spongiaires, les cténaïres, et des placozoaires) qui possèdent deux feuilletts germinaux lors de leur développement, l'endoderme et l'ectoderme et les triploblastes (les bilatériens) qui possèdent un feuillet supplémentaire intermédiaire, le mésoderme.

Bien que la gastrulation était déjà présente chez l'Urbilatérien (l'ancêtre commun hypothétique de tous les bilatériens), les évènements cellulaires et moléculaires de la gastrulation sont peu conservés parmi les bilatériens. En particulier, les biologistes peinent à trouver des signaux biochimiques conservés induisant l'expression des gènes mésodermaux.

Nous avons proposé que les contraintes mécaniques de la gastrulation déclenchent l'expression des gènes mésodermaux par un processus de mécanotransduction ([Brunet et al., 2013](#)) (cf. Part.I.2.2.3).

I.2.2.2 La voie Wnt canonique (cWnt)

La voie Wnt canonique est une voie de signalisation impliquée dans le développement embryonnaire (Peifer et al., 1991; Noordermeer et al., 1994; Peifer, 1994), mais aussi dans le maintien de l'homéostasie des tissus adultes.

En l'absence de ligand Wnt, la β -cat présente dans le cytoplasme de la cellule est dégradée par le complexe GSK3/Axin/APC. En revanche, lorsqu'un qu'un ligand Wnt, en dehors de la cellule, est captée par la protéine trans-membranaire Frizzled (Fzl), celle-ci désassemble le complexe par le recrutement de l'Axin. La β cat n'est plus dégradée et sa concentration cytoplasmique augmente. Elle rentre dans le noyau et se lie à Tcf. Le complexe β cat/Tcf est un facteur de transcription stimulant la transcription des gènes mésodermaux.

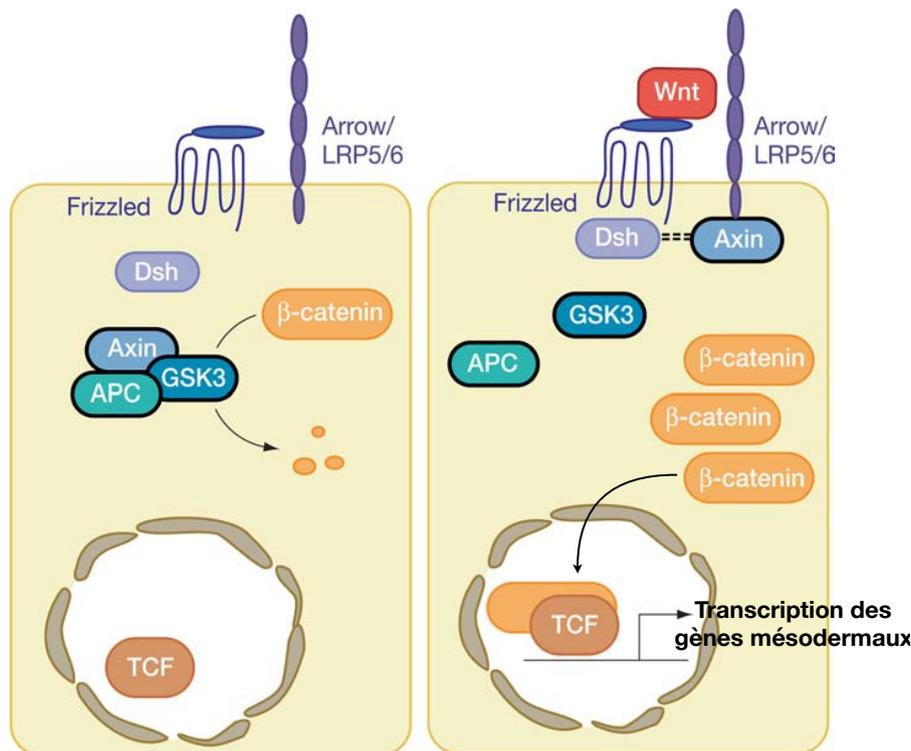


Fig. I.8 *La voie Wnt canonique (cWnt)*

Adapté de Logan and Nusse (2004)

La voie cWnt, fait partie des "boîtes à outils" du développement. Elle est extrêmement conservée et régule quantité de signalisations, dont le déclenchement des gènes mésodermaux.

I.2.2.3 Conservation de l'induction mécanique suite aux premiers mouvements morphogénétiques

Les travaux réalisés au laboratoire il y a quelques années ont montré que la mécanosensibilité de la βcat est impliquée dans la différenciation des cellules mésodermes suite aux premiers mouvements morphogénétiques (Brunet et al., 2013).

- **Poisson zèbre**

Au début du développement du poisson zèbre *Danio rerio*, le transfert nucléaire de la βcat se fait en deux étapes. La première étape est sous contrôle génétique maternel et régule l'expression des gènes dorsaux. Après le début de l'épibolie, le tout premier mouvement de l'embryogenèse, la translocation nucléaire de la βcat est plus importante et s'étend à l'ensemble de la zone marginale (cellules à la frontière avec le yolk particulièrement contraintes par les mouvements d'épibolie). Ces cellules sont les futures cellules mésodermes et expriment le gène *notail*, un gène mésodermal cible du facteur de transcription βcat .

La sur-expression d'un dominant négatif *Dkk* n'a pas d'influence ni sur l'initiation de la translocation nucléaire de la βcat , ni sur l'expression de *notail*, montrant que l'initiation de ces processus est indépendante de la voie Wnt.

En bloquant le mouvement d'épibolie grâce la blebbistatine, une drogue bloquant la myosine, la translocation nucléaire de la βcat est inhibée et l'expression de *notail* est perdue. Pour restituer les contraintes mécaniques et ainsi définitivement tester leur implication dans l'expression du gène *notail*, des particules ultra-magnétiques ont été injectées dans les cellules de la marge des embryons traités avec la blebbistatine. Grâce à un aimant, les mouvements d'épibolie sont restitués, entraînant la translocation nucléaire de la βcat et l'expression du gène *notail*.

Lors des mouvements d'épibolie, on peut observer une augmentation de 20% de la phosphorylation Y654 de la βcat (p- βcat) par immunofluorescence dans les cellules marginales. Cette augmentation est dépendante des mouvements morphogénétiques car elle disparaît sous blocage des mouvements (blebbistatine) et est restaurée grâce aux manipulations magnétiques.

La nucléarisation de la βcat et l'expression de *notail* sont dépendants de la phosphorylation de la βcat car ils sont inhibés avec l'utilisation de PP2, un inhibiteur des kinases Src family, responsables de la phosphorylation du site Y654 de la βcat .

Cette expérience démontre que les contraintes mécaniques de l'épibolie sont à

l'origine de la translocation nucléaire de la β cat par la phosphorylation de son site Y654, et de l'expression en aval du gène mésodermal *notail*.

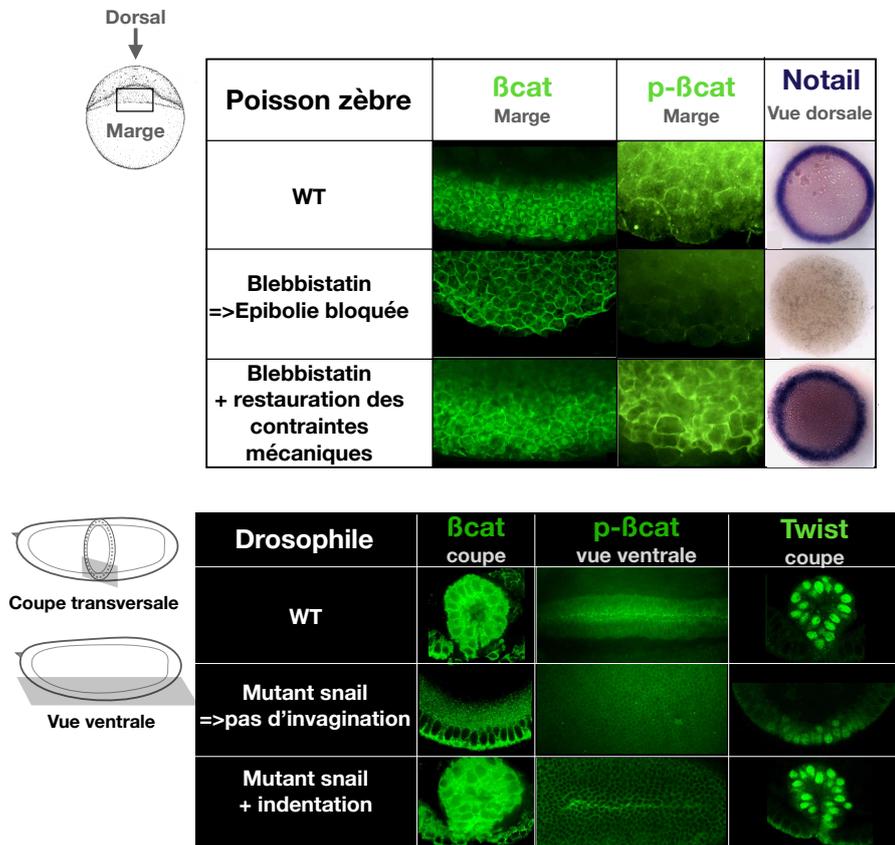


Fig. I.9 *Induction mécanique par les premiers mouvements morphogénétiques de la p - β cat et de l'expression des gènes mésodermaux chez deux bilatériens*

Adapté de [Brunet et al. \(2013\)](#)

• *Drosophila melanogaster*

Dans l'endoderme antérieur de l'embryon de drosophile, l'élongation de la bande germinale induit l'expression du gène *twist* grâce à la mécanosensibilité de la β cat ([Farge, 2003](#); [Desprat, 2008](#)). La mécanosensibilité de la β cat est aussi impliquée dans le maintien de l'expression du même gène (*twist*) dans le mésoderme tout juste après son invagination. En effet, l'expression de ce gène est initiée par Dorsal avant la gastrulation, mais dans les embryons mutants de *snail*, qui n'invaginent pas, l'expression de *twist* disparaît prématurément. Cette disparition est associée

à la disparition de la translocation nucléaire de la β cat et à la disparition de la phosphorylation Y654 de la β cat. En indentant faiblement un mutant de *snail*, il a été établi qu'on peut réactiver l'invagination complète dans 70% des cas du fait de la mécanosensibilité de la Myo-II (Pouille, 2009; Mitrossilis et al., 2017). De manière intéressante, le rétablissement de l'invagination restaure également l'expression du gène *twist*, la nucléarisation de la β cat et sa phosphorylation sur le site Y654.

Ces expériences ont montré le rôle fondamental des contraintes mécaniques liées à la gastrulation dans le maintien de *twist* chez la drosophile et dans l'initiation de l'expression de *notail* chez le poisson zèbre, deux gènes mésodermaux, via l'induction mécanique de la phosphorylation Y654 de la β cat.

Le dernier ancêtre commun du poisson zèbre et de la mouche drosophile n'est rien d'autre que l'Urbilatérien, c'est à dire le dernier ancêtre commun de tous les bilatériens. En effet, ces deux espèces ont divergé il y a plus de 570 millions d'années.

Notre hypothèse est donc la suivante : le mécanisme conservé parmi les bilatériens permettant la spécialisation des cellules mésodermales n'est pas une protéine issue d'un gène conservé mais un processus mécanotransductionnel. Lors de la gastrulation, les contraintes mécaniques développées sur les cellules permettent sa phosphorylation sur le site conservé Y654. Elle est alors relarguée dans le cytoplasme et transloque dans le noyau, où elle agit comme un facteur de transcription et active l'expression des gènes mésodermaux.

Il est intéressant de noter que cette voie de signalisation mécanosensible semble être conservée dans d'autres bilatériens. Dans beaucoup d'espèces, les gènes mésodermaux sont exprimés dans les zones de forte courbure tissulaire lors de la gastrulation. Chez le Xénope par exemple, la translocation nucléaire marginale de la β cat, permettant la spécialisation mésodermale, est indépendante de Wnt (Schohl and Fagotto, 2003) et lorsque les tissus sont soumis artificiellement à des contraintes mécaniques, le gène mésodermale *sox3* est exprimé (Kornikova et al., 2010).

● Mécanisme moléculaire

L'initiation de la phosphorylation de la β cat suite aux contraintes mécaniques a été testée plus en détail dans l'embryon de drosophile (Röper et al., 2018).

Des simulations ont d'abord été réalisées pour comprendre l'interaction du complexe E-cad/ β cat soumis à des forces mécaniques. Avec une force de 6pN, les simulations prédisent un étirement de 45% du complexe, ainsi que augmentation de 15% de

l'accessibilité au site conservé de phosphorylation Y654.

Ces prédictions ont été confirmées par des expériences *in vivo* dans l'embryon invaginant de drosophile, grâce à des techniques de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). L'accepteur est situé proche du site D665, le site majeur d'interaction de l'E-cad avec le site Y654 de la β cat, et le donneur est situé sur la β cat, proche du site Y654. Lorsque les deux fluorophores sont proches, l'énergie est transférée du donneur vers l'accepteur et la durée de vie du donneur est diminuée.

Dans des embryons déficients en *snail* et *twist* (grâce à des injections de RNAi; ces embryons n'invaginent pas), il n'y a pas d'augmentation de la durée de vie du donneur entre le stade 5 (pré-invagination) et le stade 6 (stade de l'invagination) contrairement aux observations effectuées dans les WT qui invaginent. Cela signifie qu'il y a une augmentation de la distance E-cad(D665)/ β cat(C-terminus) seulement lorsque les embryons invaginent .

Lorsqu'on restitue, dans ces mêmes embryons, les déformations dues à la gastrulation des futures cellules mésodermales en appliquant un champ magnétique, dans les embryons préalablement injectés avec des liposomes ultra-magnétiques, on retrouve l'augmentation de la durée de vie du donneur observée dans le WT qui gastrule. On peut donc en conclure que sous contraintes mécaniques, le complexe E-cad/ β cat est étiré autour de son site d'interaction D665(E-cad)/Y654(β cat).

De façon intéressante, les simulations "prédisent" un étirement du site D665/Y654 de 1nm correspondant à la valeur expérimentale observée en FRET.

Les injections de Src-42A-RNAi et les immunofluorescences contre la β cat non phosphorylée sur le site Y654 ont montré que l'accessibilité du site de phosphorylation augmente de 20% dans les tissus mésodermaux pendant la gastrulation et que le relargage de la β cat des jonctions, quant à lui, augmente de 16%.

On peut interpréter ces résultats de la manière suivante : soumise à une force de 6pN, le site Y654- β cat a environ 15% à 20% de chance de s'ouvrir. Lorsque ce site est ouvert, il est plus accessible à la phosphorylation par Src-42A, ce qui entraîne la diminution de l'interaction E-Cad/ β cat et le relargage d'environ 16% de β cat dans le cytoplasme.

Nous faisons donc face à un processus de mécanotransduction, impliquant la phosphorylation du site Y654 de la β cat des jonctions adhérentes, permettant son

relargage dans le cytoplasme puis dans le noyau des embryons de drosophile. Grâce à la fonction de co-facteur de transcription de la β cat, cette voie permet d'induire la spécialisation cellulaire.

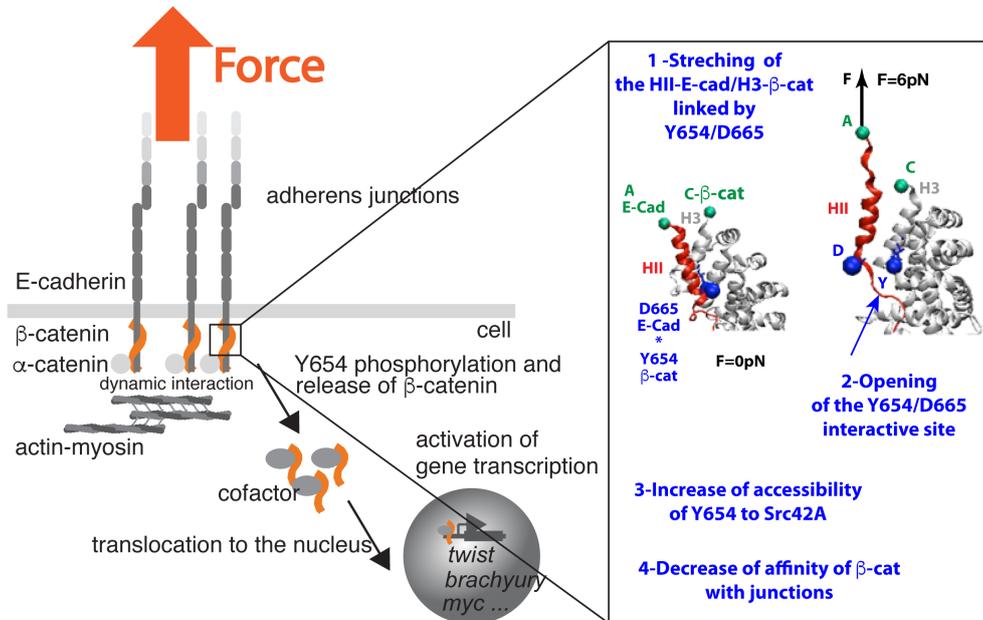


Fig. I.10 **La voie β cat mécanosensible**

Sous l'action de force mécanique, le site Y654 de la β cat s'ouvre à la phosphorylation par la kinase Sarc42A. Une fois phosphorylée, son interaction avec l'E-cadhérine est diminuée et la p- β cat est relarguée dans le cytoplasme. Elle transloque dans le noyau et déclenche l'expression des gènes mésodermaux.

A : accepteur(E-cad) C : donneur(β cat) D : D665(E-cad) Y : Y654(β cat)

Issu de (Röper et al., 2018)

I.2.2.4 Hypothèse de travail

Nous émettons ici l'hypothèse que cette voie mécanotransductionnelle est générique et conservée parmi les Métazoaires. En effet, le site Y654 de la β cat et le site D665 de l'E-cad ainsi que les Src-family kinases sont extrêmement conservés et la mécanosensibilité de la β cat a été observée dans plusieurs processus variés ; développementaux (dans l'induction des gènes mésodermaux chez deux espèces bilatériennes (Brunet et al., 2013)) ou tumoraux (dans le colon de souris (Fernández-

Sánchez et al., 2015)).

L'objectif de cette thèse est de tester l'ancienneté de cette voie mécanosensible et son rôle dans l'émergence du mésoderme.

Pour cela, nous devons tester la mécanosensibilité de la β caténine dans un descendant de l'ancêtre commun des bilatériens et des non bilatériens. Notre choix s'est porté sur le cnidaire *Nematostella vectensis*.

Notons cependant que l'existence d'un caractère partagé entre différentes espèces peut s'expliquer par des phénomènes de convergence évolutive. En effet, soumises à des contraintes environnementales équivalentes, des espèces peuvent développer des caractères similaires sans que leur ancêtre commun ait possédé ces caractères.

Dans le cadre de ce travail, l'identification de la mécanosensibilité de la β cat chez le cnidaire *Nematostella vectensis* pourrait témoigner d'une convergence évolutive. En effet, bien que les acteurs de cette voie (β cat, E-cad et les Scr-family kinase) soient conservés parmi les métazoaires et plus spécifiquement les sites impliqués dans le processus de mécanotransduction (Y654- β cat et D665-E-cad), il est envisageable que cette voie n'était pas fonctionnelle dans l'ancêtre commun des bilatériens et des cnidaires.

1.3 Nematostella vectensis : un organisme modèle pour étudier l'évolution du mésoderme

1.3.1 Présentation générale de *Nematostella vectensis*

Nematostella vectensis est une anémone de mer que l'on trouve à l'état sauvage dans les estuaires anglais et nord-américains. Son utilisation comme organisme modèle est très récente et le premier papier décrivant sa culture en laboratoire date de 1992 (Hand and Uhlinger, 1992). Sa petite taille, la facilité à stimuler sa reproduction (en jouant sur des paramètres physiques comme la température et la luminosité) et le grand nombre d'embryons par ponte sont autant d'atouts ayant facilité sa popularité en laboratoire.

Plus que tout, elle répond aux besoins des biologistes évolutionnistes qui travaillent sur l'origine des bilatériens. En effet, il est désormais admis que les cni-

daïres sont la branche sœur des bilatériens (Technau, 2001, 2003; Martindale, 2004; Philippe et al., 2009; Hejnol et al., 2009) (cf Fig.I.12). Ces deux branches auraient divergé il y a plus de 600 millions d'années de "l'Ureumétazoa", ou CBA (Cnidarian-Bilaterian Ancestor).

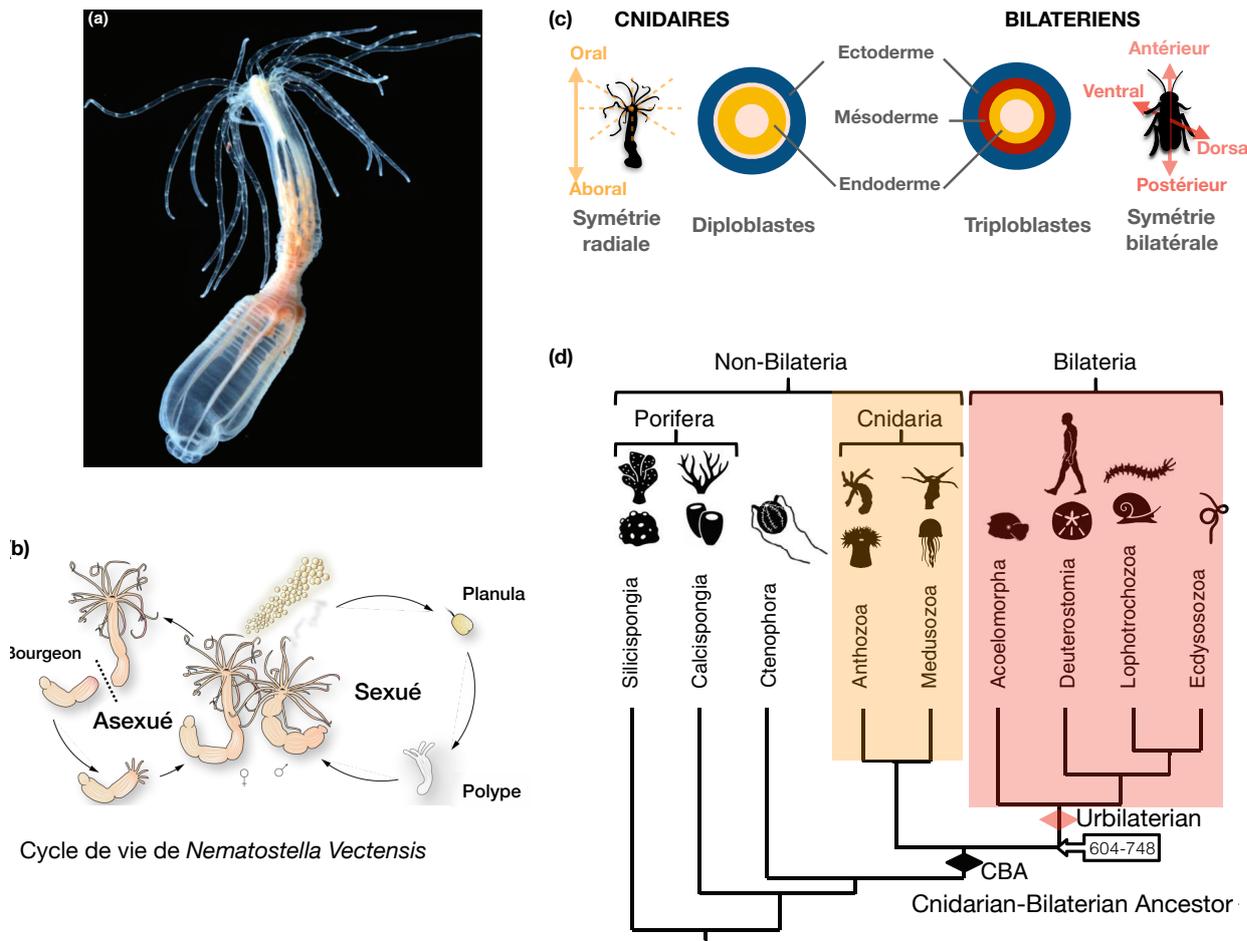


Fig. I.11 *Nematostella vectensis*

(a) Image prise par Eric Röttinger d'un individu adulte (b) *Nematostella* peut se reproduire de façon asexuée en bourgeonnant, ou de façon sexuée, en relâchant des gamètes mâles et femelles dans l'eau. (c) Les cnidaires sont diploblastes et possèdent une symétrie radiale tandis que les bilatériens sont triploblastes et possèdent une symétrie bilatérale. (d) *Nematostella* est un cnidaire, la branche sœur des bilatériens. Ces deux branches ont divergé il y a plus de 600 millions d'années.

Images issues ou adaptées de (Layden et al., 2016; Kelava et al., 2015; Ryan et al., 2006; DuBuc et al., 2018)

Comme leur nom l'indique, les bilatériens ont une symétrie bilatérale, alors

que les cnidaires possèdent une symétrie radiale. Cependant, ce n'est pas la seule différence marquante de ces deux branches. Les cnidaires sont diploblastes, c'est à dire qu'ils possèdent deux feuillets germinaux embryonnaires, l'endoderme et l'ectoderme, alors que les bilatériens sont triploblastes, et possèdent un troisième feuillet intermédiaire : le mésoderme (cf. Part.I.2.2.1).

Les cnidaires, qui sont divisés en cinq classes, dont font parti les méduses, les coraux, les anémones, et les hydres, sont donc utilisés pour étudier le développement des différents feuillets embryonnaires, l'apparition d'une symétrie bilatérale, le système nerveux, et même la régénération (faculté de régénérer un organisme entier à partir d'une fraction de l'animal adulte).

Comme les autres cnidaires, *Nematostella* possède une matrice intermédiaire contractile située entre l'ectoderme et l'endoderme, la mésogée. Cependant, elle se démarque des autres cnidaires par plusieurs aspects. En effet, bien que cette anémone possède une symétrie majoritairement radiale, des études récentes ont montré qu'on pouvait déceler le début d'une symétrie bilatérale dans certaines phases de son cycle de vie (Finnerty et al., 2004; Leclère and Rentzsch, 2014).

Aussi, bien qu'elle soit diploblaste, de nombreuses études ont identifié plusieurs gènes mésodermaux comme *snail*, *wnt*, *frizzled*, *brachyury* (homologue de *twist* et de *notail*) s'exprimant au pôle oral lors de sa gastrulation.

De plus, les tissus gastriques, dérivant de l'endoderme, possèdent des cellules avec des fonctions digestives mais aussi contractiles. (Jahnel et al., 2014; Layden et al., 2016). Ces analyses génétiques et fonctionnelles indiquent que les tissus gastriques de *Nematostella* proviennent d'un tissu germinal endomésodermal qui, au tout début de la gastrulation a exhibé des caractéristiques mésodermales. Nous parlerons donc d'endomésoderme.

Cette particularité en fait un organisme privilégié pour étudier l'évolution des feuillets germinaux embryonnaires et spécialement le mésoderme (Technau, 2001, 2003; Martindale, 2004).

1.3.2 Développement de l'embryon précoce

Après avoir été exposées à neuf heures de lumière et de chaleur, les anémones femelles sont capables de pondre plusieurs centaines de cellules-œufs. A ce stade, l'œuf est déjà polarisé : le pro-nucleus est localisé à un pôle, qui deviendra le pôle oral.

Plusieurs ARN maternels se trouvent aussi répartis préférentiellement à ce pôle, comme *Strabismus*, *Dishevelled*, *Wnt3*, ou *Wnt7b* (Lee et al., 2007; Kumburegama et al., 2011). Les mâles relâchent le sperme dans les cristallisoirs et les cellules-œufs sont ainsi fécondées.

En environ deux dizaines d'heures après la fécondation (en fonction de la température), l'embryon est devenu une sphère de cellules grâce aux clivages cellulaires successifs. La cavité intérieure, remplie de nutriments, s'appelle le blastocèle. C'est le stade blastula.

La gastrulation de *Nematostella vectensis* s'effectue par invagination des tissus oraux dans le blastocèle. Le blastocèle se réduit et la nouvelle pseudo-cavité est appelée l'archentéron; il donne sur l'extérieur grâce au blastopore. Le tissu intérieur correspond à l'endomésoderme, et le tissu extérieur à l'ectoderme. La limite de ces feuilletts n'est pas claire et donne lieu à des débats.

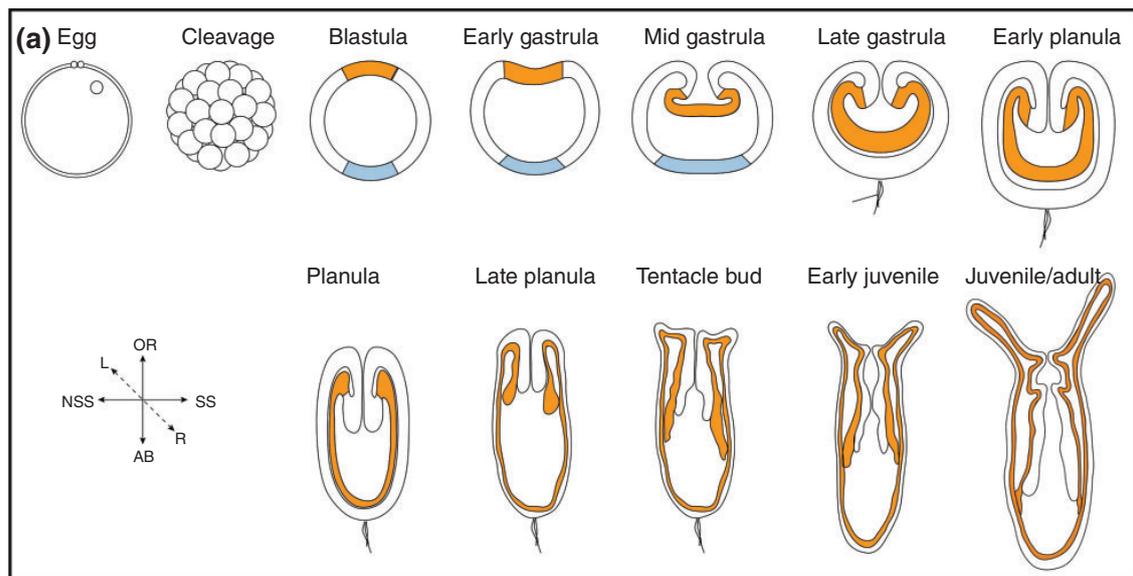


Fig. I.12 **Développement de *Nematostella vectensis***
Issu de Ormestad et al. (2011) et Layden et al. (2016)

Lorsque la gastrulation est terminée, le blastocèle a disparu au profit de l'archentéron dont l'endomésoderme tapisse le fond. L'embryon s'allonge et un flagèle pousse au pôle aboral. C'est l'étape de la planula nageante. D'abord quatre, puis bientôt seize tentacules poussent autour de l'ouverture orale. Le polype juvénile,

qui apparaît au bout de quelques semaines est une miniature de l'organisme adulte.

I.3.2.1 Gastrulation, aspects mécaniques

L'étape qui nous intéresse particulièrement ici est l'étape de la gastrulation car c'est le premier mouvement morphogénétique majeur de l'embryon. Cette étape cruciale permet la ségrégation des feuilletts germinaux.

Dans les simulations réalisées, en partant d'un système à l'équilibre type blastula, il suffit d'ajuster trois paramètres afin de reproduire de manière satisfaisante la gastrulation complète de *Nematostella* (Tamulonis et al., 2011). Ces trois paramètres, nécessaires à la gastrulation, mais aussi suffisants lorsqu'ils sont bien choisis, sont : **l'adhésion basale** des cellules de l'endoderme entre elles, **la constriction apicale** de ces mêmes cellules, et **la force exercées par les filopodes** qui permettent de sceller l'endoderme invaginant à l'ectoderme.

Tout d'abord, une observation attentive des cellules de la plaque pré-endomésodermale nous indique que les cellules perdent leur adhésion basale, que les auteurs appellent "dé-épithélialisation". Il en résulte une organisation alternée de cellules en "forme de bouteille" ("bottle-shape cells"), et de cellules plus arrondies, ramassées ("squat cells"). Cette configuration n'est possible en simulation que lorsque l'adhésion basale des cellules diminue mais l'adhésion apicale reste forte.

Ce travail montre aussi que la faible adhésion basale, ajoutée aux contraintes exercées par les tissus ectodermaux environnant, suffisent pour déclencher la formation des bottle-shape cells, sans même avoir recourt à la constriction apicale.

Pour que les tissus puissent flamber à l'intérieur du blastocèle, il a été montré que le gène *strabismus*, connu pour appartenir à la voie polarisation planaire (PCP pour Planar Cell Polarity pathway) (Darken, 2002), est requis (Kumburegama et al., 2011). Strabismus agirait grâce au recrutement de l'actine dans les cellules du pôle oral et permettrait leur constriction apicale. En l'absence de technique développée pour marquer la myosine dans cette espèce, nous ne pouvons savoir si elle est impliquée. Dans un article publié récemment (Pukhlyakova et al., 2018), ML-7, une drogue bloquant la myosine ne semble pas avoir d'effet sur le début de l'invagination. Les auteurs supposent donc que la constriction apicale serait indépendante de la myosine-II. Cependant, les embryons traités avec ML-7 ne gastrulent pas et restent

bloqués avec une faible invagination résiduelle, démontrant tout de même l'importance de la myosine-II dans le processus complet de gastrulation. Cependant, il est tout de même possible que ML-7 bloque effectivement bien la constriction apicale mais pas la perte d'adhésion basale qui, nous l'avons vu plus haut, est suffisante pour engendrer la formation des bottle-shape cells et un début d'invagination si les cellules sont soumises aux forces des tissus environnant.

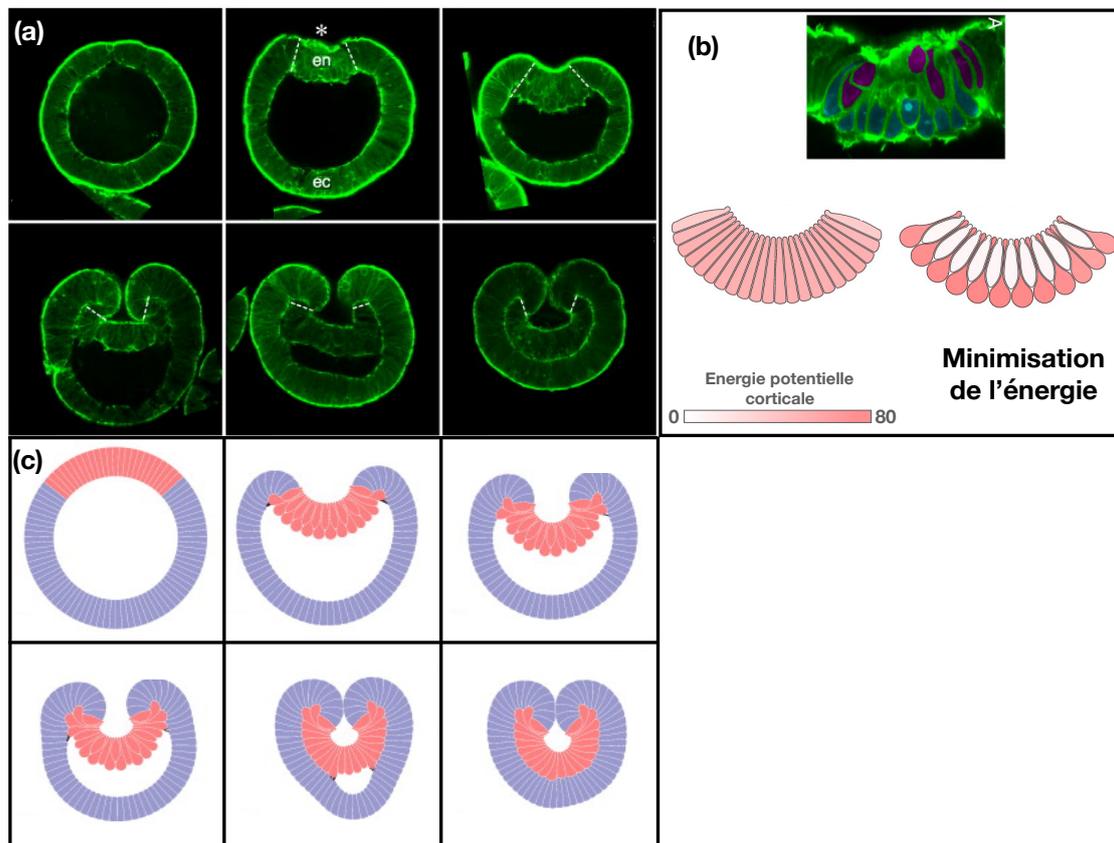


Fig. I.13 **Gastrulation de *Nematostella vectensis***

(a) Images confocales d'embryons, du stade blastula jusqu'à la fin de la gastrula. ec : ectoderme ; ed : endomesoderme

(b) Les cellules de la plaque pré-endomesodermale perdent leur adhérence basale. Il en résulte une configuration alternée des cellules, entre "bottle shape" et arrondissement.

(c) Simulation de gastrulation en grâce à l'ajustement de trois paramètres, chacun nécessaires, mais suffisants ensemble : la force des filopodes qui permettent de sceller l'endoderme invaginant contre l'ectoderme, l'adhésion cellule-cellule, qui diminue basalement dans les cellules endodermales, et la constriction apicale, permettant l'initiation de l'invagination.

Simulation et images de [Tamulonis et al. \(2011\)](#)

Les filopodes, protusions cellulaires, permettent d'exercer des forces. Lorsque les tissus invaginent, les filopodes, sur la partie basale des cellules endomésodermes, s'étendent et se rétractent de manière aléatoire. Si lors de la phase d'extension, le filopode rencontre une cellule ectodermale, il s'y accroche, et se rétracte. Cela permet de tirer les tissus endomésodermaux invaginant de plus belle dans le blastocèle et de sceller le contact entre les deux tissus.

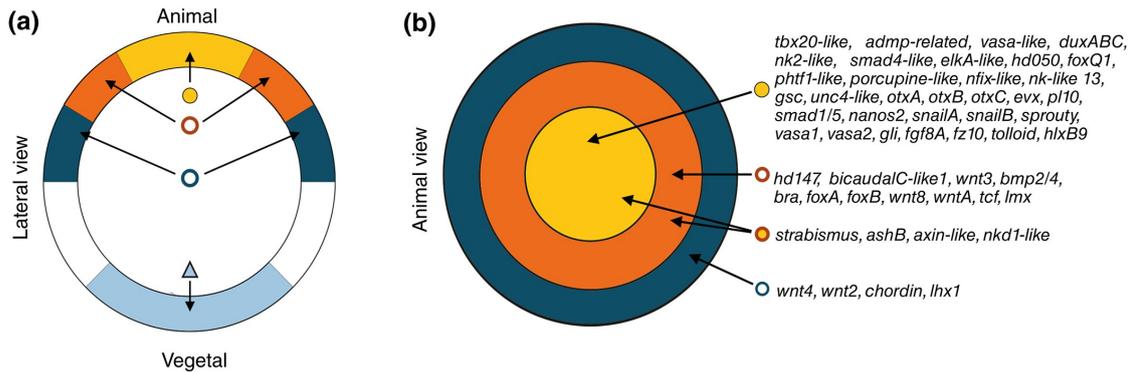
Cependant, une simulation permet de reproduire une situation observée, en indiquant surtout les paramètres nécessaires, mais elle peut passer à côté de paramètres pouvant jouer un rôle. Même si une simulation ressemble à la réalité, elle ne permet pas de valider définitivement le modèle. En effet, rien ne garantit que les trois paramètres que nous venons de décrire, pourtant suffisants dans la simulation, soient les seuls à l'œuvre. Par exemple, [Pukhlyakova et al. \(2018\)](#) proposent que la constriction basale des cellules des lèvres du blastopore joue un rôle important. Cette hypothèse est motivée par le fait que, sous l'action de ML-7, cette constriction disparaît, et la gastrulation reste bloquée au premier stade. Cependant, il n'est pas certain que la constriction basale des lèvres du blastopore soit un phénomène actif, et non une réponse passive des cellules soumises aux contraintes des tissus invaginant. En d'autres termes, nous ne savons pas si la constriction basale des cellules des lèvres du blastopore est la cause de l'invagination (où l'une des causes), ou sa conséquence. Nous pouvons simplement observer qu'il n'est pas nécessaire d'encoder cette constriction pour l'observer dans la simulation, en réponse à l'invagination des cellules de la plaque endomésodermes.

I.3.2.2 Aspects génétiques

La génétique de l'embryon de *Nematostella vectensis* est étonnamment complexe ([Kusserow et al., 2005](#); [Putnam et al., 2007](#)). Le réseau de régulation génétique (GRN) est abondamment étudié et il commence à se dégager une organisation spatiale et temporelle (cf. [Fig.I.14](#)) ([Röttinger et al., 2012](#); [Abdol et al., 2017](#)).

Spatialement, les gènes sont exprimés principalement selon cinq grands domaines dont quatre au pôle oral : le domaine central, en jaune sur la [Fig.I.14](#), l'anneau central, en orange, l'association de ces deux domaines, et l'anneau externe en bleu foncé. Ces domaines spatiaux ont été identifiés grâce à des hybridations *in situ*. Ces domaines, qui sont appropriés pour la plupart des gènes, sont remis en cause petit à petit. Certaines publications distinguent trois anneaux concentriques autour du

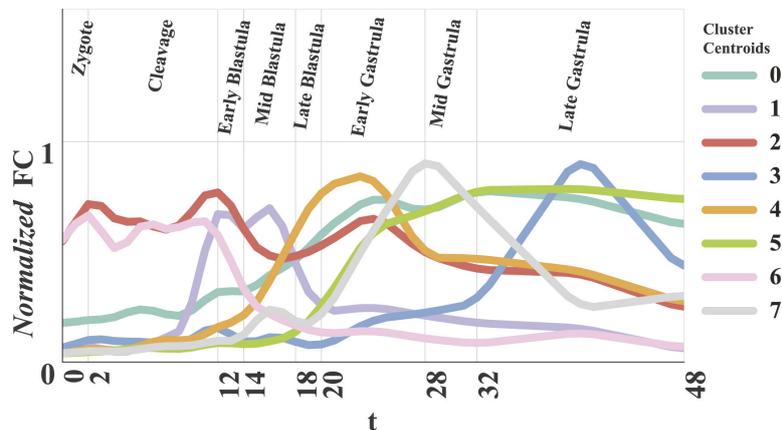
pôle oral. Un autre exemple : *brachyury* change de domaine d'expression au cours du développement. Il est d'abord exprimé dans le domaine central, puis, au début de la gastrulation, son expression s'étend spatialement et diminue au centre pour ne représenter plus que l'anneau central (voir Fig.III.16).



(1) **Domaines de co-expression génique de l'embryon au stade blastula**

Quatre domaines d'expression ont été identifiés dans l'hémisphère animal : le domaine central (jaune), l'anneau central (jaune), le domaine central **et** l'anneau central (jaune et orange), et l'anneau externe (bleu foncé).

Issu de [Röttinger et al. \(2012\)](#)



(2) **Huit groupes de gènes identifiés lors du développement précoce**

Issu de [Abdol et al. \(2017\)](#)

Fig. I.14 **Expression génique, spatiale et temporelle, dans l'embryon précoce**

Temporellement, des groupes de gènes ont été identifiés grâce à des qPCR. Sur la Fig.I.14, on peut voir ces groupes. Deux gènes d'un même groupe ont un profil d'expression similaire bien qu'ils peuvent avoir un décalage temporel allant jusqu'à quatre heures et des profils d'expression variants. Les gènes du groupe deux et six sont exprimés maternellement.

La voie de signalisation cWnt est présente dans l'embryon de *Nematostella* (Wikramanayake et al., 2003). La β cat est stabilisée de manière asymétrique le long de l'axe oral/aboral. Elle transloque dans le noyau des cellules du pôle oral et reste nucléaire dans les cellules invaginant dans le blastocèle. Lorsque la kinase GSK3, dégradant la β cat dans la voie cWNT, est inhibée, les caractéristiques ectodermes (pharynx, tentacules) sont perdues démontrant l'implication de la voie cWnt.

Un dizaine de gènes wnt ont été identifiés (Kusserow et al., 2005), ils peuvent appartenir à tous les groupes de gènes : *wnt3* et *wnt7b* sont maternels, *wnt1*, *wnt2*, *wnt8* et *wnt8b* appartiennent au groupe-1, etc. jusqu'à *wnt4* qui appartient au groupe-7. Ils ne sont également pas exprimés préférentiellement dans un domaine spatial : *wnt3*, *wnt8* et *wntA* s'expriment dans l'anneau central, *wnt2* et *wnt4* dans l'anneau externe.

I.3.2.3 Mécanosensibilité de l'expression de Brachyury dans l'embryon précoce de *Nematostella*

Récemment, Pukhlyakova et collègues ont proposé que le gène *brachyury* (*bra*) est mécanosensible lors de la gastrulation de l'embryon de *Nematostella* (Pukhlyakova et al., 2018).

bra est l'homologue du gène *notail* dont l'expression est déclenchée suite aux mouvements morphogénétiques de l'épibolie de l'embryon de poisson zèbre (Fig.I.9, Brunet et al. (2013)). Dans l'embryon de *Nematostella*, *bra* s'exprime dès le stade blastula au pôle oral de l'embryon. Son expression est nettement localisée dans l'anneau central et plus diffuse dans le domaine central. Lors de la gastrulation, il reste exprimé au niveau de l'anneau central (Abdol et al., 2017).

L'utilisation d'une drogue bloquant la myosine, la ML-7, permet d'inhiber en partie la gastrulation, bien que les cellules endomésodermes adoptent tout de même la forme "bouteille" déjà évoquée Part.I.3.2.1 et initient le mouvement d'invagination. La drogue ML-7, utilisée pendant douze heures consécutives, entre 16

et 28hpf, induit également la disparition des marquages d'hybridation *in situ* (ISH) de *bra*. Lorsque les embryons, sous drogue, sont dans le même temps soumis à des compressions mécaniques entre lamelle et agar (entre 16 et 28 heures de développement), alors l'expression de *bra* n'est pas inhibée, suggérant que les contraintes mécaniques sont nécessaires à son expression.

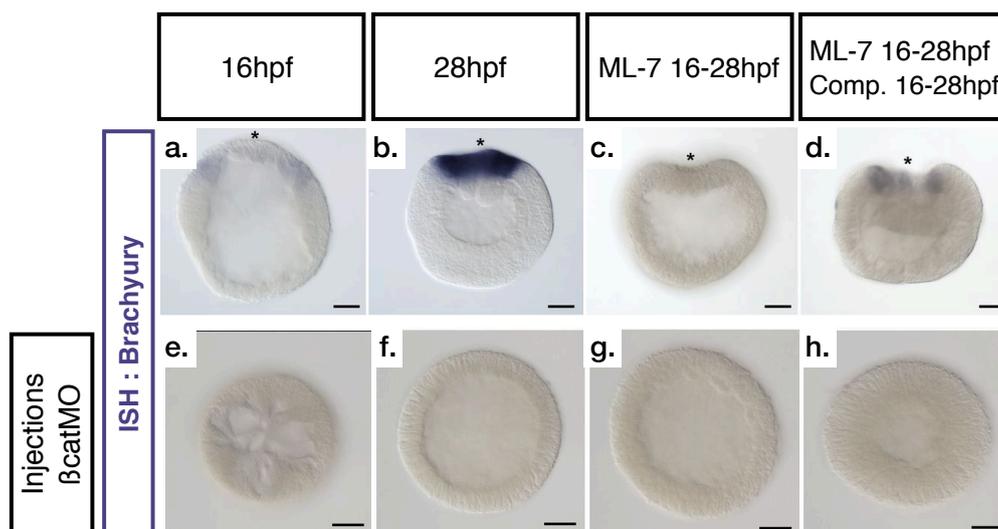


Fig. I.15 **La gastrulation est nécessaire au maintien de l'expression de brachyury chez *Nematostella***

(a,b,c,d) Expression de *bra* (a) au stade blastula, (b) au stade gastrula, (c) au stade gastrula après 12 heures de drogue ML-7, (d) au stade gastrula après 12 heures de drogue ML-7 et de compressions mécaniques entre lame et lamelle.

(e,f,g,h) Expression de *bra* dans les mêmes conditions que (a,b,c,d) respectivement après injections de morpholinos de β cat en début de développement.

Barres d'échelle : 50 μ m

Image adaptée de [Pukhlyakova et al. \(2018\)](#)

L'expression mécanosensible de *bra* dépend de la β cat. En effet, lorsque les embryons sont injectés avec un morpholino de la β cat, l'expression de *bra* est inhibée. En outre, cela est le cas sous compressions mécaniques ou non. Ce résultat confirme que l'expression de *bra* nécessite la présence de la β cat ([Röttinger et al., 2012](#)). Cependant, cela ne démontre pas que la β cat est directement impliquée dans le processus de mécanotransduction, car de nombreuses voies nécessitant la β cat peuvent manquer entre 16 et 28hpf.

Ainsi, *bra* étant exprimé au stade blastula, c'est à dire avant tout mouvement morphogénétique, ces résultats semblent indiquer que son expression est maintenue

grâce aux mouvements morphogénétiques de la gastrulation de l'embryon de *Nematostella* -comme cela a été décrit pour *twist* lors de l'invagination du mésoderme de l'embryon de drosophile (Brunet et al., 2013). De plus, ce phénomène est dépendant de la β cat.

Ces résultats sont encourageants quant à notre hypothèse de travail. Il faudra identifier précisément le rôle de la β cat dans l'expression mécanosensible de *bra* et le mécanisme moléculaire sous-jacent.

1.3.3 Difficultés liées à *Nematostella*, nécessité de l'outil informatique

Bien que *Nematostella vectensis* possède des qualités indéniables en tant qu'organisme modèle, elle nous confronte à une difficulté majeure. En effet, le développement de *Nematostella* est très peu stéréotypé.

Cela peut s'observer dès le premier clivage cellulaire. Certains embryons se divisent en deux cellules, mais d'autres forment directement un embryon de quatre cellules. De manière similaire, le temps nécessaire pour atteindre le stade de gastrulation varie énormément pour des embryons provenant d'une même ponte et ayant été fécondés en même temps. A 22 heures post-fertilisation (hpf) à 20°C, certains embryons commencent tout juste la constriction apicale quand d'autres sont déjà au stade mid-gastrula (stade où le blastocèle et l'archentéron font la même taille).

Comme nous l'avons vu, nous travaillons ici sur des phénomènes très sensibles. Dans le zebrafish, il n'a été observé qu'une augmentation du signal p-Y654- β cat de 15 à 20% seulement lors des premiers mouvements morphogénétiques (Brunet et al., 2013). Néanmoins, cette faible augmentation est justifiable : pour préserver l'intégrité des tissus, il est nécessaire qu'une faible proportion seulement de la β cat jonctionnelle soit effectivement relarguée dans le cytoplasme. En outre, ces taux semblent suffisants pour déclencher ou maintenir l'expression génique en aval. Nous travaillons donc sur un phénomène très délicat à détecter.

De surcroît, ce phénomène est potentiellement transitoire et nous n'avons pas accès à des techniques de "live imaging".

Toute la difficulté et donc l'enjeu de cette thèse a donc été de mettre en évidence un phénomène difficile à détecter et potentiellement transitoire, dans un organisme peu stéréotypé.

Pour aborder cet enjeu, nous avons mis en place un code Python permettant d'analyser précisément les images à grande échelle, ce qui est indispensable face à un organisme dont le développement est peu stéréotypé. Ce code est le résultat d'un travail collectif. Il a été initié par Benjamin Gallois (actuellement doctorant au LPJ, Paris) lors de son stage de M2 au laboratoire sous mon encadrement, puis le développement a été poursuivi en collaboration avec Florian Sarron (IAP, Paris). Grâce à ses fonctions de squelettisation et de segmentation, ce code nous a permis de faire des analyses tissulaires et cellulaires précises, et de révéler des processus biologiques essentiels.

I.4 Hypothèse de la thèse : émergence mécaniquement induite du mésoderme

L'embryogenèse est un processus complexe alliant régulations génétiques et mécaniques. De plus en plus de voies mécanotransductionnelles sont identifiées mais, pour l'instant, une seule est potentiellement impliquée dans un processus évolutif (Brunet et al., 2013).

En effet, chez certains bilatériens ayant directement divergé de l'ancêtre commun de tous les bilatériens, une voie mécanosensible, la β cat, est conservée et permet l'induction ou le maintien de l'expression de gènes mésodermaux. Les contraintes de la gastrulation induisent la phosphorylation de la β cat sur le site Y654, et son relargage dans le cytoplasme. Elle transloque dans le noyau où, grâce à Tcf, elle stimule l'expression génique mésodermale.

Nous avons donc fait l'hypothèse que cette voie est conservée chez les bilatériens car déjà présente chez l'Urbilatérien. Afin de tester son origine et sa potentielle implication dans l'émergence même du mésoderme, nous voulons désormais tester son existence dans l'ancêtre commun des bilatériens et des cnidaires.

Pour tester cette hypothèse, nous travaillons avec le cnidaire *Nematostella vectensis*, qui possède un endomésoderme, un tissu représentant un mésoderme primitif.

Nous voulons donc tester l'activation mécanique de la β cat et des gènes endomésodermaux suite aux contraintes de la gastrulation, mouvement morphogénétique qui coïncide avec la différenciation de l'endomésoderme.

Pour bloquer les mouvements morphogénétiques, nous avons choisi d'injecter

le morpholino de *Strabismus*, nécessaire au recrutement de l'actine permettant la gastrulation. Pour restituer les contraintes dans les embryons inhibés, nous avons appliqué des compressions globales uniaxiales. La p- β cat est observée par immunofluorescence et les images sont analysées grâce au programme informatique développé spécialement à cet effet.

Les gènes endomésodermaux en aval sont observés par qPCR et ISH.

Chapitre II

Materiels et méthodes

Contents

II.1 Méthodes expérimentales biologiques	40
II.1.1 Culture et ponte de <i>Nematostella Vectensis</i>	40
II.1.2 Micro-injection des embryons	41
II.1.3 Rétablissement des forces mécaniques	44
II.1.3.1 Compression globale uniaxiale	44
II.1.3.2 Compressions orientées	45
II.1.4 Output : gènes et protéines	46
II.1.4.1 <i>In situ</i> hybridization et RT-qPCR pour l'observation des ARN	46
II.1.4.2 Immunofluorescence indirecte pour l'observation des protéines	48
II.2 Analyse d'image, Développements méthodologiques	50
II.2.1 Automatisation de l'analyse à l'échelle tissulaire	51
II.2.2 Squelettisation avec DisPerSE	55
II.2.3 Segmentation : Analyses à l'échelle cellulaire	58
II.2.4 Exemples d'utilisation	60
II.2.5 Listes des algorithmes utilisés dans la thèse	64

II.1 Méthodes expérimentales biologiques

Je décris ici les méthodes expérimentales que j'ai été amenée à utiliser durant ma thèse. Des protocoles plus détaillés peuvent être trouvés dans les papiers cités. Il s'agira ici de faire comprendre les techniques dans leur globalité, leur intérêt, les raisons pour lesquelles nous les avons choisies, ainsi que leurs limites.

II.1.1 Culture et ponte de *Nematostella Vectensis*

Nematostella vectensis est étudiée en tant qu'organisme modèle depuis relativement peu de temps. Sa culture est décrite à partir de 1992 par [Hand and Uhlinger \(1992\)](#), puis les techniques de ponte ont été améliorées successivement ([Fritzenwanker and Technau, 2002](#); [Genikhovich and Technau, 2009a](#)). Les anémones sont cultivées à 18°C dans le noir. Elles sont une trentaine par cristalliseur d'eau salée à 10g/l ($\frac{1}{3}$ SW). Les mâles et les femelles sont isolés dans des cristallisoirs différents afin de contrôler l'heure de fécondation. Les anémones sont nourries avec des artémies tous les jours.

Deux jours avant la ponte, les anémones sont nourries avec des huîtres. La veille de la ponte, plusieurs cristallisoirs mâles et femelles sont placés sur une plaque lumineuse chauffante. Au bout de neuf heures, l'eau de chaque cristallisoir est soigneusement remplacée par de l'eau à 18°C, plus fraîche. Deux heures plus tard, les femelles commencent à expulser plusieurs centaines de zygotes (non fécondés) contenus dans un gel appelé la gangue. Les zygotes sont isolés dans un cristallisoir contenant de l'eau filtrée à 0,22 μm ($\frac{1}{3}$ FSW). Du sperme récupéré dans les cristallisoirs mâles est alors ajouté aux embryons afin de les féconder. La fécondation dure une demi-heure, ce qui permet de connaître l'heure t_0 du début du développement à 30min près. Les embryons sont dégangués dans une solution de 2% de L-cystéine dans $\frac{1}{3}$ FSW pendant 10min.

La principale difficulté avec cet organisme modèle est de réussir à obtenir une "bonne" ponte, c'est à dire une ponte synchronisée entre les femelles et abondante. Les anémones sont divisées en trois lots pour pouvoir stimuler chaque lot toutes les trois semaines, et ainsi pouvoir réaliser une ponte par semaine. Cependant, même en respectant ce délai, il arrive que les anémones d'un même lot ne pondent pas, ou trop peu pour garantir une bonne expérience, sans que nous ayons pu en déterminer les

causes. Un ponte infructueuse est synonyme d'une semaine improductive car il faut compter quatre jours pour une expérimentation (cinq en incluant les marquages). En effet, il faut nourrir les anémones avec les huîtres deux jours avant le déclenchement de la ponte, la stimulation sur la plaque lumineuse, la ponte et les injections durent une journée supplémentaire, et on fixe les embryons à environ 24hpf (hours post-fertilization).

II.1.2 Micro-injection des embryons

La micro-injection consiste à introduire de l'ADN, de l'ARN, des protéines, etc.. à l'intérieur même des cellules des embryons. Cette technique permet de déterminer l'expression spatio-temporelle de gènes, mais aussi de comprendre leur fonction. Par exemple, pour attester de la présence de protéines et suivre leur localisation, on injectera des ARN messagers comportant une séquence qui sera traduite en protéine fluorescente (Wikramanayake et al., 2003; Lee et al., 2007). On peut également injecter des morpholinos (MO) (Kumburegama et al., 2011; Leclère et al., 2016) ou des ARN interférants (RNAi) (Layden et al., 2013) qui permettent de bloquer la traduction de protéines afin d'en comprendre le rôle lors du développement embryonnaire.

Dans le cadre de cette thèse, comme il s'agit de comprendre le rôle des forces mécaniques subies par les cellules lors de la gastrulation dans la régulation des voies biochimiques qui contrôlent le développement embryonnaire, nous avons choisi d'injecter le morpholino de Strabismus (StbmMO). Strabismus (Stbm) est un composant maternel de la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity pathway) (Simons and Mlodzik, 2008) ayant été décrit comme nécessaire au processus de gastrulation chez *Nematostella* (Kumburegama et al., 2011). L'ARN est déjà présent dans le zygote où il est localisé préférentiellement au pôle oral. Au stade blastula, il est concentré dans les cellules du pôle oral, dont il permet la constriction apicale en recrutant l'actine. Les tissus flambent vers l'intérieur et l'invagination commence, initiant alors le processus de gastrulation.

D'après (Kumburegama et al., 2011), Stbm n'est *a priori* pas couplé avec la voie canonique Wnt/ β -cat. En effet, les embryons Stbm⁽⁻⁾, qui ne gastrulent pas, expriment toujours les marqueurs spécifiques de l'endoderme tels que Frizzled10 (Fz10), Snail (snl) ou la nucléarisation de la β -cat dans les cellules du pôle oral même si nous pouvons déjà constater qu'il reste probablement une légère constric-

tion apicale dans le domaine d'expression de *fz10* dans le domaine d'expression de *fz10* sous injection de *StbmMO* (Fig.4J [Kumburegama et al. \(2011\)](#)), et que *snail* n'est pas cible de la β cat ([Röttinger et al., 2012](#)). Nous verrons que, dans le cadre de cette thèse, nous serons amené à revoir quelques-uns de ces résultats.

Le morpholino antisens de *Strabismus* est une séquence d'ARN de 25 bases simples, complémentaire à la séquence d'ARN de *strabismus*. Ce morpholino, injecté dans la cellule-œuf se couple à l'ARN maternel et en bloque la traduction en protéine. Comme ce gène n'est pas requis dans d'autres voies avant la gastrulation, nous avons pu injecter le morpholino au stade mono-cellulaire. C'est à ce stade que l'embryon est le plus manipulable et les morpholinos se retrouvent alors donc dans toutes les cellules sans, *a priori*, en impacter le développement pré-gastrulation.

Bien que la concentration d'injection publiée soit $750\mu\text{M}$ ([Kumburegama et al., 2011](#)), il a été nécessaire de tester de nouveau une gamme de concentration autour de cette valeur. La concentration recherchée est celle qui, en étant la plus efficace possible, va entraîner le moins de défauts ou de mort embryonnaire. Le volume est peu contrôlable et le matériel change d'un laboratoire à un autre : il est important de tester quelle est la concentration efficace dans ses propres mains. J'ai donc effectué des injections à $300\mu\text{M}$, à $750\mu\text{M}$ comme dans la publication de référence et à $900\mu\text{M}$. C'est cette dernière concentration que j'ai retenue. Une concentration plus faible n'était pas assez efficace.

Lorsque l'on injecte des morpholinos, il faut obligatoirement injecter en parallèle un morpholino contrôle, de la même taille que l'ARN d'intérêt et à la même concentration. Ce morpholino n'est pas complémentaire à un ARN présent à ce stade de développement et permet de connaître avec précision l'impact de l'injection à proprement parler sur les embryons, notamment sur leur temps de développement et sur les signaux biochimiques étudiés. Par exemple, il a été rapporté que les embryons injectés présentent un retard de développement dû à l'injection de deux heures à 21°C ([Leclère et al., 2016](#)) au moment de la gastrulation. Ce sont donc les embryons injectés avec les morpholinos contrôles (*CtrlMO*) qui servent de référence quant au stade de développement des embryons.

Pour injecter les morpholinos, j'ai suivi le très complet protocole [Layden et al. \(2013\)](#). Les aiguilles d'injections sont faites en amont dans des conditions "RNase free" avec une tireuse et sont chargées avec les morpholinos et de la rhodamine-

dextran fluorescente. Ainsi, les embryons injectés sont facilement reconnaissables car fluorescents et on peut les sélectionner après l'injection.

L'injecteur utilisé est un femtojet de chez Eppendorf. Il permet de maintenir une pression constante dans l'aiguille d'injection pour que l'eau ne rentre pas et de délivrer un pulse en pression, grâce à une pédale actionnée avec le pied.

Pour manipuler l'aiguille, inclinée à 45° , je dispose d'un micromanipulateur PHY-MEP qui permet de bouger en x, en z et dans l'axe de l'inclinaison de l'aiguille.

L'injection se déroule sous un microscope Leica DMIL équipé d'une lampe mercure. Ainsi, les embryons injectés sont reconnaissables et on peut, grossièrement, contrôler le volume d'injection car on distingue la solution fluorescente qui entre dans l'embryon. L'eau doit être maintenue à 16°C dans la pétri (Falcon 351007) de manière à ce que les embryons adhèrent au plastique. L'idée est d'injecter un maximum d'embryons avant le premier clivage, ce qui laisse une fenêtre de trois à quatre heures. A ce moment, l'embryon se décolle de la pétri et devient très difficile à injecter.

La difficulté majeure de cette technique est de garder un volume d'injection constant. En effet, à force d'injecter les embryons, des lipides provenant des membranes finissent par s'agglomérer au bout du capillaire et bloquent -partiellement et parfois totalement- l'aiguille d'injection. Deux solutions s'offrent alors à nous : augmenter la pression d'injection ou couper le bout de l'aiguille en faisant attention à ne pas trop en élargir la sortie. Si ces deux techniques sont inefficaces, il faut changer d'aiguille d'injection.

Le volume d'injection est pourtant un paramètre primordial. A concentration égale, un volume trop faible serait inefficace et un volume trop important peut entraîner un mauvais développement embryonnaire, voire la mort.

Cette variabilité et cette incertitude sur le volume d'injection sont les principales difficultés de cette méthode lorsque l'on maîtrise la technique. En effet, après avoir déclenché une ponte avec succès, après avoir injecté plusieurs centaines d'embryons, puis les avoir triés un par un, il est fréquent découvrir qu'une expérience ne sera pas analysable. Soit parce que l'injection n'a eu que très peu d'effet sur le phénotype de gastrulation -volume d'injection trop faible-, soit parce que les embryons ne se sont finalement pas bien développés -volume d'injection trop important. La fenêtre est ténue et injecter au bon volume reste encore pour moi assez laborieux. A l'heure actuelle, le taux de succès est de 8 expériences réussies une vingtaine d'injections, sans avoir pu prévoir à l'avance lesquelles seront analysables.

II.1.3 Rétablissement des forces mécaniques

II.1.3.1 Compression globale uniaxiale

Afin de rétablir les forces mécaniques manquantes dans les embryons *Stbm*⁽⁻⁾ ou d'induire ces forces par anticipation de la gastrulation à des stades plus précoces dans des WT, j'ai compressé les embryons entre lame et lamelle, séparées par des espaceurs de $150\mu\text{m}$. Nous avons testé plusieurs temps de compression différents avant de définitivement choisir de compresser les embryons pendant dix minutes. En effet, un temps plus long semblait affecter les embryons durablement. J'ai observé beaucoup de défauts de développement et d'embryons morts en compressant pendant trente minutes ou une heure. Ces défauts sont invisibles à l'œil nu ou à la loupe binoculaire. C'est grâce au marquage des noyaux en DAPI que j'ai pu faire ces observations.

Etant donné que le temps caractéristique de réaction d'une cellule *in vitro* soumise à une force est de l'ordre de la minute (Yoshigi et al., 2005; Lele et al., 2006), dix minutes de compression semblent amplement suffisantes pour recruter l'actine et la myosine, requises pour la gastrulation, et même pour activer des cascades biochimiques.

Dans la littérature, les descriptions quant à la taille des embryons sont variables. Selon Fritzenwanker et al. (2007) les embryons font $230\pm 40\mu\text{m}$, alors qu'ils ont été mesurés à $205\pm 35\mu\text{m}$ dans Hand and Uhlinger (1992). Devant cette variabilité, qui peut être expliquée par le lot d'anémone, leur âge, leur condition de culture, etc. j'ai décidé d'effectuer moi-même cette mesure. J'ai mesuré $224\pm 18\mu\text{m}$. Les embryons sont comprimés à une longueur fixe $150\mu\text{m}$. Ils subissent donc en moyenne une déformation de $33\pm 6\%$. La force et la déformation ne sont donc pas les mêmes pour chaque embryon.

Cette technique, bien qu'efficace, ne permet pas d'orienter les embryons et donc d'appliquer une force spécifiquement au pôle oral. Les embryons sont a priori dans toutes les orientations possibles et les forces mécaniques appliquées au pôle oral peuvent donc être orientées vers l'intérieur si le pôle oral est au contact de la lame ou de la lamelle, ou vers l'extérieur si le pôle oral est situé sur le côté.

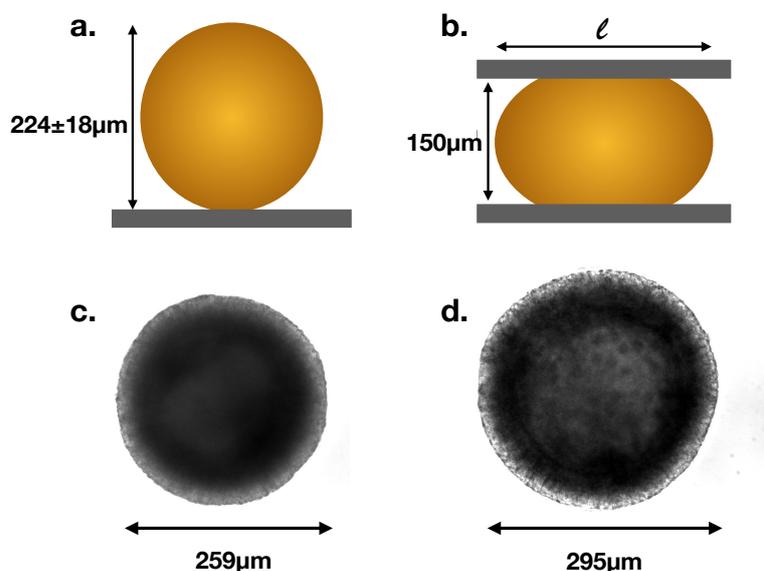


Fig. II.1 **Compression uni-axiale des embryons *Nv*.**

(a) et (b) Représentation graphique d'une compression d'embryon au stade blastula. $224 \pm 18 \mu\text{m}$ représente la moyenne de la taille des embryons et l'écart type. (c) Image en transmission d'un embryon au stage blastula (d) le même embryon comprimé entre lame et lamelle. On peut noter que l'embryon imagé est particulièrement grand (2σ de plus que la moyenne).

II.1.3.2 Compressions orientées

Afin d'appliquer une force orientée vers l'intérieur de l'embryon au niveau du pôle oral, nous avons donc décidé d'affiner cette technique de compression. On ne peut identifier le pôle oral à l'œil nu car l'embryon est sphérique. Il a donc fallu, en amont, injecter une protéine fluorescente s'exprimant de manière asymétrique, et permettant de localiser le pôle oral. Notre choix s'est porté sur Dishevelled dont la dynamique est décrite dans [Lee et al. \(2007\)](#).

L'ARN de Dsh-GFP est injectée au stade zygote comme décrit en partie [II.1.2](#). La traduction en protéine fluorescente ne commence pas avant plusieurs heures de développement et la fluorescence disparaît pendant la gastrulation de l'embryon car Dsh est dégradée à ce stade. Les embryons sont orientés au stade blastula dans des puits de PDMS, le pôle oral vers le haut. Une cinquantaine de micromètres dépassent du puit de manière à ce que lorsque l'on dépose une lamelle par dessus, l'embryon subisse une déformation. La manipulation est extrêmement délicate à plusieurs niveaux. D'abord, l'orientation des embryons est une tâche laborieuse car il faut pouvoir les faire tourner dans le puit sans les abîmer. Ensuite, lorsqu'on dé-

pose la lamelle, les flux hydrodynamiques peuvent faire sortir les embryons du puit et il faut alors recommencer. Ces difficultés empêchent de compresser plus de 10 embryons à la fois si l'on veut être précis sur le timing de compression. Voir Fig II.2 C'est une technique que j'ai réussie une seule fois pour l'instant, et qui demande encore à être améliorée.

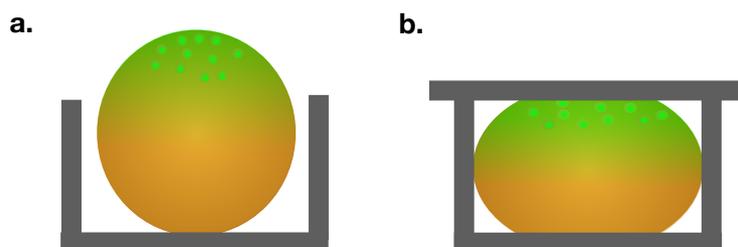


Fig. II.2 **Compressions orientées.**

Les compressions sont systématiquement appliquées au pôle oral de l'embryon (a) Représentation schématique de l'embryon stade blastula orientée dans un puit en PDMS grâce à l'injection de Dsh-GFP. (b) Compression uniaxiale de l'embryon

II.1.4 Output : gènes et protéines

II.1.4.1 *In situ* hybridization et RT-qPCR pour l'observation des ARN

Les techniques d'Hybridation *In Situ* (ISH) et de Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) permettent de révéler la présence de transcrits.

La RT-qPCR relative permet de connaître la quantité d'ARN dans l'embryon global par rapport à un contrôle en se basant sur un gène de référence stable au cours du développement. Environ 150 embryons par condition sont récoltés, broyés, l'ARN est extrait au Trizol puis inversement transcrit en ADN (cDNA) avec le kit GoScript. Cet ADN est alors amplifié grâce à des polymérases qui vont reconnaître les primers designés pour s'accrocher aux extrémités du cDNA. On peut alors réaliser plusieurs cycles d'amplification et on note le cycle à partir duquel la quantité d'ADN dépasse un certain seuil. Ce cycle s'appelle le Ct (threshold cycle).

Nous avons utilisé la méthode de Livak ([Livak and Schmittgen, 2001](#)) pour analyser le changement d'expression des gènes. Pour un gène "g", quatre Cts nous intéressent :

- le $Ct^{\text{treated}}(g)$: Ct du gène "g" en question chez les embryons traités
- le $Ct^{\text{treated}}(\text{ref})$: Ct du gène de référence pour les embryons traités
- le $Ct^{\text{ctrl}}(g)$: Ct du gène "g" pour les embryons contrôles
- et le $Ct^{\text{ctrl}}(\text{ref})$: Ct du gène de référence des embryons contrôles .

On calcule alors la différence obtenue entre le Ct du gène "g" et le Ct du gène de référence pour les embryons traités et pour les embryons contrôles.

$$\Delta Ct^{\text{treated}} = Ct^{\text{treated}}(g) - Ct^{\text{treated}}(\text{ref})$$

$$\Delta Ct^{\text{ctrl}} = Ct^{\text{ctrl}}(g) - Ct^{\text{ctrl}}(\text{ref})$$

Enfin, la différence entre ces deux quantités s'appelle le $\Delta\Delta Ct$ et nous permet de calculer le Fold change, quantité représentée sur les figures :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{\text{treated}} - \Delta Ct^{\text{ctrl}}$$

$$Fc = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Grâce à une RT-qPCR, on peut donc quantifier le changement d'expression d'un gène en quantifiant le niveau transcript de ce gène par rapport à des embryons contrôles et par rapport à un gène de référence. Dans le cette étude, le gène de référence est GADPH. Les RT-qPCR ont été réalisées par Hereroa Johnston (doctorant, IRCAN) dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe "Embryogenèse, Régénération & Vieillesse" dirigée par Eric Röttinger, selon le protocole [Röttinger et al. \(2012\)](#).

Si la RT-qPCR permet de connaître le niveau d'expression d'un gène par rapport à une référence, cette technique ne permet pas de déterminer où ce gène s'exprime. Cela est pourtant une information importante car il se peut qu'une drogue ou qu'une injection de morpholinos n'ait pas d'effet sur le niveau d'expression global d'un gène mais modifie fortement le pattern d'expression génique. Les analyses spatio-temporelle de l'expression des gènes sont possibles grâce à des hybridation *in situ* (ISH). En bref, les embryons sont récoltés, traités de manière à ce que une sonde ARN complémentaire puisse s'hybrider à l'ARN ciblé. Cette sonde est marquée

avec une digoxigenin (DIG) qui va réagir avec la solution NBT/BCIP et colorer directement le tissu embryonnaire où elle est présente (Genikhovich and Technau, 2009b). On peut alors connaître l'expression spatio-temporelle de gènes.

II.1.4.2 Immunofluorescence indirecte pour l'observation des protéines

Pour observer les embryons au stade désiré et marquer les protéines choisies, il est nécessaire de les fixer. La fixation consiste à incuber les embryons dans une solution de PFA 4%, et de glutaraldéhyde à 0,2%. En raison de l'auto-fluorescence de la glutaraldéhyde, j'ai aussi utilisé un protocole élaboré pour le Cnidaire *Clytia hemisphaerica* (Amiel and Houliston, 2009) et ré-adapté pour *Nematostella Vectensis* par Aldine Amiel (IRCAN). Au stade de développement étudié, et pour les protéines observées, les deux protocoles ont donné des résultats sensiblement similaires.

La technique d'immunofluorescence nous permet d'attester de la présence de protéines ou de leur état biochimique (ici la phosphorylation Y654 de la β cat notée ci après p- β cat) à un moment donné et de connaître leur localisation de manière précise. Les techniques de fixation sont conçues de manière à modifier le moins possible la forme du tissu et la morphologie de l'embryon. On peut donc essayer de coupler la présence d'une protéine avec la géométrie du tissu si cela est pertinent.

L'anticorps utilisé contre la p- β cat n'avait jamais été testé sur *Nematostella vectensis* et les tests de spécificité de l'anticorps contre la protéine ont été réalisés par Thibaut Brunet (PhD) puis Anne-Christine Brunet (IE).

Les marquages d'immunofluorescence ont été adaptés à partir des protocoles Wikramanayake et al. (2003), Lee et al. (2007), Magie et al. (2007). En bref, les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de sérum fœtal bovin à 10% pendant 30 minutes puis les embryons sont incubés avec l'anticorps anti p- β cat (1/200) pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages et une autre étape de blocage, les embryons sont incubés 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire fluorescent Alexa488 pour marquer la p- β cat, et de la rhodamine-phalloïdine (1/300) pour marquer l'actine. Les embryons peuvent être gardés deux semaines en PBS à 4°C ou indéfiniment en Vectashield à -20°C.

Les embryons fixés sont déposés sur une lamelle dans du Vectashield+DAPI. Afin d'avoir plusieurs angles de vue, la lamelle n'est pas scellée : on peut ainsi tourner les embryons en bougeant la lamelle et imager une autre partie du tissu.

Le pôle oral n'est reconnaissable que pour les embryons qui ont déjà commencé leur gastrulation. Comme un embryon au stade blastula -ou un embryon dont la gastrulation a été inhibée- présente une forme sphérique anisotrope, il faut tourner l'embryon et l'imager sous différents angles de vue pour avoir une chance d'imager le blastopore. A noter que même avec cette technique, rien ne garanti que le blastopore a été imagé...

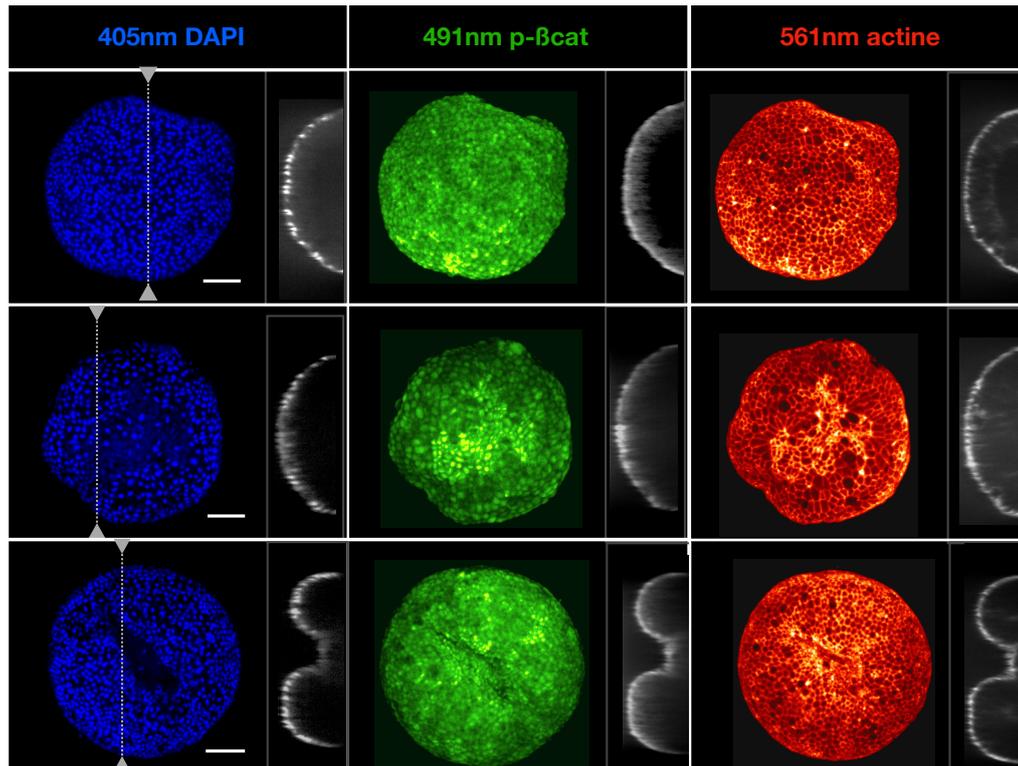


Fig. II.3 *Images recolorisées des 3 signaux récoltés.*

En bleu, les noyaux marqués avec le DAPI. La barre blanche représente 50 μ m. La ligne en pointillée correspond à la coupe virtuelle représentée à droite de l'embryon pour chacun des trois signaux. En vert, le signal p- β cat et en rouge l'actine. (a) Embryon1 Stade blastula (b) Embryon2 Very-Early gastrula : constriction apicale des cellules du domaine central (c) Embryon3 Early-gastrula : flambage des tissus vers l'intérieur

Les embryons ainsi disposés sont imagés au grossissement x20 avec l'objectif huile d'un microscope à spinning disk Olympus IX70-Ropper couplé à une caméra Cool Snap HQ2. Nous avons récolté des piles d'images (stacks) séparées de 1 μ m dans 3 longueurs d'onde différentes : 405nm pour les noyaux marqués avec le DAPI,

491nm pour la p- β cat et 561nm pour l'actine marquée avec la phalloïdine (voir Fig. II.3)

II.2 Analyse d'image, Développements méthodologiques

Les images obtenues ont d'abord été analysées avec les outils classiques d'ImageJ. Rapidement, l'automatisation et l'analyse computationnelle se sont imposées d'elles même pour plusieurs raisons.

Tout d'abord le volume de données à traiter est conséquent. Chaque expérience nécessite d'analyser une centaine d'embryons, donc deux fois plus d'images (pour les deux longueurs d'onde) de 80 stacks en moyenne. Cela donne un volume d'environ ~ 500 Go à gérer pour chaque expérience. Il est absolument nécessaire d'obtenir ce volume de données et un nombre d'embryons important à chaque expérience. En effet, les embryons, bien que fécondés au même moment (à 30 minutes près), se développent de manière assez peu stéréotypée. Contrairement à l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* où l'on peut prévoir exactement chaque étape du développement à quelques minutes près, le développement de *Nematostella* est beaucoup moins prédictible. A titre d'exemple, lors du premier clivage, il n'est pas rare d'observer des embryons sauter l'étape "deux cellules" et passer directement de une à quatre cellules. De manière similaire, au moment de la gastrulation, tous les embryons n'invaginent pas exactement de la même manière ou au même moment. Ils n'ont pas tous la même taille ou le même nombre de cellules. Afin de pouvoir distinguer des caractéristiques partagées statistiquement parmi ces embryons montrant des diversités importantes, il a fallu générer une grande quantité de données. Pour chaque condition analysée, j'essaye d'avoir plus de trente embryons.

Ensuite, afin de mieux comprendre les interactions entre l'actine et la p- β cat, une simple analyse de corrélation avec ImageJ s'est révélée inefficace. En effet, l'actine s'accumule dans les jonctions cellulaires alors que la p- β cat est activée et localisée dans le cytoplasme des cellules ainsi que dans le noyau. Cela implique que les deux signaux sont complémentaires : là où l'un est fort, l'autre est faible. Il fallait donc un programme permettant de reconnaître pour chaque cellule les jonctions cellulaires et de les associer avec le cytoplasme. C'est ce que nous avons mis en place.

Ce travail a été initié à l'échelle tissulaire par Benjamin Gallois, stagiaire M2 au laboratoire de janvier à juillet 2017, maintenant en thèse au LPJ, Paris. Il a dé-

veloppé un programme permettant d'automatiser l'analyse globale d'intensité des embryons avec l'aide du langage de programmation Python. Après son départ, j'ai travaillé en étroite collaboration avec Florian Sarron (IAP) afin de développer un algorithme permettant de faire des analyses à l'échelle cellulaire.

Je décris ici les différentes étapes du programme à travers l'étude comparée de trois embryons représentatifs des phénotypes observés ; un embryon non gastrulé au stade blastula -ci après appelé "embryon-1"-, un embryon présentant de la constriction apicale au niveau du domaine central, "l'embryon-2", et un embryon early-gastrula, commençant son invagination, "l'embryon-3".

II.2.1 Automatisation de l'analyse à l'échelle tissulaire

Le programme prend en entrée un fichier 'csv' contenant le nom des images à analyser, classées par condition. La première étape est donc faire une projection de ces images constituées d'une centaine de stacks. Le module numpy de Python est très pratique pour ce genre de manipulation car il est basé sur du calcul matriciel. Chaque pile d'image est considérée comme une matrice 3D dont la valeur de chaque élément (i,j,k) est notée $I(i,j,k)$. Cette valeur correspond à l'intensité du pixel. A partir de cette matrice 3D, compliquée à analyser, il est facile de créer une matrice 2D ne dépendant plus de k , pour laquelle la valeur de chaque élément (i,j) sera issue d'une opération sur k . Cette matrice 2D est une projection. Les projections les plus classiques sont les projections en somme, en maximum, en minimum, en moyenne, et en écart type.

Pour une projection en somme :

$$I(i, j) = \sum_{k=1}^n I(i, j, k)$$

Pour une projection en maximum :

$$I(i, j) = \max_{1 \leq k \leq n} I(i, j, k)$$

Bien que cette technique soit fréquemment utilisée pour faire des quantifications, la projection en somme ne peut pas être utilisée dans notre cas, car le tissu traversé n'a pas toujours la même épaisseur. Cela est illustré Fig.II.4 où l'on peut voir trois coupes en z du signal p - β cat ainsi que les trois profils d'intensité associés pour deux

embryons différents.

Pour le premier embryon, le point (x_1, y_1) est au centre de l'embryon. La coupe en z (x_1, y_1) traverse donc les tissus de manière perpendiculaire. Sur le profil d'intensité associé, on peut observer un pic correspondant au signal de la surface apicale des cellules, suivi d'une queue de distribution légèrement asymétrique vers la droite qui correspond au signal à l'intérieur des cellules puis au signal à l'intérieur du blastocèle.

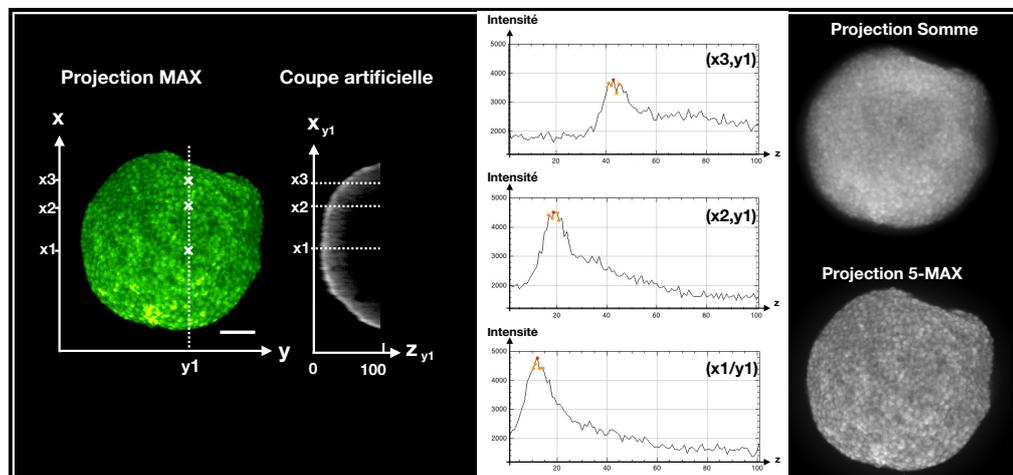
Pour le second profil d'intensité (x_2, y_1) , la coupe est moins perpendiculaire par rapport au tissu. Cela se voit très clairement sur le profil d'intensité : le pic est plus large et la queue de distribution plus asymétrique.

Pour le troisième profil d'intensité, encore plus en périphérie de l'embryon, on observe un pic large suivi d'une queue de distribution importante car même pour $z=100$, les points restent à l'intérieur du tissu. Cette coupe n'atteint jamais le blastocèle. Dans le cas d'une projection en somme, la morphologie sphérique de l'embryon augmenterait donc de manière artificielle l'intensité des bord de l'embryon (x_3, y_1) par rapport au centre (x_1, y_1) .

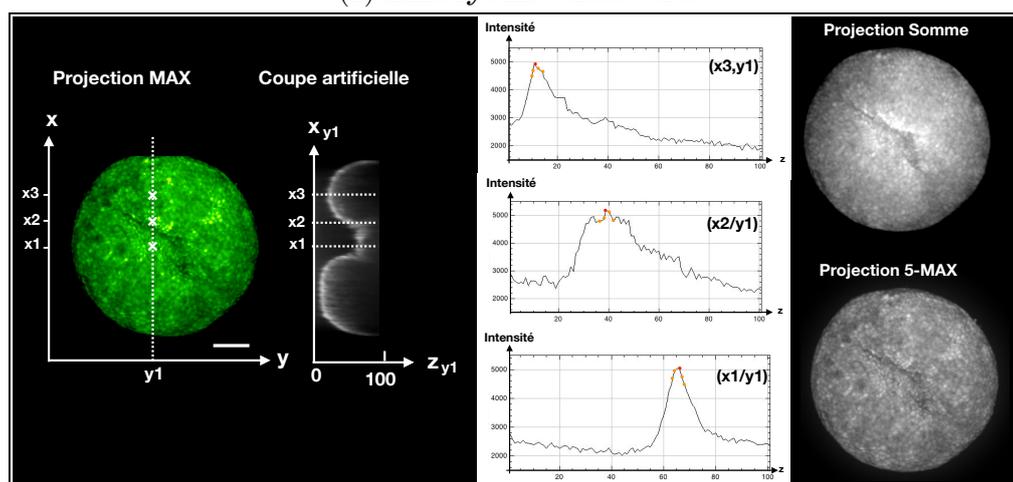
Cet effet est encore plus spectaculaire pour les embryons en pleine gastrulation comme cela est visible Fig.II.4.2. Le point (x_1, y_1) se trouve au fond de l'invagination. Le profil d'intensité en z montre donc un pic fin et tardif suivi d'une queue de distribution très courte. En revanche, la coupe en z au niveau du point (x_2, y_1) est tangente aux tissus flambants vers l'intérieur ; on peut donc observer un pic très large car cette coupe traverse plus de tissu, et notamment plus de tissu en surface, très intense. En conclusion, sommer les valeurs d'intensité pour un embryon gastrulant aurait pour conséquence de sur-estimer la valeur des bords plongeants autour du fond.

La projection en maximum a donc été sciemment choisie. Cependant, l'erreur associée à un seul maxima est grande. Afin de diminuer cette erreur mais aussi d'avoir un signal un peu plus en profondeur, nous avons décidé de moyenner plusieurs points autour du pic d'intensité. Vu la largeur du pic d'intensité, et la taille moyenne des cellules, 5 points semblent correspondre au signal traversant une cellule. Nous avons donc choisi de moyenner le pic autour du maximum global : 2 points avant et deux point après. Le pic d'intensité est représenté en rouge sur les profils d'intensité de la figure II.4 et les deux points avant et après ce pic sont en

jaune.



(1) *Embryon1 - Blastula.*



(2) *Embryon3 - Early-gastrula.*

Fig. II.4 **Choix de la projection.**

En vert, projection en maximum du signal $p\text{-}\beta\text{cat}$. La ligne pointillée y_1 correspond au plan choisi pour la coupe artificielle en noir et blanc. (barre d'échelle : $50\mu\text{m}$)

Au centre, les trois profils en z correspondant aux trois x représentés sur la coupe artificielle noir et blanc. Le maximum global est en rouge et les 4 points autour du maximum global en jaune. Sur la droite, en haut, la projection en somme ; en bas, la projection dite "5-max", correspondant à la moyenne du maximum global (point rouge sur le profil d'intensité) et des 4 points (jaunes sur le profil d'intensité) autour de ce maximum. C'est cette projection qui est utilisée pour la suite de l'étude.

Une fois la projection réalisée, un filtre Otsu est appliqué. L'algorithme réalise un seuillage automatique d'une image en base de gris afin de la rendre binaire. Il classe donc les pixels en deux catégories, les forts et les faibles, de manière à ce que leur variance inter-classe soit maximale et leur variance intra-classe minimale. Dans notre cas, les pixels de l'embryon étant très largement au dessus de ceux du fond, le filtre permet de sélectionner l'embryon et de le séparer du fond en créant deux masques binaires. Pour le premier masque, les pixels de l'embryon valent 1 et le fond vaut 0 ; le deuxième masque étant son exact inverse. On peut observer Fig.II.5 que le masque épouse relativement bien le contour des embryons malgré les quelques erreurs minimales observables sur le masque de l'embryon-2. Ces erreurs ne sont pas spécifiques aux embryons présentant une constriction apicale. On peut cependant noter que les embryons qui invaginent (comme l'embryon-3) ont tendance à être plus sphériques et donc plus réguliers dans leur contour, ce qui facilite le filtrage.

En multipliant ces masques avec l'image projetée, on peut facilement s'abstraire du fond encombrant pour la squelettisation et la segmentation (voir Section. II.2.2 et II.2.3), et surtout faire des moyennes d'intensité globale de l'embryon et normaliser cette mesure avec le fond.

Pour les embryons non invaginés dont il est impossible de reconnaître le pôle oral, il est préférable, comme nous l'avons vu de disposer de plusieurs angles de vue. Le programme peut ainsi faire les calculs de moyenne d'intensité pour chaque angle de vue et sélectionner la valeur la plus élevée afin de ne pas introduire de biais dans le sens de notre hypothèse. En effet, d'après nos observations (voir Part.III.1.1), le pôle oral d'un embryon qui constricté ou qui invagine est la partie la plus intense de l'embryon (à la fois pour les signaux d'actine et de p- β cat). Pour comparer ces signaux à des embryons qui n'invaginent pas et tenter de voir s'il y a une différence importante, il est préférable de comparer ces signaux -dont on est sûr qu'ils proviennent du pôle oral- aux intensités les plus fortes des embryons non invaginés dont on ne peut reconnaître le blastopore.

En d'autres termes, nous mesurons toujours le signal le plus intense de l'embryon, qu'importe son phénotype. Pour les embryons constrictés ou invaginés, ce signal correspond au blastopore, pour les autres, nous ne pouvons nous en assurer.

Le premier output est donc le signal moyen de l'embryon, normalisé par le signal moyen du fond. On peut alors comparer cette valeur pour les différentes conditions. Cette donnée permet de recueillir une première information globale très utile permettant de comparer le niveau global de p- β cat total entre les différents phénotypes. Cependant, moyenniser tout l'embryon, que ce soit en p- β cat ou en actine, bruite énormément le signal. Par exemple, le signal d'actine est très intense dans les jonctions et beaucoup moins dans les cellules. Une moyenne du signal total ne fera qu'aplatir les différences et ne donnera pas beaucoup de renseignements. C'est pourquoi nous avons décidé d'augmenter la précision de nos analyses informatiques, et faire de la squelettisation pour discriminer et analyser à part le signal jonctionnel du signal intra-cellulaire.

II.2.2 Squelettisation avec DisPerSE

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le logiciel DisPerSE¹ (Discrete Persistent Structure Extractor) (Sousbie, 2011). Ce programme, a été conçu dans le cadre de l'astrophysique, pour détecter des structures (la toile cosmique) dans la distribution de galaxies à partir d'un échantillonnage discret (la position des galaxies).

A partir de la théorie de Morse, l'algorithme extrait les points critiques de la distribution, c'est à dire les points pour lesquels le gradient est nul (maxima, minima et points selles), puis relie les maxima aux points selles en passant par des "crêtes" d'intensité. En astrophysique, les maxima correspondent aux amas ou groupes de galaxies et les jonctions entre ces points correspondent aux filaments de galaxies.

De manière intéressante, une image de la distribution de galaxies présente beaucoup de similitude avec une image du réseau d'actine : nous avons un réseau de points intenses -les jonctions de trois voire quatre cellules- reliés entre eux par des segments moins intenses -les jonctions de deux cellules. Entre ces filaments se trouvent des zones de moindre intensité. (cf. Fig.II.5.1.a')

DisPerSE détecte donc les jonctions cellulaires de trois cellules (les TCJs -Tri Cellular Junctions) ou plus et les filaments qui les relient et permet de construire un squelette. Ce squelette est converti en une image binaire : les filaments valent 1 et le reste 0. La Fig.II.5 montre le signal d'actine (a et a'), le squelette correspondant (c et c') et la fusion des deux images (d et d').

1. <http://www2.iap.fr/users/sousbie/web/html/indexd41d.html>

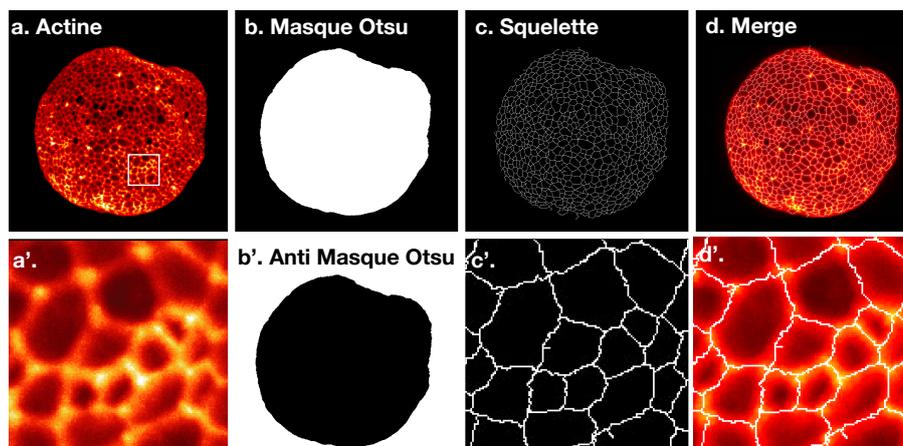
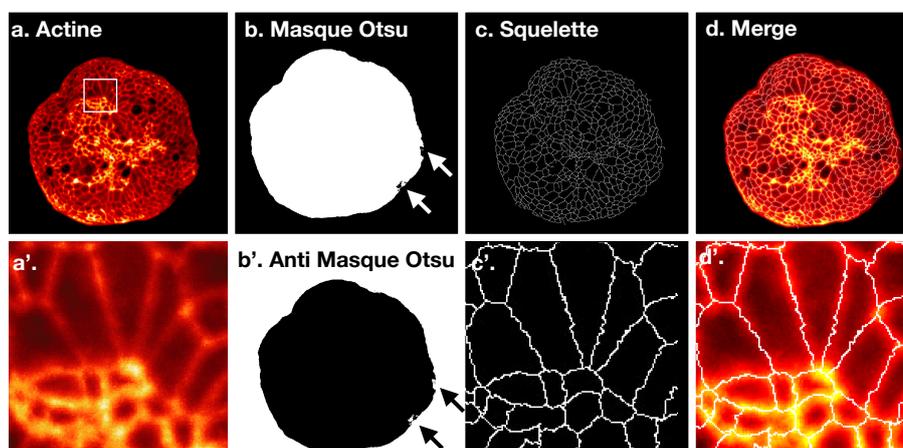
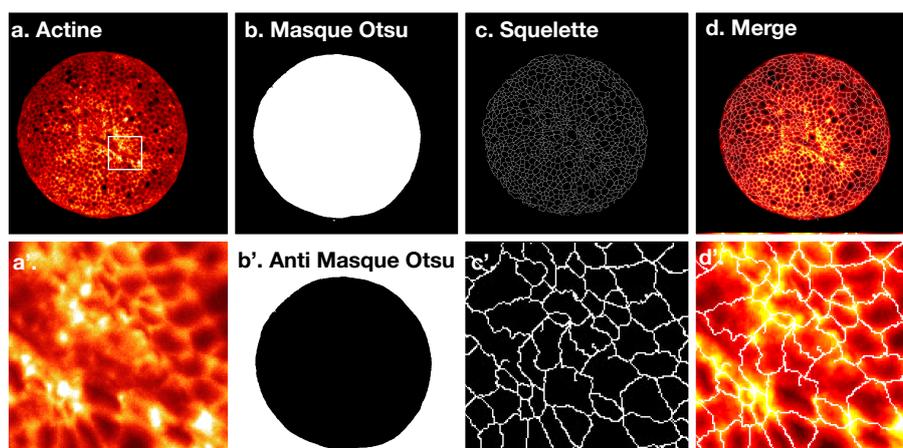
(1) *Embryon-1. Stade blastula*(2) *Embryon-2. Constriction apicale des cellules du domaine central*(3) *Embryon-3. Early-gastrula : invagination des tissus*

Fig. II.5 *Squelettisation avec DisPerSE* (a) Projection du signal d'actine (b) Masque Otsu : les pixels noirs valent 0 et les blancs valent 1. Les flèches de l'embryon-2 montrent les défauts du filtrage Otsu. (b') Inverse du masque Otsu (b) (c) Squelette d'actine obtenu avec DisPerSE. La largeur des filaments est de 1 pixel. (d) Fusion des images a. et b. (a',c',d') Agrandissement des images a, c et d respectivement. La zone agrandie correspond au carré blanc de l'image a.

Le seuil de détection permet de filtrer le bruit qui crée des paires de points critiques locaux. En seuillant l'image, ces paires se retrouvent en-dessous du niveau de détection et la détection des points critiques correspondant réellement aux TCJs n'est pas perturbée.

Trouver le seuil adéquate est essentiel pour un squelette d'actine épousant bien les jonctions cellulaires. S'il est trop bas, des jonctions cellulaires supplémentaires vont apparaître et l'embryon comptera plus de cellules qu'en réalité. Au contraire, si le seuil est trop haut, il manquera des jonctions cellulaires, ce qui aura pour conséquence de fusionner des cellules. Malheureusement, ce paramètre qui varie selon les images, n'est pas encore automatisé. Il a donc fallu ajuster le seuil de détection des filaments pour chaque embryon.

DisPerSE est plus performant pour tracer le squelette d'embryons non gastrulés. En effet, comme cela est expliqué plus haut, le programme relie ensemble les maximas et les points selles en passant par des crêtes d'intensité. Plus ces crêtes sont contrastées et plus il est aisé de les tracer. Comme on peut le voir FigII.5.1, les cellules d'un embryon au stade blastula sont relativement grandes. Cela implique que les jonctions cellulaires définissent les cellules de manière claire : les parois sont brillantes et l'intérieur du cytoplasme constitue un puit en intensité, contrastant ainsi les crêtes. Lorsque la constriction apicale commence, la surface apicale des cellules diminue et les jonctions sont de plus en plus proches ce qui rend la squelettisation complexe. Dans une invagination prononcée, les cellules invaginant du domaine centrale sont parfois à peine visibles et sont tellement serrées entre elles que les jonctions cellulaires se touchent et DisPerSE peine à tracer des filaments. L'agrandissement d'une partie du domaine central invaginant de l'embryon-3 illustre bien ce phénomène. On peut voir que DisPerSE peine à distinguer les filaments dans les zones très intenses et que la squelettisation est plus confuse.

Néanmoins, la squelettisation en générale est fiable (cf. Fig.II.5) et DisPerSE se révèle être un outil robuste. Grâce à ce squelette, nous disposons d'images binaires du réseau cellulaire avec des filaments d'une largeur d'un pixel comme représenté Fig.II.5.c et c'. La largeur utilisée pour les calculs d'intensité (expliqués ci-dessous), et qui semble le mieux correspondre à ce que l'on peut observer, est de 5 pixels. C'est la largeur que l'on peut observer sur la Fig.II.6.

Ces images binaires du squelette permettent différentes analyses. Par exemple, pour connaître le signal moyen de l'actine jonctionnelle, il suffira de multiplier le squelette d'actine (les filaments valent 1 en intensité, le reste 0) par l'image projetée

d'actine (cf. Fig. II.6.b et b'). Pour cette nouvelle image, les pixels appartenant aux filaments ont toujours la même valeur d'intensité mais les pixels en dehors des filaments valent zéro. On peut alors réaliser une moyenne de tous les pixels non nuls. De la même manière, en multipliant l'inverse du masque du squelette par l'image projetée en p- β cat, nous pouvons connaître le signal moyen de la p- β cat cytoplasmique en faisant abstraction des jonctions cellulaires (cf. Fig. II.6.f et f').

C'est avec ce genre d'algorithme (décrit en détail Part. II.2.5) que nous avons fait les analyses Part. III.1.2.

Nous avons donc là des outils très pratiques pour analyser les différents signaux moyennés en sélectionnant les parties qui nous intéressent -jonctions ou centre des cellules- et comparer un grand nombre d'embryons entre eux. Cependant, ces analyses ne nous permettent pas d'étudier en détail la répartition du signal. La cellule étant l'unité de base de l'embryon, nous avons adapté différentes techniques déjà existantes, comme la segmentation, pour analyser les signaux à cette échelle.

II.2.3 Segmentation : Analyses à l'échelle cellulaire

La segmentation permet de partitionner l'image en différents groupes de pixels ayant des caractéristiques communes.

Ici, nous voulons identifier chaque cellule. Il est donc nécessaire que chaque pixel reçoive un label indiquant le numéro de sa cellule; tous les pixels ayant le même label constituent une cellule. Pour réaliser cette opération, nous avons utilisé une fonction 'watershed'. Cette fonction permet d'identifier en tant qu'objet chaque groupe de pixels dont la valeur ressort d'un seuil à définir. Dans notre cas, nous n'avons pas besoin de définir un seuil : grâce à la squelettisation, nous possédons des images dont des filaments dont les pixels valent 0. Dans ces images, les cellules sont des îlots de pixels non nuls entourés de pixels nuls (cf. Fig. II.6, c, c', f, f').

Les cellules de moins de cinquante pixels ont été écartées de l'analyse. En effet, elles ne correspondent pas à de vraies cellules, mais à des artefacts créés par la squelettisation. Dans les zones constrictées ou qui invaginent, le signal d'actine est très fort et le tissu "accidenté" (c'est à dire qu'il n'est pas plan). Le programme a tendance à dessiner des filaments enchevêtrés. Entre ces filaments désordonnés, des trous apparaissent créant de fausses cellules de quelques pixels. Nous pouvons observer ce phénomène sur l'agrandissement d'une cellule de l'embryon-3 de la Fig. II.7 (images b' et c') : les flèches blanches pointent vers ces pixels en noir et blanc qui ont été écartés de l'analyse.

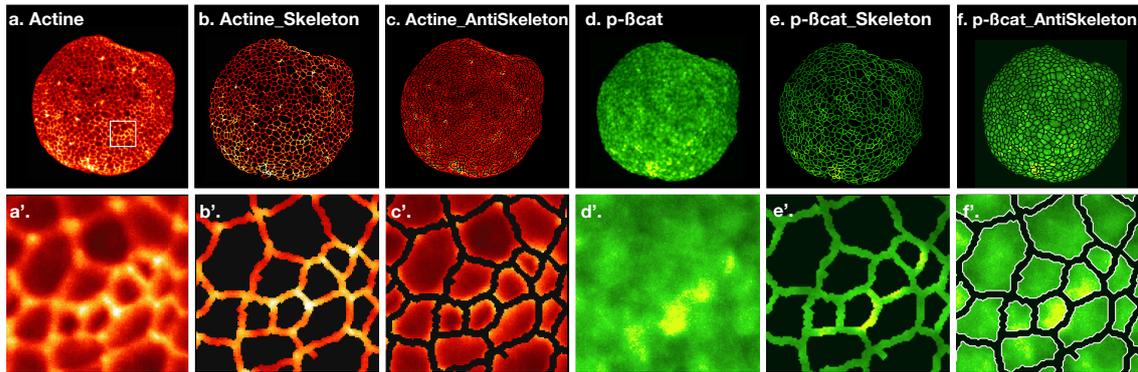
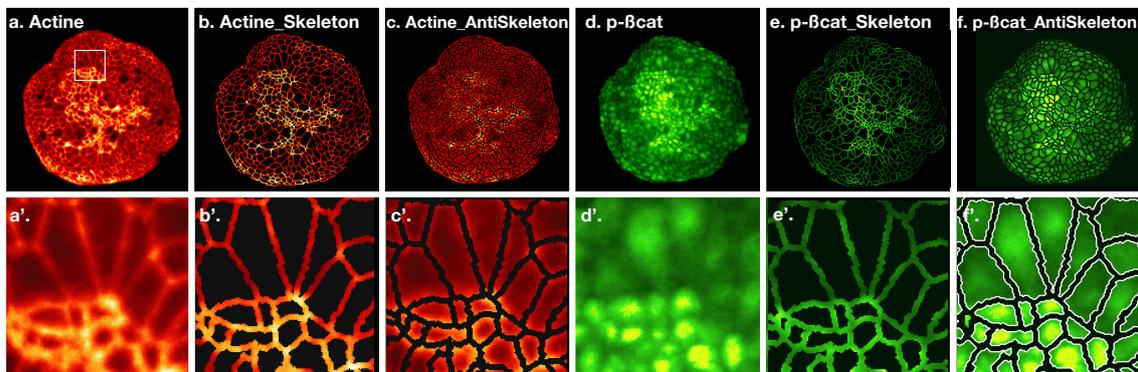
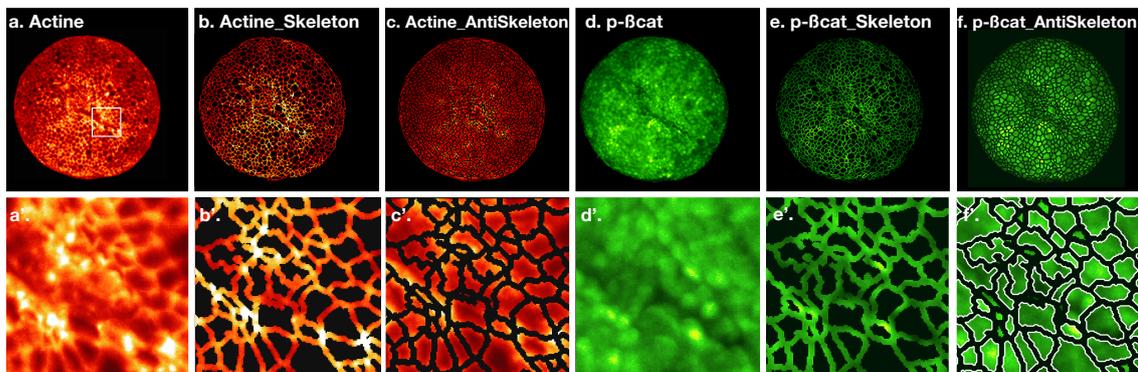
(1) *Embryo-1. Stade blastula*(2) *Embryo-2. Constriction apicale*(3) *Embryo-3. Early-gastrula*

Fig. II.6 *Discrimination du signal jonctionnel ou cytoplasmique grâce à la squelettisation*

(a) Projection du signal d'actine (b) Sélection de squelette d'actine. La largeur des filaments est de 5 pixels. Les pixels valent 0 en dehors des filaments. (c) Sélection de l'anti-squelette d'actine. Les pixels valent 0 dans les filaments. (d) Projection du signal p-βcat (e) Sélection des jonctions cellulaires, signal p-βcat. (f) Sélection du cytoplasme, signal p-βcat. (a', b', c', d', e', f') Agrandissement des images a, b, c, d, e et f respectivement. La zone choisie correspond au carré blanc de l'image a.

De la même manière, sur les bords, de longues cellules entourant l'embryon apparaissent parfois. Ces cellules ont été également écartées de l'analyse.

Pour tous les embryons, nous possédons un tableau répertoriant les données suivantes pour chaque cellule :

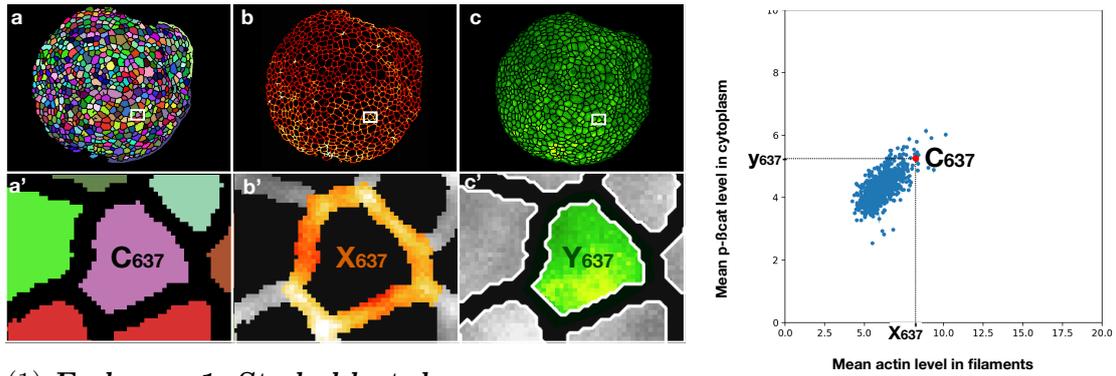
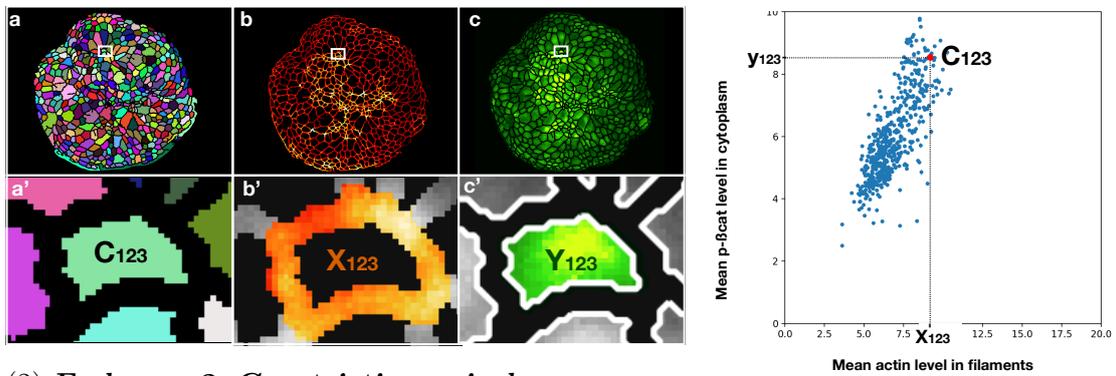
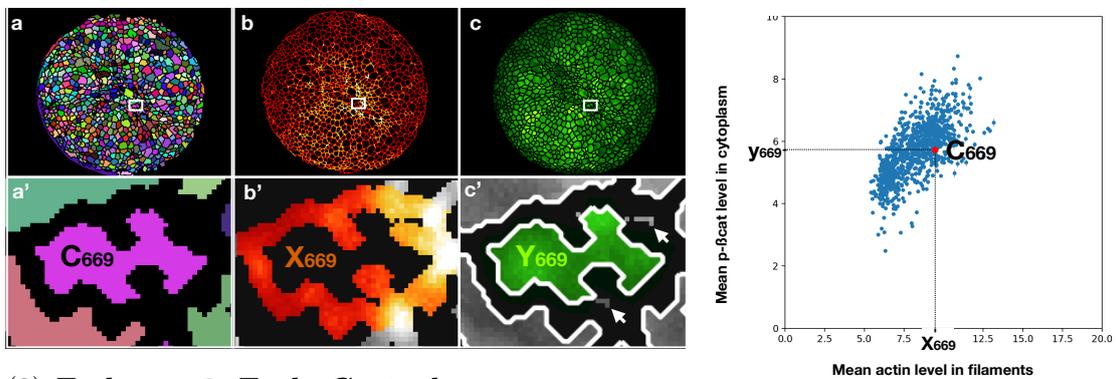
- sa moyenne d'intensité en actine jonctionnelle
- sa moyenne d'intensité en actine médio-apicale
- sa moyenne d'intensité en p- β cat jonctionnelle
- sa moyenne d'intensité en p- β cat cytoplasmique
- les écarts types (STD) et les écarts à la moyenne (SEM) de chacune de ces moyennes
- son nombre de pixels donc sa surface apicale

II.2.4 Exemples d'utilisation

Ainsi, nous sommes en mesure de croiser ces données afin d'obtenir différentes informations. Par exemple, nous pouvons mettre en relation l'actine jonctionnelle et la p- β cat cytoplasmique, ou la taille des cellules avec leur niveau d'actine, etc.

Par exemple, les graphiques de la Fig. II.7 représentent le signal moyen de la p- β cat cytoplasmique (la moyenne des pixels verts Fig. II.7.c et c') normalisé par le fond en fonction du signal moyen de l'actine jonctionnelle (les pixels oranges Fig. II.7.b et b') normalisé par le fond pour chaque cellule. Chacun des trois graphiques correspond à un seul embryon, et chaque point bleu correspond à une cellule.

Ce genre de graphique nous permet d'observer la distribution de ces deux signaux par cellule et par embryon et leur relation éventuelle. Ici, cela nous permet de mettre en évidence qu'il existe une corrélation entre la p- β cat et l'actine jonctionnelle, quelque soit le phénotype de ces trois embryons. De plus la relation entre les deux signaux semblent linéaire. Pour l'étude détaillée de cette corrélation, se référer à la Part. III.1.1.2.

(1) *Embryon-1. Stade blastula*(2) *Embryon-2. Constriction apicale*(3) *Embryon-3. Early-Gastrula*Fig. II.7 *Analyse à l'échelle cellulaire : segmentation*

(a) Segmentation : chaque cellule est identifiée et numérotée par le programme. Chaque couleur correspond à une cellule. Les jonction cellulaires sont en noir. (b) Squelette d'actine (c) $p\text{-}\beta\text{cat}$ cytoplasmique (a',b',c') Agrandissement de la cellule du carré blanc des images a,b,c. La cellule C_n d'abscisse x_n et d'ordonnée y_n est identifiée sur le graphe. (b',c') Les pixels colorés correspondent au signal sélectionné pour une cellule et moyenné pour le calcul d'intensité. (d) Moyenne de la $p\text{-}\beta\text{cat}$ cytoplasmique en fonction de l'actine jonctionnelle moyenne pour chaque cellule. Chaque point correspond à une cellule. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La cellule agrandie C_n est identifiée sur le graphique.

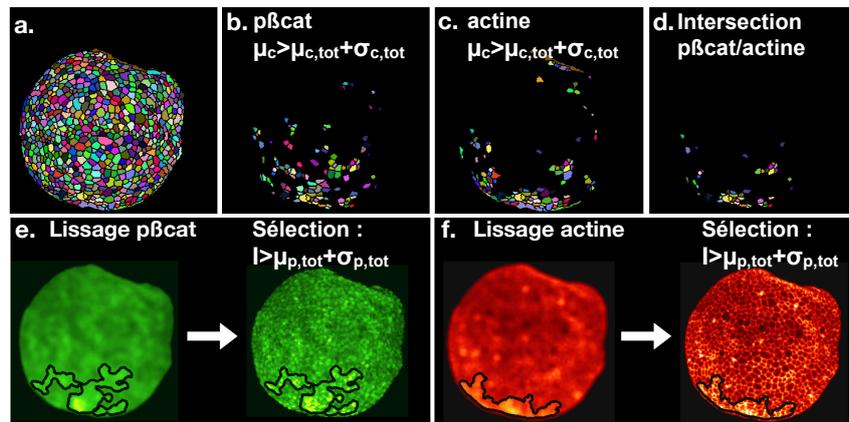
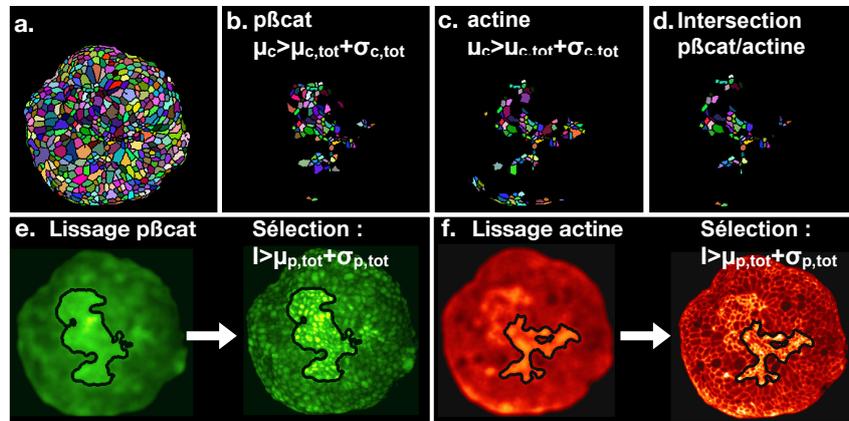
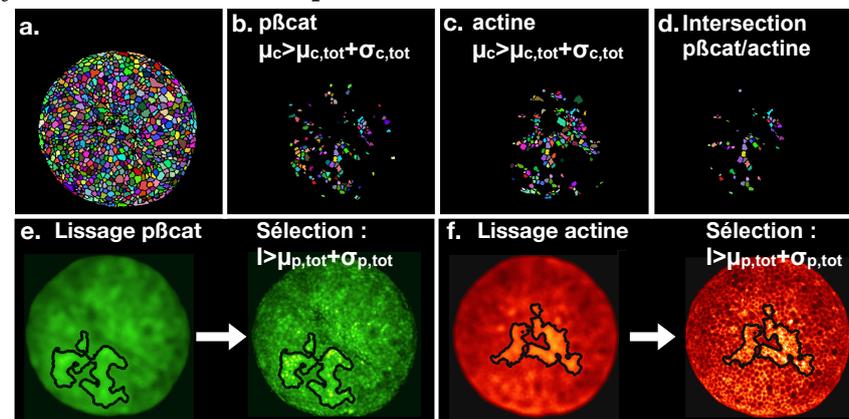
Pour étudier l'étendue du signal de chaque embryon, nous avons développé un autre type d'analyse basé sur la sélection du signal intense ; illustration en Fig. II.2.4.

Un premier algorithme permet de sélectionner les cellules les plus intenses. Une cellule est sélectionnée si sa moyenne μ_c est au dessus d'un certain seuil. Le seuil est fixé à un sigma au dessus de la moyenne du signal de toutes les cellules ($\mu_c > \mu_{\text{tot},c} + \sigma_{\text{tot},c}$). Les cellules sélectionnées peuvent ainsi être dispersées dans tout l'embryon.

Pour sélectionner des zones regroupées (correspondant plus au pattern de constriction apical visible sur l'embryon-2), nous avons développé un deuxième type d'algorithme. L'image de l'embryon est volontairement sur-lissé (par un kernel de 20 pixels de diamètre) pour flouter la structure cellulaire. On effectue ensuite une segmentation à l'aide d'un algorithme de watershed (cf Part. II.2.3) sur l'embryon sur-lissé. Le seuil pour la segmentation est d'abord fixé à un sigma (écart type) au dessus de la moyenne des pixels de tout l'embryon ($I > \mu_{\text{tot},p} + \sigma_{\text{tot},p}$). Le programme sélectionne la plus grande zone trouvée lors de la segmentation. Si cette zone est inférieure à 30'000 pixels, le seuil est baissé de manière itérative de 0.1σ . Cela permet de sélectionner une zone regroupée spatialement.

Pour un même embryon, les deux types d'analyse (sélection de cellules intenses ou sélection d'une zone intense) peuvent être effectuées sur les images d'actine ou de p- β cat et il est possible de comparer les sélections, de connaître leur intersection, ect.

Le développement d'un programme informatique nous permet donc de faire des analyses précises, à l'échelle tissulaire ou cellulaire, irréalisables à la main. Les exemples donnés ici (corrélation actine jonctionnelle/p- β cat cytoplasmique Fig. II.7, ou sélection des cellules les plus intenses Fig. II.2.4) ne sont qu'un aperçu des possibilités multiples que nous offre le programme grâce à toutes les informations que nous possédons sur chaque cellule de chaque embryons.

(1) *Embryon-1. Stade blastula*(2) *Embryon-2. Constriction apicale*(3) *Embryon-3. Early-Gastrula***Figure II.8 – Sélection du signal intense par deux méthodes.**

(a) Embryon segmenté

(b, c) Sélection des cellules dont le signal moyen μ_c est supérieur au signal moyen de toutes les cellules $\mu_{tot,c}$ d'un sigma (d. en p- β cat et e. en actine).

(d) Intersection des cellules sélectionnées en b. et c.

(e et f) Sélection d'une zone intense : Lissage puis sélection d'un groupe de pixels tels que $I > \mu_{tot,p} + \sigma_{tot,p}$, avec I la valeur du pixel, et $\mu_{tot,p}$ la moyenne des pixels de l'embryon lissés (e. en p- β cat et f. en actine)

II.2.5 Listes des algorithmes utilisés dans la thèse

Dans la suite de cette étude, nous avons principalement utilisé deux types d'analyses. L'analyse globale à l'échelle tissulaire, qui nous donne des mesures du signal "en absolu" et l'analyse différentielle qui nous permet d'étudier plus précisément la distribution du signal dans chaque embryon.

Pour plus de clarté, nous résumons ici les algorithmes utilisés.

1. Analyse tissulaire : signal moyenné de tout l'embryon, des jonctions ou des cellules. L'algorithme suivant permet de comparer le signal global, jonctionnel ou intra-cellulaire, soit en actine, soit en p- β cat. Cet algorithme a été utilisé pour analyser les embryons CtrlMO et StbmMO, Part.III.1.2.

- Projection 5-max en 491 (p- β cat) et 561 (actine)
- Filtrage Otsu des deux images
- Squelettisation grâce à l'image 561. Discrimination des pixels intra-cellulaires ou jonctionnels.
- Calcul de l'intensité moyenne des pixels intra-cellulaire et/ou jonctionnels en 491 et en 561.
- Normalisation par la moyenne du fond de l'image (isolé grâce au filtrage Otsu)

2. Rapport des cellules les plus intenses par rapport aux autres. Cet algorithme nous permet d'étudier l'étendue de la distribution. Cela nous renseigne sur l'hétérogénéité des cellules de l'embryon entre elles. En effet, nous sélectionnons les cellules les plus intenses, et nous effectuons le rapport du signal moyen de ces cellules avec les reste des cellules. Cet algorithme est utilisé Part.III.1.1.3.

- Projection 5-max en 491 (p- β cat) et 561 (actine)
- Filtrage Otsu
- Squelettisation à partir de l'image 561. Discrimination des pixels jonctionnels et intra-cellulaires en 491.
- Segmentation (création d'un catalogue de cellules)
- Calcul de la moyenne du signal de chaque cellule (μ_c), puis de la moyenne des μ_c ($\mu_{tot,c}$)
- Sélection de toute les cellules avec $\mu_c > \mu_{tot,c} + \sigma_{tot,c}$
- OUPUT : Rapport de la moyenne des cellules sélectionnées avec les autres cellules

2bis. Ajout d'une condition spatiale. Rapport d'une zone localisée intense avec le reste du signal. Dans cet algorithme, nous utilisons une image lissée afin de sélectionner une zone continue intense, pour la comparer au reste de l'embryon. En faisant cela, nous imposons une condition spatiale sur le signal sélectionné : contrairement à l'algorithme précédent, on ne peut plus sélectionner des cellules réparties dans l'embryon de manière aléatoire. Ces cellules doivent être limitrophes pour être sélectionnées. Cet algorithme est utilisé Part.III.1.1.3.

- *Projection 5-max en 491 (p- β cat) et 561 (actine)*
- *Filtrage Otsu*
- *Squelettisation à partir de l'image 561. Discrimination des pixels jonctionnels et intra-cellulaires en 491*
- *Sélection d'une zone intense de minimum 30'000 pixels : lissage de l'image 5-max (taille de kernel de 20 pixels de diamètre), calcul de la moyenne des pixels de l'embryon lissé ($\mu_{tot,p}$) en 491 (p-cat) puis identification d'un groupe continu de pixels dont la valeur $I > \mu_{tot,p} + \sigma_{tot,p}$. Tant que ce patch est inférieur à 30'000 pixels, on baisse de manière itérative le seuil de sélection de $0.1\sigma_{tot,p}$*
- *OUTPUT : retour à l'image 5-max, rapport de la moyenne des pixels du patch avec le reste du signal*

3. Etude de la corrélation cellulaire entre l'actine jonctionnelle et la p- β cat intra-cellulaire. Cet algorithme nous a permis de croiser les différents signaux entre eux afin d'établir des relations entre les protéines de p- β cat et d'actine. Cet algorithme est utilisé Part.III.1.1.2.

- *Projection 5-max de l'image en 491 (p- β cat) et en 561 (actine)*
- *Filtrage Otsu*
- *Squelettisation à parti de l'image 561 (actine). Discrimination des pixels jonctionnels ou intra-cellulaires pour les deux images projetées.*
- *Segmentation. Création d'un catalogue de cellules.*
- *Mise en relation pour chaque cellule de son signal moyen en p- β cat cellulaire avec son signal moyen en actine jonctionnelle.*
- *OUTPUT : Coefficient de Pearson et de sa p-value associée afin de valider ou non une éventuelle relation linéaire*

Chapitre III

Résultats

Contents

III.1 Forces mécaniques et phosphorylation de la βcat	69
III.1.1 Caractérisation spatio-temporelle de la p- β cat chez l'embryon précoce de <i>Nematostella vectensis</i> autour de la gastrulation	69
III.1.1.1 Observations de la p- β cat lors du développement par immunofluorescence	70
III.1.1.2 Corrélation p- β cat/actine	73
III.1.1.3 La transition Blastula/Constriction : Etude du recrutement de la p- β cat en début de gastrulation	76
III.1.1.4 Etude de la nucléarisation de la p- β cat	80
III.1.1.5 Résumé des résultats obtenus grâce à la caractérisation	82
III.1.2 Blocage et restauration des forces mécaniques par injection du morpholino de Strabismus	83
III.1.2.1 Blocage de la gastrulation par injection de StbmMO	83
III.1.2.2 Restitution des forces mécaniques par compression globale uniaxiale	89
III.1.2.3 Résumé des résultats obtenus grâce aux injections de StbmMO et aux compressions mécaniques	93
III.1.3 Anticipation des forces mécaniques dans les WT	94
III.2 Gènes sous contrôle de la p-βcat	98
III.2.1 Résultats	100
III.2.1.1 Le cas Dishevelled	100

III.2.1.2 Autres gènes, cibles potentielles de p- β cat . . .	103
III.2.2 Discussion	107

III.1 Forces mécaniques et phosphorylation de la β cat

III.1.1 Caractérisation spatio-temporelle de la p- β cat chez l'embryon précoce de *Nematostella vectensis* autour de la gastrulation

Nous voulons tester si, dans l'embryon de *Nematostella vectensis*, la β cat est phosphorylée sur son site Y654 suite aux tensions exercées par les mouvements morphogénétiques de gastrulation.

La première étape consiste à vérifier si la p- β cat coïncide spatialement et temporellement avec les contraintes mécaniques dans les embryons WT.

Comme nous l'avons vu Part.I.3.2.2, la β cat est préférentiellement répartie vers le pôle oral très tôt dans le développement (dès le stade 32-cellules) et est nucléarisée dans les cellules orales. Elle est dégradée au pôle aboral par le complexe impliquant la kinase de la voie cWnt, GSK3. Mais qu'en est-il de la p- β cat ?

En l'absence de méthode transgénique permettant de détecter par fluorescence la p- β cat, nous ne pouvons pas suivre sa localisation en direct lors du développement. La technique utilisée est donc le marquage de la p- β cat par immunofluorescence (cf. Part.II.1.4.2) à différents stades de développement. J'ai réalisé ces marquages en commençant par le stade blastula, c'est à dire avant les premières contraintes mécaniques de la gastrulation, jusqu'à un stade avancé de l'invagination.

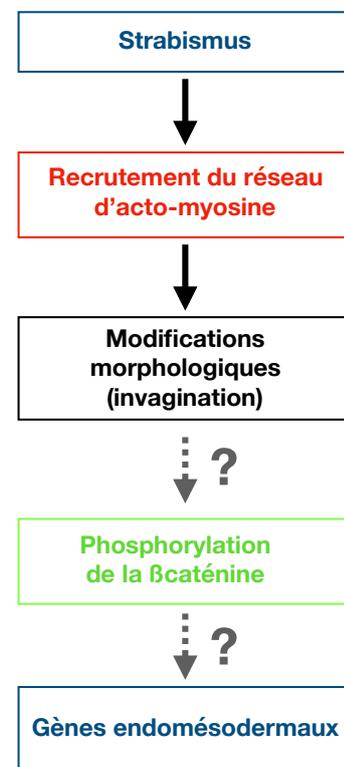


Fig. III.1 *Modèle à tester*

III.1.1.1 Observations de la $p\text{-}\beta\text{cat}$ lors du développement par immunofluorescence

La figure III.2 montre cinq embryons différents du stade blastula jusqu'au stade mid-gastrula. Les marquages permettent de visualiser la $p\text{-}\beta\text{cat}$ en vert et l'actine en rouge.

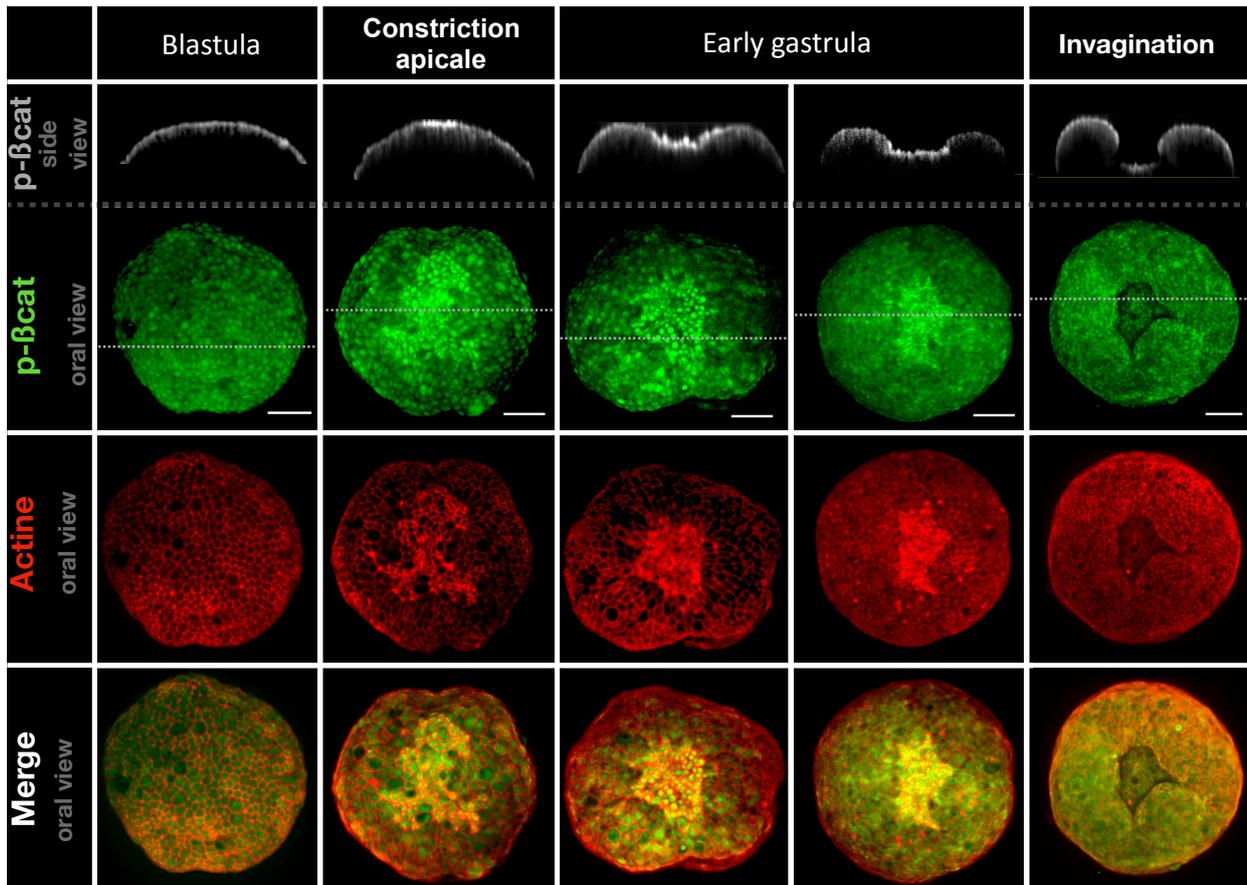


Fig. III.2 *Immunomarques de la $p\text{-}\beta\text{cat}$ et de l'actine du stade blastula au stade mid-gastrula.*

En vert, les images projetées en maximum du signal $p\text{-}\beta\text{cat}$. La ligne pointillée représente l'axe dont la coupe virtuelle est issue (noir et blanc, au dessus).

Barre d'échelle = $50\mu\text{m}$.

En rouge, les images projetées en maximum du signal d'actine.

La dernière ligne d'embryons est la fusion des images en $p\text{-}\beta\text{cat}$ et en actine. En jaune, les signaux colocalisent.

- **Stade blastula**

Le premier embryon de la Fig.III.2 est au stade blastula. C'est une sphère de cellules dont la cavité, le blastocèle, est remplie d'un milieu nutritif. Ce stade est atteint vers 16hpf (hours post-fertilization) à 18°C.

Les marquages révèlent un signal moins fort dans les jonctions cellulaires et surtout présent dans le cytoplasme cellulaire (et probablement dans le noyau cf.Part.III.1.1.4). Certaines cellules apparaissent plus intenses que d'autres ; les cellules les plus intenses pouvant atteindre trois fois le signal moyen des moins intenses.

Le signal d'actine, quant à lui, est très présent dans les jonctions cellulaires mais beaucoup moins dans le cytoplasme. Il est également assez disparate : le signal jonctionnel de certaines cellules peut atteindre jusqu'à trois fois la valeur du signal des cellules les moins intenses.

Nous observons donc un signal de p- β cat et d'actine complémentaire : dans les jonctions cellulaires, le signal de β cat est faible et celui d'actine est élevé, et à l'intérieur de la cellule, c'est l'inverse. Cependant, nous observons une certaine cohérence cellulaire : les cellules avec un fort signal de p- β cat ont aussi un fort signal d'actine jonctionnelle.

En actine ou en p- β cat, on ne distingue aucun motif systématique particulier. Les cellules sont inhomogènes entre elles. On distingue parfois des zones entières plus fortes en p- β cat ou en actine (généralement les mêmes) avec une transition d'une zone à l'autre est graduelle et on distingue quelquefois des cellules qui arborent individuellement un signal fort.

- **Constriction apicale**

Puis, la gastrulation commence par la constriction apicale des cellules du domaine central grâce au recrutement de l'actine. Ces cellules ont un signal d'actine plus fort que les autres cellules. Ce pattern d'actine est clairement visible sur la deuxième colonne de la Fig.III.2 et Fig.III.3.

De manière intéressante, on observe que les cellules fortes en actine jonctionnelle exhibent un signal intense en p- β cat également.

Cette observation est cruciale pour notre étude. En effet, les cellules du domaine central sont les cellules de la plaque pré-endomésodermale, c'est à dire que

ce sont les cellules qui, lorsque la gastrulation est terminée, constituent l'endomésoderme. Si des études précédentes ont déjà fait état de l'enrichissement de cette zone en actine lors de la constriction apicale (Magie et al., 2007), c'est la première fois en revanche que l'on observe que ce recrutement coïncide avec un pattern de p- β cat.

Les cellules en périphérie de la constriction apicale, quant à elles, exhibent un signal beaucoup plus faible relativement en p- β cat et en actine jonctionnelle. Ces cellules correspondent aux cellules de l'anneau central. Le contraste entre les cellules de l'anneau central et du domaine central est important.

• Stade "early-gastrula"

Quand la constriction apicale des cellules du domaine central commence, l'embryon est toujours de forme sphérique (cf. coupe virtuelle de la Fig.III.2). Les cellules du domaine central prennent cette forme caractéristique allongée des cellules "en forme de bouteille", pincée au niveau apical mais très large au niveau basal (Magie et al., 2007) grâce d'une part à la constriction apicale et d'autre part à la perte d'adhésion basale (Tamulonis et al., 2011). Cette asymétrie déclenche le flambage des tissus vers l'intérieur, visible sur les deux embryons "early-gastrula" de la figure III.2.

Les cellules autour du domaine central (les cellules de l'anneau central cf. Fig.III.13) sont très étirées apicalement.

Ces embryons arborent toujours un signal intense en actine et en p- β cat dans les cellules du domaine central, mais plus restreint en taille et plus en profondeur dans l'embryon car la surface apicale des cellules a diminué et la plaque pré-endomésodermale s'est enfoncée dans l'embryon.

Comme cela est particulièrement visible sur la coupe virtuelle en noir et blanc du troisième embryon (le premier des deux "early-gastrula"), les cellules de la plaque pré-endomésodermale ne sont pas aplaties mais au contraire, arborent individuellement une forme rebondie vers l'extérieur. Cet état suggère que le réseau d'actine apical responsable de la constriction agit de manière individuelle sur chaque cellule en l'enserrant sur sa périphérie (Magie et al., 2007) et qu'il n'y a pas (ou peu) de stabilisation de l'actine sous la surface apicale. On peut faire l'hypothèse que le cortex d'acto-myosine n'est pas (ou peu) renforcé par rapport à la ceinture d'adhésion.

- **Stade "mid-gastrula"**

Au stade mid-gastrula, la plaque pré-endomésodermale se retrouve au milieu du blastocèle en terme de profondeur. Les filopodes basaux des cellules endomésodermales exercent des forces afin de tirer les cellules plus profondément dans le blastocèle. Il est beaucoup plus difficile de suivre l'évolution des cellules de la plaque pré-endomésodermale car les tissus ne sont plus parallèles au champ lorsqu'ils rentrent dans le blastocèle, puis sont recouverts par les lèvres du blastopore.

Il semblerait que la différence d'intensité entre les cellules diminue. Les cellules de la plaque pré-endomésodermale retrouvent un niveau en p- β cat et en actine moyen et le patch fort observé d'actine et de p- β cat disparaît. Quelques cellules, cependant, dans les plis radiaux par rapport à l'invagination gardent un niveau élevé de signal p- β cat.

III.1.1.2 Corrélation p- β cat/actine

Une observation détaillée nous fournit une information supplémentaire importante : la cohérence entre le signal d'actine et celui de la p- β cat est frappante même en dehors des zones de constriction apicale. Cette corrélation est aussi visible chez les embryons non-constrictés au stade blastula. Nous pouvons voir cela sur la Fig. III.2 : les zones les plus intenses en actine jonctionnelle correspondent également à des zones intenses en p- β cat. En revanche, lorsque les tissus s'enfoncent dans l'embryon et que le fort pattern en actine et en p- β cat disparaît, les deux signaux semblent être moins corrélés.

Nous avons voulu vérifier cette corrélation de manière plus précise et vérifier si l'on pouvait généraliser cette observation. Comme nous l'avons déjà vu, nous ne parlons pas ici d'une corrélation pixel par pixel car les signaux sont complémentaires : dans les jonctions, l'actine est intense et la p- β cat plus faible, et à l'intérieur des cellules, l'actine est plus faible et la p- β cat plus intense. Les pixels forts en actine ne sont donc pas ceux exhibant un signal fort en p- β cat. En revanche, on observe une "colocalisation cellulaire". En effet, les cellules exhibant un signal fort en actine jonctionnelle, sont également très marquées en p- β cat cellulaire.

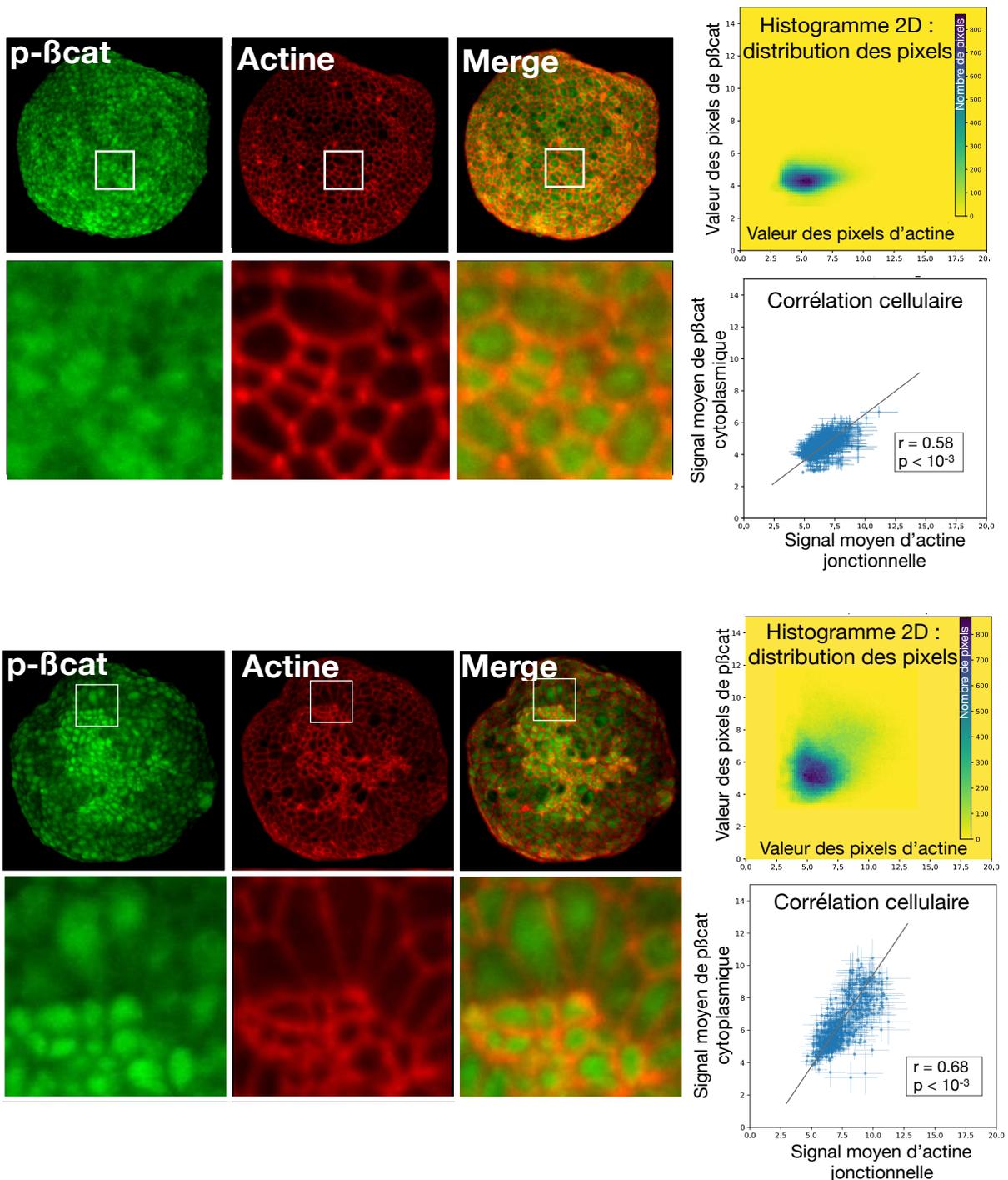


Fig. III.3 *Corrélation cellulaire des signaux de p-βcat et d'actine*

Les signaux d'actine et de p-cat sont complémentaires pixels par pixel mais corrélés cellulièrement.

Pour chacun des embryons représentés, l'histogramme 2D montre la distribution de la valeur des pixels, en actine et en p-βcat. Les valeurs sont normalisées par le fond de l'image, les pixels du fond ne sont pas représentés sur le graphique grâce au filtre Otsu.

Le second graphique montre le signal de la p-βcat cellulaire en fonction de l'actine jonctionnelle, moyenné pour chaque cellule (chaque point bleu représente une cellule). Pour plus de détail, cf. Fig.II.7). Le coefficient de Paerson et la p-value associée à ce coefficient sont représentés sur le graphe.

Grâce au programme que nous avons développé, nous pouvons étudier en détail la relation entre l'actine et la p- β cat. L'algorithme utilisé est l'algorithme 3, décrit en Part.II.2.5. La squelettisation, nous permet d'isoler les jonctions cellulaires du reste du signal, et la segmentation permet d'identifier les cellules une par une et ainsi de mettre en relation, pour chacune d'entre elles, leur signal jonctionnel et cytoplasmique.

Nous avons tracé quelques graphiques du signal moyen de p- β cat intra-cellulaire en fonction du signal moyen d'actine jonctionnelle de chaque cellule (cf. Fig.III.3) et observé quasi systématiquement une relation linéaire entre ces deux variables.

Afin de valider cette observation à plus grande échelle, nous avons généré pour chaque embryon le coefficient de Pearson et sa p-value associée avec pour variable la p- β cat intra-cellulaire et l'actine jonctionnelle de chaque cellule. Le coefficient de Pearson est compris entre -1 et +1. Une valeur proche de $|1|$ indique une très bonne corrélation linéaire, peu bruitée, tandis qu'une valeur proche de 0 indique l'absence de corrélation monotonique entre les deux variables testées. La p-value est la probabilité d'observer une telle distribution en l'absence de corrélation. Plus la p-value sera petite, et plus nous pouvons avoir confiance dans l'existence d'une corrélation.

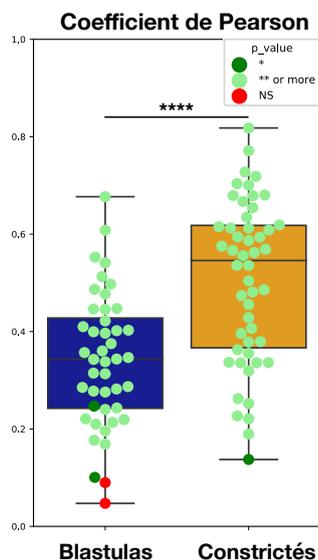


Figure III.4 – Coefficient de Pearson entre les signaux de p- β cat cellulaire et d'actine jonctionnelle

Les couleurs correspondent à la p-value du coefficient de Pearson, indiquant la probabilité d'observer cette distribution si les deux variables ne sont pas corrélées (null hypothesis). La corrélation entre la p- β cat cellulaire et l'actine jonctionnelle est validée.

Ainsi, par exemple, un coefficient de Pearson $r=0.254$ associé à une p-value $p < 10^{-3}$ indique une corrélation linéaire très probable (ou plus précisément que la probabilité d'observer une telle distribution sans corrélation est inférieure à 10^{-3}) mais aussi assez bruitée et dispersée autour de la droite de corrélation.

La Fig.III.1.1.2 indique les coefficients de Pearson testant la relation de corrélation entre la p- β cat cellulaire et l'actine jonctionnelle pour des embryons WT avant l'invagination. Ces embryons sont séparés en deux conditions : les blastulas (box bleu) et les constrictés (box jaune). Les couleurs des points correspondent aux p-value de la corrélation. Pour grande la majorité des embryons (89/94), les p-values du coefficient de Pearson sont inférieures à 10^{-2} , nous permettant de valider la corrélation entre les deux variables. On peut également observer que les coefficients sont en moyenne plus élevés chez les constrictés montrant que la cohérence entre les deux signaux est plus fortes (ie. les points sont moins dispersés autour de la droite de corrélation).

Ainsi, nous avons déjà observé que la constriction apicale des cellules du domaine central coïncide avec un recrutement important de la p- β cat montrant déjà une certaine cohérence entre les deux signaux dans les cellules du domaine central. Ici, nous généralisons ce résultat : l'actine jonctionnelle et la p- β cat cellulaire sont corrélées dans toutes les cellules de l'embryon pendant la blastula et le début de l'invagination. A ce stade, nous pouvons parler de corrélation, mais nous ne pouvons pas nous prononcer sur les rapports de causalité entre l'actine et la p- β cat.

III.1.1.3 La transition Blastula/Constriction : Etude du recrutement de la p- β cat en début de gastrulation

Nous venons de montrer que les signaux d'actine jonctionnelle et de p- β cat cytoplasmique sont corrélés de manière cellulaire. Or nous avons également constaté que la gastrulation commence par le recrutement de l'actine permettant de restreindre les cellules du domaine central. Logiquement, et nous l'avons confirmé par l'observation, la β cat est fortement phosphorylée dans ces mêmes cellules.

Nous avons voulu quantifier l'augmentation de la p- β cat dans les cellules du domaine central lors du début de la gastrulation.

La Fig.III.5 comporte trois façon d'analyser la différence d'intensité de p- β cat entre les embryons blastulas et constrictés.

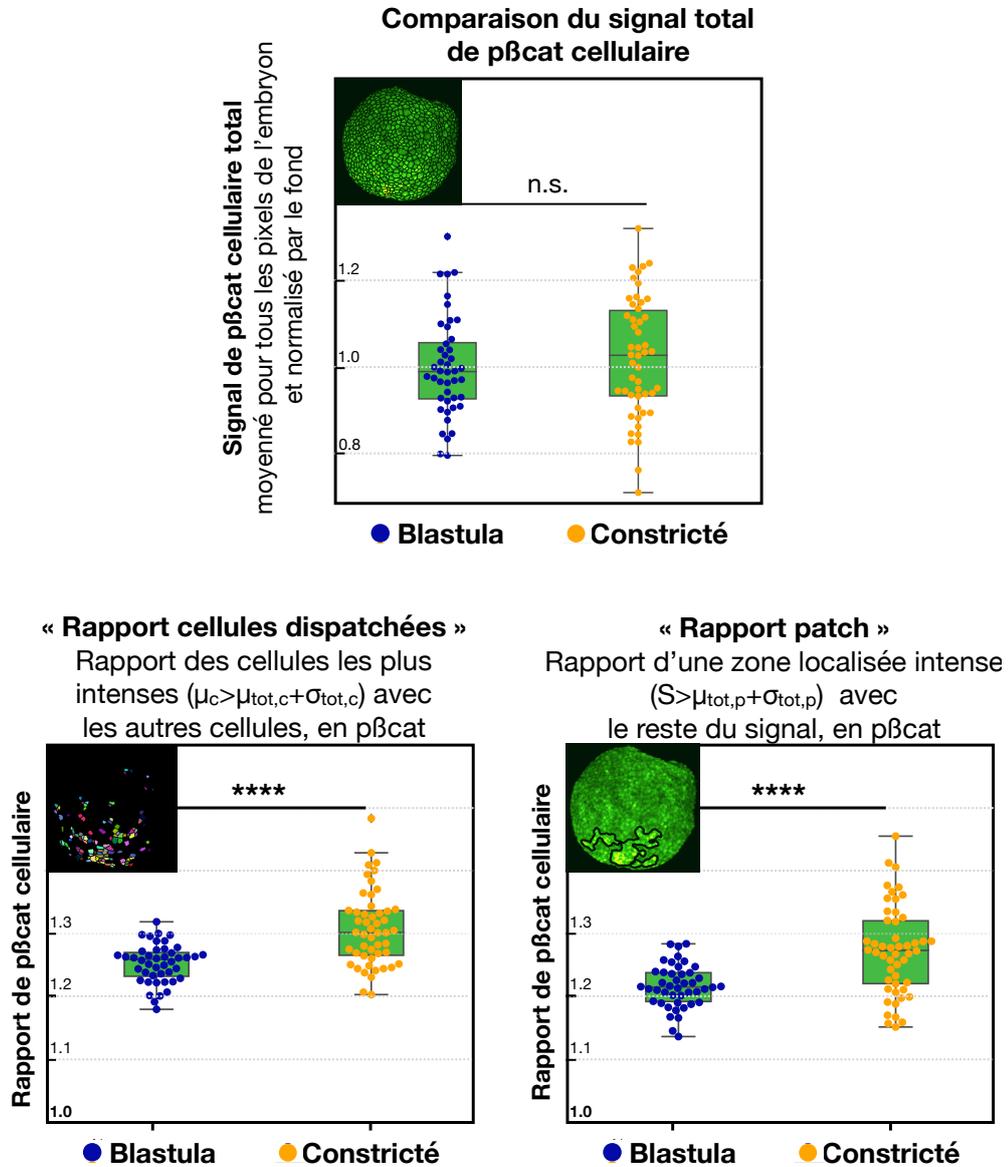


Fig. III.5 *Comparaison du signal p- β cat des blastulas et des constrictés*

A gauche, le signal global de p- β cat moyenné sur tout l'embryon (sans les jonctions) normalisé par rapport aux blastulas.

Au centre, le rapport des cellules les plus intenses avec les autres cellules. Les cellules intenses sont celles dont le signal moyen (μ_c) est supérieur au signal moyen de toutes les cellules de l'embryon ($\mu_{tot,c}$) de un sigma : $\mu_c > \mu_{tot,c} + \sigma_{tot,c}$.

A droite, le rapport d'une zone localisée intense par rapport au reste du signal de l'embryon. La zone sélectionnée est composée de pixels dont la valeur S est supérieure à la moyenne de tous les pixels de l'embryon ($\mu_{tot,p}$) de un sigma sur l'embryon lissé : $S > \mu_{tot,p} + \sigma_{tot,p}$.

Le premier diagramme reporte le signal cellulaire moyen de la p- β cat. Les pixels appartenant aux cellules (sans les jonctions) sont moyennés, puis normalisés par le fond de l'image. Pour plus de lisibilité, sur le graphe, ces mesures sont renormalisées par rapport aux embryons blastula (Part.II.2.5, Algorithme 1).

De manière surprenante, il n'y a pas de différence significative entre les embryons blastulas et constrictés quant au signal global en p- β cat.

Sur le deuxième graphique, nous nous intéressons à l'étendue de la distribution. Pour cela, nous appliquons l'algorithme 2 (Part.II.2.5). Nous sélectionnons les cellules les plus intenses en p- β cat, c'est à dire toutes celles dont le signal cellulaire moyen est supérieur de un sigma (écart type) au signal moyen des toutes les cellules. Nous pouvons ensuite faire le rapport du signal moyen de ces cellules sélectionnées par rapport aux cellules en dehors de la sélection.

En comparaison aux embryons blastulas, ce rapport est plus élevé de 5% chez les embryons constrictés. Cette augmentation est faible mais significative : p-value < 10^{-3} .

Enfin, nous avons analysé la répartition spatiale du signal en appliquant la méthode décrite en Part.II.2.5, Algorithme 2bis. Cette technique nous permet de sélectionner une zone continue forte en signal. Ensuite, nous pouvons faire le rapport entre le signal moyen de p- β cat cellulaire, dans cette sélection et en dehors. Nous imposons ainsi une condition spatiale : les cellules sélectionnées sont limitrophes et ne peuvent pas être dispersées dans l'embryon.

Ces résultats suggèrent que la β cat est déjà phosphorylée au stade blastula dans certaines cellules de l'embryon, de manière possiblement aléatoire car on ne retrouve pas de motif particulier à part une corrélation avec le signal d'actine. Avec la constriction apicale, le niveau moyen est inchangé mais la disparité du signal (le rapport) augmente.

Cela peut être expliqué de deux manières. L'augmentation de l'intensité des cellules constrictées pourrait être associée à la diminution symétrique de l'intensité de cellules non constrictées, expliquant l'invariance du signal moyen et l'augmentation du ratio.

Il est aussi envisageable que l'augmentation de 5 à 10% de l'intensité de seulement 15% des cellules (la constriction) de l'embryon ne joue qu'un rôle mineur dans la moyenne du signal global de l'embryon. Dans ces conditions, pour pouvoir observer une différence statistique, il faudrait probablement augmenter le nombre

d'observations car nos distributions sont très étalées.

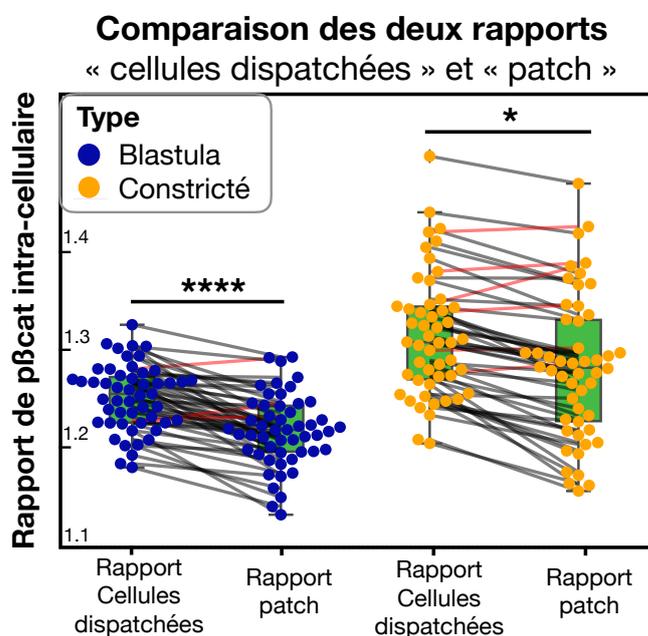


Figure III.6 – Comparaison de l'imposition d'une condition spatiale à la sélection du signal le plus intense

Les traits montre la différence entre les deux rapport pour une même embryon. Un trait noir indique une diminution du ratio "patch" par rapport au ratio "dispatché" et un trait rouge montre une augmentation. Les étoiles (p-value) témoignent seulement de la différence entre les résultats "dispatchés" vs "patch" mais quand on regarde la baisse individuelle de chaque embryon, elle n'est pas plus grande chez les blastulas que chez les constrictés (la moyenne des pentes représentée est la même pour les deux types, avec p-value=0.77).

On peut noter que l'imposition d'une condition spatiale (rapport "patch") sur la sélection du signal le plus fort ne change pas considérablement les résultats par rapport au ratio "cellules dispatchées" (cf. Fig.III.6). La différence semble plus importante à première vue chez les blastulas que chez les constrictés mais une étude plus attentive de la baisse de chaque embryon nous informe qu'il n'y a pas de différence entre les blastulas et les constrictés (baisse de 2,8% chez les blastulas vs baisse de 2,5% chez les constrictés, p-value=0.77). La différence des p-values représentées sur le schéma (>0.0001 et >0.05) est causée par la différence de distribution entre les phénotypes blastulas (très groupés) et constrictés (plus étalés).

Le fait que le ratio baisse de la même manière et très faiblement, lorsqu'on impose une condition spatiale semble indiquer que pour les embryons blastulas comme pour les constrictés, les cellules intenses en p- β cat ont tendance à être groupées.

Ainsi, nous avons mis en évidence que lors de la constriction apicale, un signal fort en p- β cat est concentré dans les cellules du domaine central. L'augmentation du signal dans ces cellules est modeste, entre 5 et 10% en moyenne donc difficile à dé-

tecter dans des analyses globales. Cependant, comme nous l'avons vu Part.III.1.1.1, la constriction apicale des cellules et donc la stabilisation de p- β cat dans ces mêmes cellules durent plusieurs heures (depuis le début de la constriction jusqu'au stade mid-gastrula). Il est donc possible que ce signal puisse activer une transcription en aval.

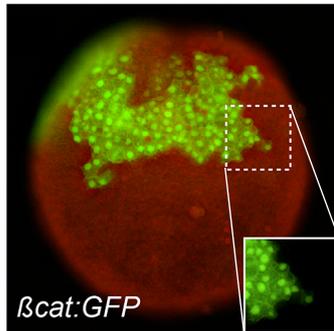
III.1.1.4 Etude de la nucléarisation de la p- β cat

Dans l'hypothèse que nous voulons vérifier, la β cat est phosphorylée et relarguée dans le cytoplasme, puis transloque dans le noyau en tant que cofacteur de transcription. Nous avons voulu vérifier si la p- β cat était effectivement nucléarisée. Il est important de noter qu'il est possible que la p- β cat soit dé-phosphorylée une fois dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau comme cela semble être le cas dans les cellules de la marge lors de l'épibolie du poisson-zèbre (Brunet et al., 2013).

Pendant la blastula, le signal de p- β cat est relativement homogène dans le cytoplasme cellulaire. On ne voit ni de tâche brillante (comme sur l'exemple Fig.III.7.1) ni de tâche plus sombre, qui pourrait indiquer que le signal est fortement concentré dans le noyau ou au contraire, peu présent. On peut en déduire que la concentration de p- β cat est la même dans le cytoplasme et dans le noyau. Avec les coupes transversales, on peut observer qu'en effet, le signal Dapi et le signal p- β cat semblent colocaliser par endroits. Ces régions apparaissent en jaune dans la coupe transversale de la Fig.III.7.3.

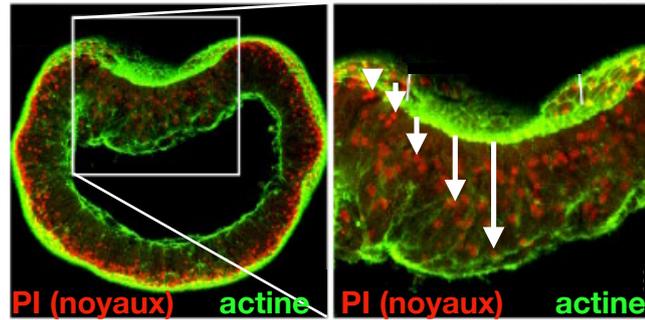
Une telle distribution de la β cat, homogène dans le cytoplasme et le noyau, a été observée dans d'autres espèces comme la drosophile ou la souris, respectivement Peifer and Wieschaus (1990) et Fernández-Sánchez et al. (2015).

Pour les embryons constrictés, regarder la colocalisation des signaux dans la zone de constriction s'est avéré plus difficile que prévu. En effet, le signal DAPI des noyaux est beaucoup faible pour les cellules constrictées que pour les autres. *A priori*, nous ne savons pas si cet effet est lié à un changement de l'état de la chromatine, un problème optique dû à l'épaisseur des tissus dans cette zone, ou un artefact quelconque. Pour éliminer certaines de ces possibilités, il serait intéressant de marquer les noyaux avec un autre marqueur, comme le Hoechst ou le Propidium Iodide (PI) afin de tester si cet état est spécifique au marquage DAPI.



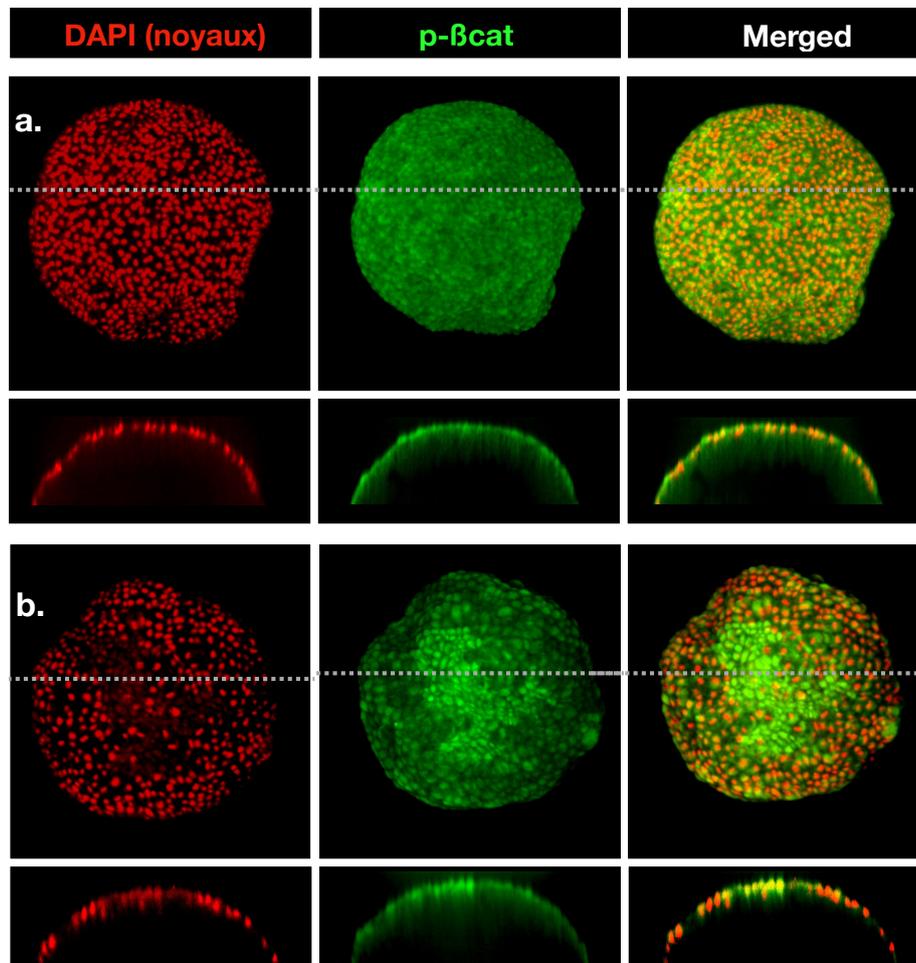
(1) Exemple de signal nucléaire clair : nucléarisation de la β cat dans les cellules orales, stade blastula.

Image issue de [Röttinger et al. \(2012\)](#)



(2) Migration des noyaux des cellules du domaine central vers la partie basale. Attention : les noyaux sont en rouges et l'actine en vert. La longueur des flèches est proportionnelle à l'épaisseur de tissu que doit traverser le laser pour imager le noyau.

Image adaptée de [Botman et al. \(2014\)](#)



(3) Embryon au stade blastula et en constriction : Vue orale et reconstruction latérale selon l'axe de la ligne en pointillé du signal des noyaux (en rouge) et de la p- β cat (en vert).

Fig. III.7 *Etude de la nucléarisation de la p- β cat*

Nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle le faible marquage en DAPI des noyaux dans le domaine central était lié à sa profondeur dans la cellule. Lorsque les cellules constrictent apicalement, les noyaux sont comprimés par les tissus environnants et se déplacent en profondeur vers la partie basale de la cellule. Pour imager ce noyau, le laser doit traverser plus de tissu très diffusif et le signal de fluorescence recueilli serait donc moins intense (cf. illustration Fig.III.7.2).

La coupe transversale de l'embryon constricté Fig.III.7.3 illustre le phénomène observé : peu de signal DAPI dans la zone constricté mais un fort signal p- β cat dans ces mêmes cellules. De manière surprenante, les noyaux ne semblent pas encore s'être déplacés vers la partie basale de la cellule dans cette zone, ce qui invalide l'hypothèse de départ.

La raison pour laquelle le signal DAPI est plus faible dans les cellules constrictées est donc toujours inconnue. Nous pouvons cependant noter que c'est un effet extrêmement reproductible.

Pour revenir à la question de base, il semblerait que l'on peut observer un signal p- β cat dans le noyau des cellules constrictées. Cependant, à cause du faible signal DAPI des cellules en phase de constriction apicale, les techniques classiques de colocalisation sont difficiles à appliquer. C'est pourquoi la Fig.III.7 ne représente pas de colocalisation, mais des "merged", c'est à dire les deux images fusionnées.

III.1.1.5 Résumé des résultats obtenus grâce à la caractérisation

1. La phosphorylation Y654 de la β cat ne coïncide pas avec les mouvements macroscopiques de la gastrulation (Part.III.1.1.1).
3. L'actine jonctionnelle et la p- β cat intra-cellulaire sont corrélées linéairement dans toutes les cellules de l'embryon au stade blastula et pendant la gastrulation (Part.III.1.1.2).
2. Au début de la gastrulation, les taux de p- β cat augmentent subtilement ($\sim 5\%$) mais durablement (plusieurs heures) dans les cellules du domaine central au moment de leur constriction apicale (Part.III.1.1.1 et Part.III.1.1.3).

Interprétation :

Ces résultats, issus d'observations et d'analyses plus poussées sont précieux. Ils nous permettent d'invalider notre hypothèse de départ, à savoir que les mouvements morphogénétiques macroscopiques de la gastrulation induisent la phosphorylation de la β cat. En effet, Bien qu'un fort pattern de p- β cat apparaisse au début de la gas-

trulation, celui-ci est visible alors que l'embryon est encore sphérique, et disparaît lorsque la plaque pré-endomésodermale s'enfonce dans le blastopore (les tensions mécaniques devraient être à leur maximum).

Cependant, nous avons également montré que les signaux d'actine jonctionnelle et de p- β cat cellulaire sont corrélés linéairement et positivement.

Une zone riche en actine correspondant souvent à un domaine sous fortes tensions. Il est donc possible que l'actine, qui gouverne le changement de forme des cellules et la dynamique cellulaire en générale, soit responsable des tensions favorisant la phosphorylation de la β caténine, avant même que les changements morphologiques macroscopiques qui en découlent ne soient visibles.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place différentes expériences. Dans un premier temps, nous avons voulu tester le rôle de l'actine dans la phosphorylation de la p- β cat. Pour cela, nous avons inhibé la transcription de la protéine *Stbm* connue pour orchestrer le recrutement de l'actine et donc la constriction apicale au début de la gastrulation de l'embryon de *Nematostella vectensis* (Kumburegama et al., 2011). Nous avons ensuite rétabli les contraintes mécaniques par une simple déformation uni-axiale de l'embryon.

III.1.2 Blocage et restauration des forces mécaniques par injection du morpholino de Strabismus

III.1.2.1 Blocage de la gastrulation par injection de StbmMO

- Contexte et objectifs de l'expérience

Afin de déterminer les relations causales entre les forces mécaniques de la gastrulation, la p- β cat et l'actine, nous avons injecté le morpholino de Strabismus. Pour rappel, ce morpholino empêche la traduction de la protéine Strabismus responsable des constriction apicales des cellules déclenchant l'invagination Kumburegama et al. (2011). En bloquant la traduction de cette protéine, nous avons pour objectif de bloquer la constriction apicale et ainsi empêcher la gastrulation. Grâce aux immunomarquages, nous pouvons ainsi déterminer l'influence des contraintes mécaniques de l'invagination sur la phosphorylation de la β caténine.

Pour une description des injections, se référer Part.II.1.2. En bref, la concentration utilisée est de $900\mu\text{M}$ en morpholinos et 1x de rhodamine-dextran pour la fluorescence. Un morpholino contrôle (CtrlMO) est toujours injecté en parallèle des StbmMO afin de pouvoir surveiller le stade de développement des embryons. Lorsque les CtrlMO commencent à gastruler, les embryons sont fixés.

Il est important de noter que la constriction apicale n'est visible qu'après les immunomarquages, sous microscope à fluorescence. Pendant l'expérience, la loupe binoculaire ne nous permet pas de distinguer ces cellules et nous ne pouvons discriminer que deux phénotypes morphologiques : les invaginés et les non-invaginés. L'heure de fixation a donc été choisie en fonction du nombre d'embryons au stade mid-gastrula (bien visibles à la loupe binoculaire) chez les CtrlMO et les StbmMO. Nous visons la fenêtre de temps où le pourcentage d'embryons invaginés est grand chez les CtrlMO et non nul chez les StbmMO. En effet, cela nous permet de nous assurer que le timing est correct : les StbmMO sont au stade où ils devraient invaginer comme en témoignent ceux pour lesquels l'injection n'a pas eu d'effet. Les voies biochimiques de la gastrulation indépendantes de *Stbm* sont alors normalement en place et prêtes à être potentiellement activées par les contraintes mécaniques.

Après les immunomarquages, on peut classer les embryons selon trois catégories :

- ceux n'ayant commencé aucun mouvement d'invagination -similaires stade blastula en phénotype mais théoriquement similaires au stade early-gastrula génétiquement- que nous appelons **les non-invaginés**
- ceux qui présentent une constriction apicale des cellules, **les constrictés**
- et ceux dont la plaque pré-endomésodermale a commencé à s'enfoncer dans le blastocèle : **les invaginés**.

Les embryons sont classés selon ces trois phénotypes, puis analysés avec le programme décrit Part.II.2.5 (Algorithme 1). Rapidement, on effectue une projection 5-max des images 491 (p- β cat) et 561 (actine), un filtrage otsu, puis la squelettisation. La taille des filaments du squelette est de cinq pixels de largeur, et le seuil de détection des points critiques a été ajusté à la main pour chaque embryon.

Nous sélectionnons pour l'analyse comparative les pixels de l'actine jonctionnelle et de la p- β cat cytoplasmique que nous moyennons pour chacun des embryons.

● Résultats

→ Influence de *StbmMO* sur le phénotype morphologique des embryons

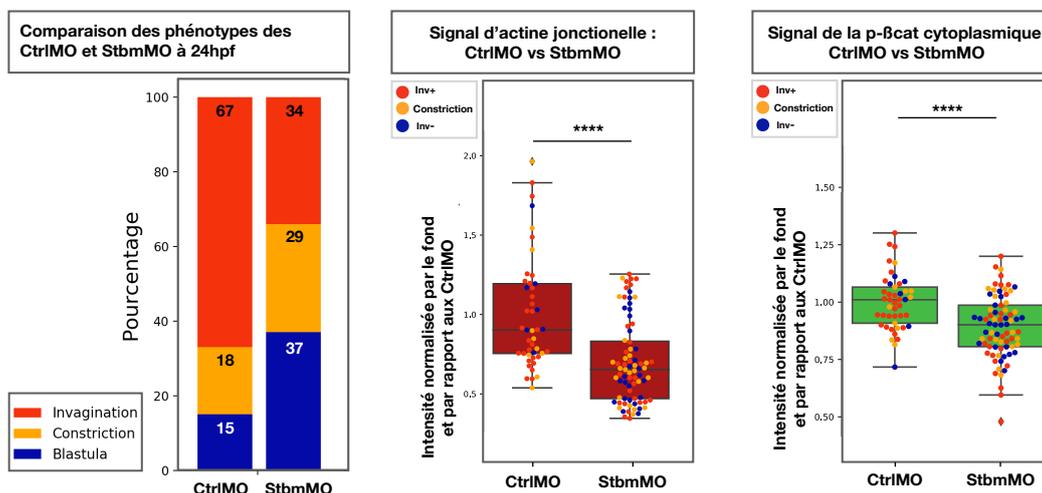


Fig. III.8 *Effet des injections StbmMO sur les phénotypes des embryons, le niveau d'actine et de p-βcat* A gauche, la répartition en pourcentage des trois phénotypes observés chez les CtrlMO et les StbmMO. Au centre, le niveau d'intensité de l'actine jonctionnelle normalisé par rapport au fond. A droite, le niveau d'intensité de la p-βcat dans les cellules normalisé par rapport au fond. Les résultats sont ensuite reportés normalisés par rapport à la moyenne des embryons CtrlMO. Chaque point correspond à un embryon ; le code couleur représente le phénotype de l'embryon : les invaginés sont en orange, ceux présentant une constriction apicale en jaune et les non invaginés sont en bleu. Les étoiles correspondent aux p-values obtenues par le test bilatéral de Mann Whitney. Les points en forme de losange sont considérés par l'algorithme du boxplot comme des aberrations statistiques mais ils restent comptés dans les calculs statistiques comme la moyenne ou l'écart type.

Sur le diagramme en barres de la Fig.III.8, sont décomptés les trois phénotypes que l'on retrouve chez les CtrlMO et les StbmMO à 24hpf.

Au moment de la fixation, 67% d'embryons CtrlMO invaginent contre 34% seulement chez les StbmMO. Cette diminution est significative, (p-value = 0.0002, test exact de Fisher), donc l'objectif premier de l'injection est atteint. Cependant, les proportions d'embryons non-invaginés et d'embryons constrictés, quant à elles augmentent, mais, chacune prise individuellement, de manière non significative (p-value > 0.05, test de Fisher).

→ Influence de StbmMO sur la p- β cat et l'actine

Sur les boxplots de la Fig.III.8, figurent respectivement en rouge le niveau d'actine moyen des jonctions cellulaires et en vert celui de p- β cat moyen des cellules des embryons StbmMO par rapport aux CtrlMO. Les valeurs d'intensité sont normalisées par le fond de l'image.

Les différents phénotypes sont symbolisés par le même code couleur que précédemment : les blastulas sont en bleu, les constrictés en jaune et les invaginés en orange. Comme nous l'avons déjà vu Part.III.1.1.3, le phénotype morphologique des embryons n'a pas d'influence sur les signaux globaux de p- β cat par rapport à la condition (CtrlMO et StbmMO). Nous pouvons voir ici que c'est également le cas en actine. C'est pourquoi les embryons sont divisés par condition et non par phénotype morphologique.

En comparant les niveaux d'intensité des CtrlMO et des StbmMO, on observe une baisse significative à la fois pour la p- β cat cellulaire et pour l'actine jonctionnelle (p-value < 0.0001, Mann Whitney bilatéral).

● Discussion des résultats

→ Influence de StbmMO sur le phénotype morphologique

L'injection de StbmMO est partiellement efficace en terme d'inhibition de la gastrulation. Elle permet de réduire de moitié le nombre d'embryons qui gastrulent (de 67% à 33%) et ce, significativement (p-value = 0.0002, test de Fisher) mais la proportion d'embryons constrictés augmente légèrement (n.s.). On peut supposer que l'injection du morpholino de *Stbm* diminue les contraintes mécaniques chez tous les embryons sans les bloquer totalement, ce qui entraîne un transfert du groupe des embryons invaginés vers celui des embryons constrictés, et du groupe des constrictés vers les non invaginés. En effet, la proportion de non-invaginés chez les StbmMO est égale à la somme chez les CtrlMO des non-invaginés et des constrictés.

Ce résultat est surprenant car *Stbm* est décrit comme responsable du recrutement de l'actine permettant la constriction apicale des cellules de la plaque pré endomésodermale chez *Nematostella vectensis*. Dans l'article [Kumburegama et al. \(2011\)](#), les injections de StbmMO permettent d'inhiber la gastrulation à 90% contre seulement 37% dans nos mains. Nous pouvons en partie expliquer cette différence par le fait que ces résultats peuvent varier d'un expérimentateur à l'autre. Cependant il est important de noter que cet article ne fait jamais allusion au pattern

de constriction apicale. Il se trouve que ce phénotype n'est pas visible à la loupe binoculaire : l'embryon constricté a une forme sphérique. Si nous considérons ce phénotype comme un phénotype "non-invaginé", alors nos résultats se rapprochent de ceux de l'article, avec 66% d'embryons non-invaginés (jaune et bleu).

Nous avons vu Part.I.3.2.1 que la constriction apicale des cellules du domaine central n'est pas le seul processus responsable de l'invagination des tissus. La diminution de l'adhésion basale des cellules du domaine central joue probablement un rôle important dans l'initiation du flambage des tissus. Dans la simulation de Tamulonis et al. (2011), la diminution de la constriction apicale sans modification des autres paramètres (en particulier la diminution de l'adhésion basales des cellules) permet au mieux de bloquer la gastrulation à son commencement mais pas totalement car l'initiation du flambage des tissus n'est pas bloquée.

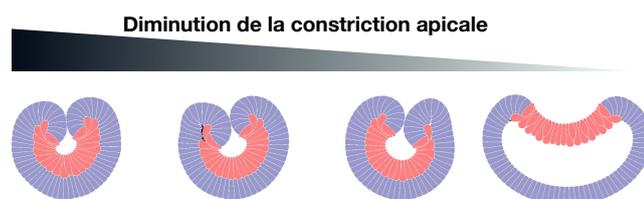


Fig. III.9 **Diminution progressive de la constriction apicale dans la simulation Tamulonis et al. (2011)**

La seule diminution de la constriction apicale ne permet pas de bloquer le flambage des tissus, qui est, dans la simulation, généré également par la perte d'adhésion basale des cellules du domaine central.

Il existe une instabilité : la diminution progressive de la constriction apicale montre qu'il existe une valeur seuil en-dessous de laquelle la gastrulation n'est pas possible dans la simulation sans modification des autres paramètres.

Adapté de Tamulonis et al. (2011)

→ Influence de StbmMO sur la p- β cat et l'actine

Sur les boxplots de la Fig.III.8, on peut, en premier lieu, noter l'étendue de la distribution pour chaque condition. Devant des mesures d'intensité si disparates pour une même condition, il est nécessaire d'avoir un grand nombre d'embryons pour faire des comparaisons.

La comparaison du niveau d'actine dans les jonctions des embryons StmMO par rapport au niveau des CtrlMO nous permet tout d'abord de vérifier que le

morpholino de *Stbm* est efficace car il agit sur le recrutement de l'actine. Ainsi, il est intéressant de voir que le niveau d'actine est significativement plus bas chez les *Stbm*MO de 30% même si l'on peut voir que beaucoup d'embryons sont au même niveau que les contrôles. Cependant, l'injection est assez efficace pour que l'on puisse observer une diminution nette de la concentration jonctionnelle de l'actine de manière statistique. Nos résultats montrent donc la forte influence de *Stbm* sur l'actine, pas seulement pour la constriction apicale mais *a priori* pour tous les embryons.

Comme nous l'avons déjà vu pour la p- β cat, le signal global est indépendant du phénotype de l'embryon. Cela est de nouveau confirmé par cette expérience : on peut observer que les trois couleurs de points (ie. les trois phénotypes) sont réparties de manière aléatoire. Ces résultats sont visibles en actine également. Cela justifie la représentation par condition et non par phénotype morphologique.

Sous injection de *Stbm*MO, la baisse observée du niveau global de p- β cat cytoplasmique est aussi indépendante du phénotype morphologique. Cette baisse, pourtant induite par l'inhibition de *Stbm* n'est donc, *a priori*, pas due aux changements phénotypiques. En rapprochant ces résultats avec la corrélation que nous avons observé avec l'actine, nous supposons que la baisse de phosphorylation de la β cat est plutôt liée à la baisse du niveau d'actine.

Chez les embryons *Stbm*⁽⁻⁾, le signal de la p- β cat diminue de 10% en moyenne (p-value < 0.0001, Mann Whitney bilatéral). On peut noter que chez le poisson zèbre, [Brunet et al. \(2013\)](#) ont montré que l'augmentation de la phosphorylation de la β cat en réponse aux mouvements d'épibolie était de l'ordre de 15 à 20% et que cela suffit pour activer l'expression des gènes cibles de la β cat. Il est donc très intéressant d'observer une diminution de 10% de la phosphorylation de la β cat lorsqu'on inhibe partiellement les contraintes mécaniques.

Pour définitivement conclure sur la mécanosensibilité de la p- β cat, nous devons d'abord restaurer les contraintes mécaniques et observer une restitution du niveau de phosphorylation. En effet, l'inhibition observée de la p- β cat sous injection de *Stbm*MO pourrait être liée à l'inhibition de *Stbm* de manière génétique. Il est possible que *Stbm* soit requis dans une voie déclenchant la phosphorylation de la β cat de manière biochimique et seule une restauration mécanique validera ou non notre hypothèse.

Dans ce but, nous avons effectué une restauration des contraintes mécaniques.

III.1.2.2 Restitution des forces mécaniques par compression globale uniaxiale

- **Contexte et objectifs de l'expérience**

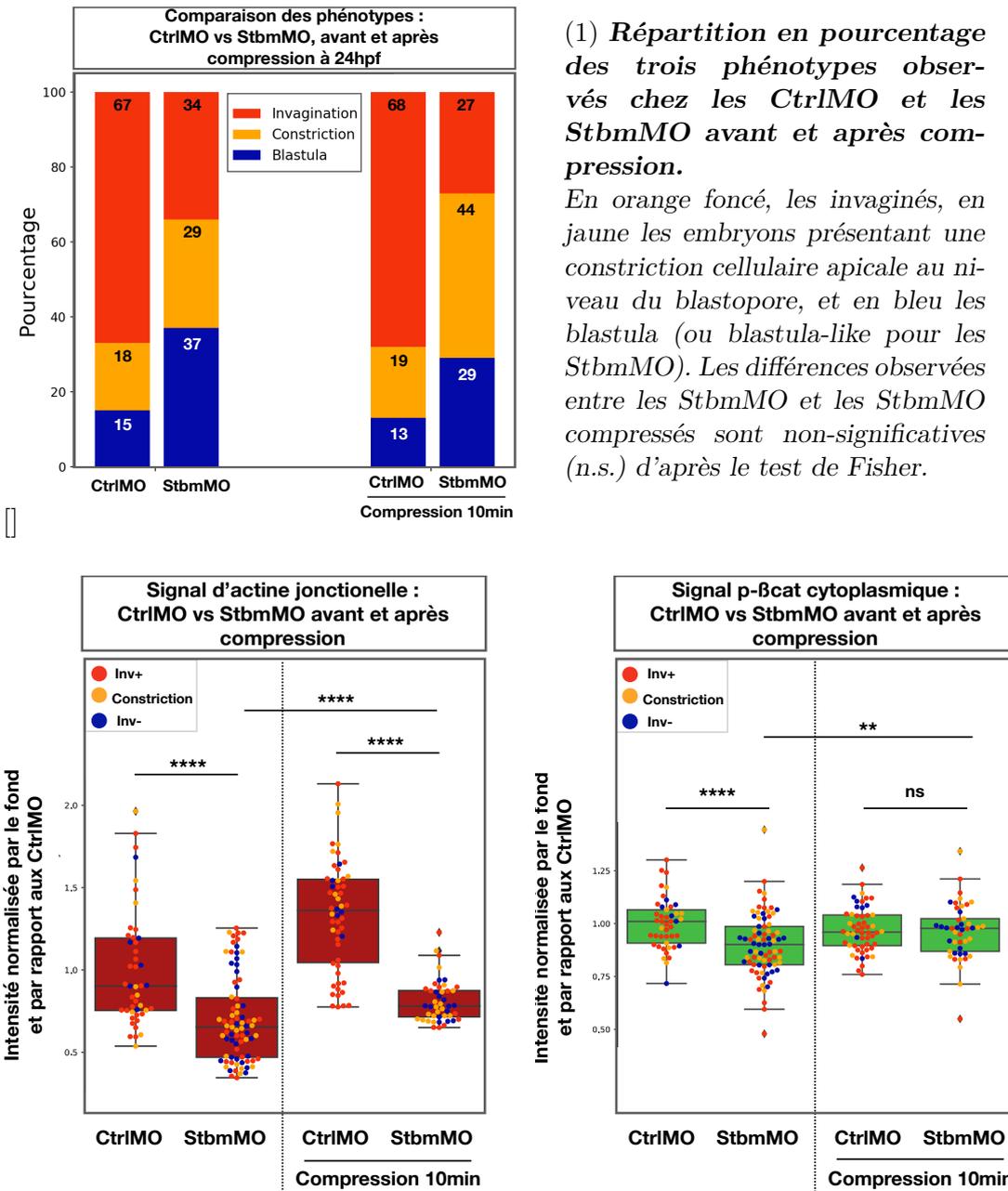
Ici, nous testons la mécanosensibilité de la p- β cat.

Nous avons montré que la phosphorylation de la β cat diminue sous injection de StbmMO. Nous voulons donc tester si Stbm est requis dans une voie de régulation biochimique nécessaire à la phosphorylation de la β cat au moment de la gastrulation. Si tel est le cas, une restauration des contraintes mécanique n'aurait pas d'impact sur les taux de p- β cat. Si au contraire, nous observons une restauration des taux de p- β cat après l'application de contraintes mécaniques chez les embryons StbmMO, alors nous pouvons affirmer que c'est la diminution des contraintes mécaniques qui est à l'origine de la baisse des taux de phosphorylation de la β cat observée.

Nous avons donc comprimé de manière globale et uniaxiale les embryons StbmMO et CtrlMO entre lame et lamelle (cf. Part.II.2). Au même stade que les expériences précédentes, c'est à dire au stade où une majorité d'embryons CtrlMO ont déjà commencé à gastruler, une compression de dix minutes est effectuée sur un lot d'embryons CtrlMO et un lot d'embryons StbmMO. La lame sur laquelle repose les embryons, et la lamelle permettant d'effectuer la compression sont séparées de $150\mu\text{m}$. Au bout de dix minutes, les embryons sont récupérés. Il sont ensuite fixés, marqués, imagés et analysés comme décrit précédemment (Part.III.1.2.1, Part.II.2.5, Algorithme 1).

- **Résultats**

La Fig.III.10 récapitule les résultats déjà présentés dans la section précédente (Part.III.1.2.1), à savoir l'influence de l'injection du morpholino de Stbm sur le phénotype des embryons, le réseau d'actine et la phosphorylation de la β cat, et nous montre également ces mêmes données après compression globale uniaxiale de dix minutes.



(1) Répartition en pourcentage des trois phénotypes observés chez les CtrlMO et les StbmMO avant et après compression.

En orange foncé, les invaginés, en jaune les embryons présentant une constriction cellulaire apicale au niveau du blastopore, et en bleu les blastula (ou blastula-like pour les StbmMO). Les différences observées entre les StbmMO et les CtrlMO compressés sont non-significatives (n.s.) d'après le test de Fisher.

(2) Niveaux d'intensité de l'actine jonctionnelle et de la p-βcat cytoplasmique, normalisés par rapport aux CtrlMO, pour les quatre conditions (CtrlMO, StbmMO, CtrlMO comprimés, et StbmMO comprimés). Chaque point correspond à un embryon. Le code couleur représente le phénotype de l'embryon est le même que celui de figure (1). Les mesures d'intensité sont normalisées par le fond, puis normalisées par rapport à la moyenne des CtrlMO. Les étoiles représentent les p-values obtenues avec le test de Mann Whitney.

Fig. III.10 Compression des StbmMO : effet sur le phénotype, le niveau d'intensité de l'actine et de la p-βcat

Sur le diagramme en barres figure la répartition des trois phénotypes embryonnaires en fonction du morpholino injecté et de la compression. On peut y voir que la compression mécanique n'a pas d'influence sur le phénotype des embryons CtrlMO. En effet, les rapports entre les trois phénotypes sont les mêmes. Lorsque l'on compare les StbmMO avant et après compression, on peut observer une diminution des non-invaginés et des invaginés au profit des constrictés. Nous ne pouvons parler ici que de tendance car les p-values ne sont pas significatives à 0,05. La compression mécanique ne semble donc pas avoir d'effet important sur le phénotype morphologique des StbmMO.

L'application de contraintes externes a pour effet de restaurer en partie la densité du réseau d'actine jonctionnelle. En effet, le niveau d'actine jonctionnelle chez les StbmMO comprimés est plus élevé en moyenne que celui des StbmMO témoins (p-value < 0.0001, Mann Whitney) sans néanmoins atteindre le niveau des CtrlMO (p-value < 0.01, non représentée sur la figure). La compression permet aussi de renforcer le réseau d'actine jonctionnelle chez les CtrlMO. Nous observons une augmentation de plus de 25% du niveau global par rapport aux CtrlMO non comprimés.

Les niveaux moyens de la β cat phosphorylée des embryons CtrlMO-témoins, des embryons CtrlMO-comprimés et des embryons StbmMO-comprimés sont équivalents (p-value ≈ 1 , Mann Whitney, bilatéral). Cela suggère d'une part qu'on ne peut pas augmenter les taux de phosphorylation de la β cat des embryons CtrlMO par compression mécanique (probablement car ces taux sont déjà à leur maximum) mais aussi que les contraintes mécaniques extérieures ont pour effet de stimuler la phosphorylation de la β cat lorsqu'elle a été inhibée préalablement (injection de StbmMO).

Ainsi la phosphorylation de la β cat et la densification du réseau d'actine sont mécanosensibles lors de la gastrulation de *Nematostella vectensis*.

- **Discussion des résultats**

Bien que les contraintes mécaniques aient un effet de restauration à la fois pour l'actine et la p- β cat, la réponse de ces deux protéines diffère sur plusieurs points.

Les compressions permettent de rétablir totalement le niveau de p- β cat chez les embryons StbmMO. Nous pouvons ainsi valider la mécanosensibilité de la phospho-

rylation de la β cat lors de la gastrulation de *Nematostella vectensis*.

En revanche, les compressions n'ont aucun impact sur les taux de p- β cat chez les embryons CtrlMO, suggérant que la p- β cat atteint un plafond au delà duquel les contraintes mécaniques n'ont plus d'influence. Il est possible qu'un mécanisme de préservation de l'intégrité des tissus soit à l'œuvre, permettant de conserver un certain pourcentage de β cat non phosphorylée dans les jonctions cellulaires, donc, *a priori* non relarguée dans le cytoplasme.

La phosphorylation de la β cat est donc mécanosensible car restaurée chez les embryons StbmMO à des taux similaires à ceux des contrôles sous compression mécanique. Cependant, nous ne pouvons savoir si la restitution des niveaux de p- β cat est due au renforcement mécaniquement induit du réseau d'actine ou si les contraintes mécaniques externes (la compression) ont directement opéré dans cette restauration. Il est possible, en effet, que la déformation des membranes cellulaires permettent directement à la β cat d'être phosphorylée et relarguée dans le cytoplasme sans que le renforcement du réseau d'actine ne soit impliqué. Pour déterminer le rôle de l'acto-myosine dans ce processus, nous pourrions faire subir des compressions à des StbmMO dont le réseau d'acto-myosine a été inhibé par une drogue (ex. ML-7, Y-27632, blebbistatin, etc.).

Bien que la densification du réseau d'actine soit mécanosensible, la réponse de cette protéine face aux compressions mécaniques externes est différente de celle de la p- β cat. Les compressions permettent de densifier plus encore le réseau d'actine chez les embryons CtrlMO, alors qu'elles ne permettent pas de restaurer totalement le niveau d'actine chez les embryons StbmMO. L'actine répond donc de manière sensible aux contraintes mécaniques, que ce soit pour les embryons contrôles ou Stbm⁽⁻⁾ sans que l'on atteigne de seuil comme observé en p- β cat.

Pour mieux caractériser la réponse de l'actine aux contraintes mécaniques, nous pourrions faire varier le temps de compression, la force appliquée, ou tenter d'orienter les embryons. En effet, peut-être ne sommes nous pas en mesure d'observer la pleine possibilité de réponse mécanosensible de l'actine en raison du protocole expérimental.

Ces manipulations nous aideraient probablement aussi à comprendre si l'absence de changement morphologique après compression chez les embryons StbmMO malgré le renforcement observé de l'actine est liée au fait que cette restitution soit seulement partielle, ou, si l'inhibition de Strabismus rend tout changement phénoty-

pique impossible. En effet, Stbm pourrait être nécessaire dans une voie biochimique permettant le flambage, comme par exemple la convergence-extension, que nous ne pouvons restaurer par simple compression mécanique. Afin de tester le rôle de Stbm, nous avons compressé des embryons sauvages (WT) au stade blastula/constriction apicale (cf. Part.III.1.3) et étudié la répartition des phénotypes des embryons avant et après compression.

III.1.2.3 Résumé des résultats obtenus grâce aux injections de StbmMO et aux compressions mécaniques

Grâce aux injections de morpholinos (Part.III.1.2.1), avons montré que :

4. Les injections de StbmMO permettent de réduire de moitié la proportion d'embryons qui invaginent.
5. Sous injection de StbmMO, le signal d'actine diminue.
6. L'inhibition du renforcement du réseau d'actine par injection de StbmMO induit la diminution de la phosphorylation de la β cat .

En réalisant des compressions mécaniques sur les embryons Stbm⁽⁻⁾ (Part.III.1.2.2), nous avons montré que :

7. Les compressions mécaniques sur les embryons StbmMO ne changent pas significativement le phénotype de l'embryon.
8. Les compressions mécaniques induisent le renforcement du cortex d'actine dans tous les embryons (CtrlMO 30% d'augmentation du signal, StbmMO 10% d'augmentation).
9. Les compressions mécaniques et/ou le renforcement du réseau d'actine restaurent les niveaux de p- β cat des embryons StbmMO (mais pas d'augmentation chez les CtrlMO).

Interprétation :

Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la β cat, bien que mécanosensible, n'est pas déclenchée par les mouvements morphogénétiques macroscopiques de la gastrulation mais par la cause même des mouvements morphogénétiques, c'est à dire la densification du réseau d'actine (elle-même mécanosensible) activée par Stbm.

III.1.3 Anticipation des forces mécaniques dans les WT

• Contexte et objectifs de l'expérience

Nous avons vu dans la partie précédente que les compressions mécaniques ne semblent pas avoir d'effet important sur le phénotype morphologique des embryons *Stbm*⁽⁻⁾, bien que les contraintes renforcent le réseau d'actine jonctionnelle, responsable à terme des mouvements morphogénétiques. Il est possible que sans *Stbm*, les contraintes mécaniques exogènes seules ne soient pas suffisantes pour déclencher des mouvements cellulaires actifs (constriction apicale et invagination). C'est cette hypothèse que nous testons ici.

L'expérience effectuée est simple : nous comprimons entre lame et lamelle des embryons WT pendant dix minutes, puis nous marquons par immunofluorescence les protéines d'actine et de β -caténine phosphorylée sur le site Y654. Les embryons choisis sont, autant que possible, au stade blastula. La variabilité de développement entre les embryons est importante et le stade visé pour la compression se trouve juste avant la constriction. Concrètement, cela signifie que certains embryons se contracteront déjà tandis que d'autres seront au stade blastula. Pour savoir si la compression a un effet quelconque sur les embryons, nous comparons la cinquantaine d'embryons comprimés à la cinquantaine d'embryons contrôles. Nous pouvons alors déterminer de manière statistique si le groupe comprimé est différent du groupe contrôle.

• Résultats

Le diagramme de gauche de la Fig.III.11 montre l'effet des compressions sur le phénotype des embryons WT, juste après la compression, une heure et deux heures après.

Nous pouvons d'abord noter que chez les WT non-comprimés, le nombre d'embryons non invaginés diminue au fil du temps, au profit des embryons contractés et invaginés.

Ce résultat, attendu, délivre tout de même deux informations :

- comme nous l'avons déjà observé, la désynchronisation des embryons est importante car on passe de 50% d'embryons blastulas à 25% en deux heures
- la constriction apicale des cellules du domaine central est un processus long, de plusieurs heures, car à 23hpf, on ne dénombre moins de 10% d'embryons dont les tissus ont commencé à invaginer dans le blastocèle.

La compression, cette fois, a un effet sur le phénotype des embryons : le nombre d'embryons non-invaginés diminue et celui des constrictés augmente juste après la compression ainsi que une heure après (p-value < 0.05, test exact de Fisher). Deux heures après, on observe toujours la même tendance mais qui s'estompe cependant (p-value > 0.05).

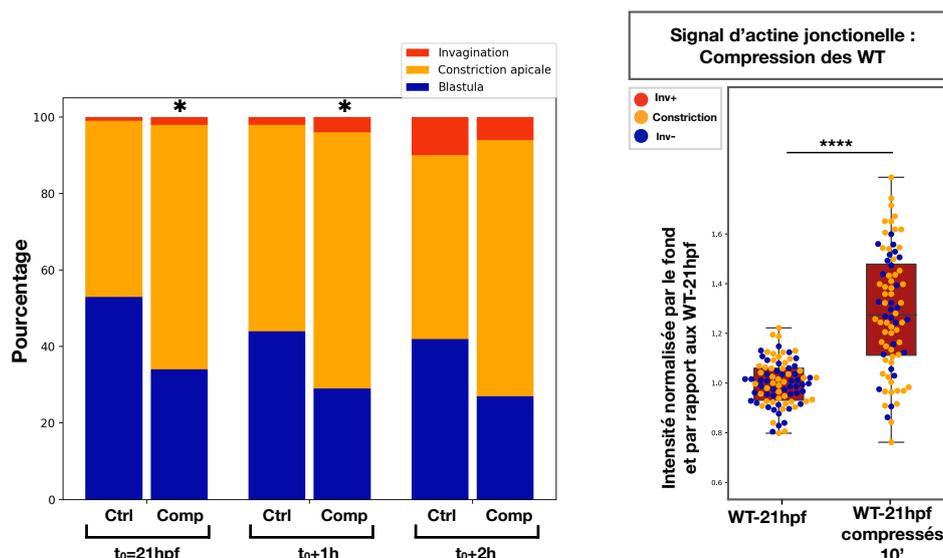


Fig. III.11 **Compression des embryons WT en début de gastrulation. Effets sur le phénotype embryonnaire et l'actine.** A gauche, le pourcentage des phénotypes embryonnaires contrôles (Ctrl) et comprimés 10min (Comp), juste après la compression ($t_0=21\text{hpf}$), une heure après ($t_0+1\text{h}=22\text{hpf}$) et deux heures après ($t_0+2\text{h}=23\text{hpf}$). L'étoile indique p-value < 0.05 avec le test de Fisher. Pour chaque condition, $n>50$. $N=2$

A droite, signaux d'actine jonctionnelle avant et après compressions mécaniques à 21hpf sur des embryons WT. Les deux boxplot correspondent aux embryons des deux premières barres du diagramme de gauche. $N=2$

Les deux distributions de points du diagramme de droite correspondent aux deux premières barres du diagramme de gauche : on y voit d'abord le signal de l'actine jonctionnelle des WT-21hpf puis l'actine jonctionnelle des WT-21hpf comprimés pendant 10minutes comme décrit précédemment (Part.II.1.3.1 et Part.III.1.2). Les analyses ont été faites avec l'Algorithme 1, décrit en Part.II.2.5.

Le signal d'actine augmente significativement de 30% en moyenne (p-value<0.0001) après les compressions indiquant de nouveau la mécanosensibilité du cortex d'actine.

La Fig.III.12 présente les résultats en $p\text{-}\beta\text{cat}$ intra-cellulaire de ces mêmes expériences. Les deux diagrammes représentent deux fois la même expérience mais les résultats n'ont pas été analysés ensemble comme pour le phénotype ou l'actine car les deux expériences ne répondent pas de la même façon. Dans l'Exp.I, on peut voir une augmentation significative ($p\text{-value} < 0,0001$, Mann Whitney, bilatéral) du signal global de $p\text{-}\beta\text{cat}$ intra-cellulaire après les compressions de 10min sur des embryons WT-21hpf alors que dans le second cas, il n'y a aucun changement après les compressions.

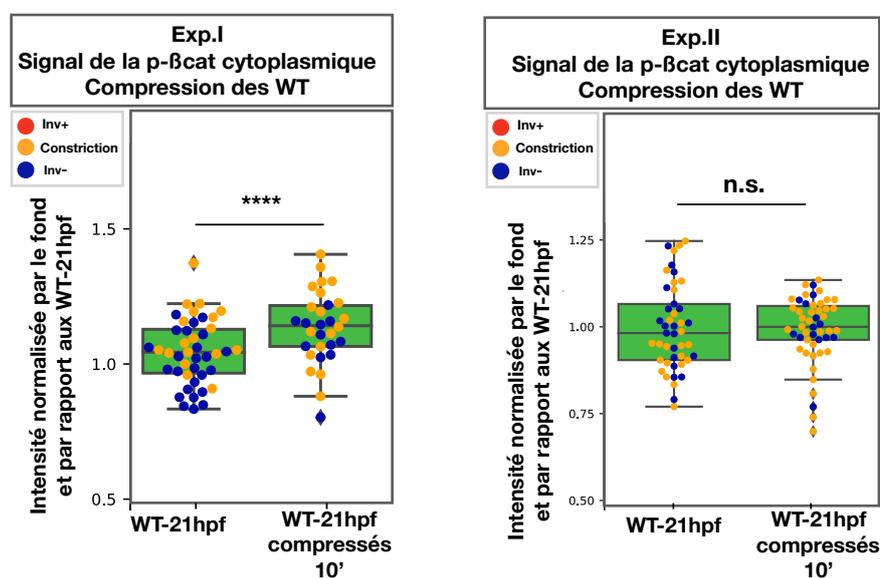


Fig. III.12 *Comportement différent de la p-βcat dans les deux expériences de compression*

● Discussion des résultats

Grâce aux compressions réalisées sur les embryons WT au moment de la transition blatula-constriction (Part.III.1.3), nous avons révélé que :

10. Les compressions mécaniques sur les embryons WT induisent la constriction apicale de 20% des embryons.

11. Les compressions mécaniques sur les embryons WT permettent d'augmenter le signal d'actine de 30% en moyenne (comme lors des compressions des CtrlMO) montrant une seconde fois la mécanosensibilité du cortex d'actine.

L'augmentation du signal d'actine jonctionnelle nous montre de nouveau que le cortex d'actine répond positivement aux contraintes mécaniques.

De manière intéressante, on peut voir que ce signal augmente de 30% comme lors des compressions des CtrlMO ce qui est une augmentation plus forte que celle constatée chez les StbmMO compressés. Cela pourrait expliquer que les compressions aient une influence sur le phénotype des WT et mais pas sur celui des StbmMO. En d'autres termes, nous supposons que la présence de la protéine Stbm permet un renforcement plus important du cortex d'actine sous compression mécanique, peut-être parce que les tensions mécaniques précédant la compression ne sont pas inhibées.

On pourrait alors répliquer que les compressions mécaniques n'ont pas d'influence sur le phénotype des embryons CtrlMO alors que ces embryons ne sont pas déficients en protéines Stbm. Cependant, les compressions sur les WT sont effectuées de manière plus précoce que chez les CtrlMO et StbmMO. Cela est visible par la répartition des phénotypes : au moment de la compression, les WT sont divisés de manière égale entre les blastulas et les constrictés alors qu'il y a 67% d'embryons mid-gastrula chez les CtrlMO. Cela pourrait expliquer que l'augmentation de 30% du signal d'actine jonctionnelle n'ait pas d'effet sur le phénotype des CtrlMO, alors qu'elle permet d'induire une augmentation de 20% de constrictés chez les WT-21hpf.

Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que Stbm soit requis dans une autre voie mécanosensible permettant d'induire la constriction apicale, ce qui expliquerait que les compressions induisent un changement phénotypique chez les WT et pas chez les embryons StbmMO.

Pour relier ou non les changements phénotypiques observés à la densification du cortex d'actine, nous pourrions utiliser des drogues bloquant son activité et refaire les compressions mécaniques sur les WT.

Pour la p- β cat, nous ne pouvons nous prononcer pour l'instant car les deux seules expériences effectuées affichent des résultats différents. On peut cependant remarquer que la première expérience semble légèrement plus précoce que la seconde au regard du ratio entre les embryons blastulas et les constrictés. En effet, dans l'Exp.1, le rapport est de 25 embryons blastulas pour 18 embryons constrictés, alors que dans l'Exp.2 on dénombre 20 blastulas pour 25 constrictés. Cela pourrait expliquer que les contraintes induites par Stbm aient déjà déclenché la phospho-

rylation sensible de la β cat, qui aurait alors atteint un seuil au delà duquel les compressions n'ont pas d'effet (comme pour les CtrlMO). Néanmoins, ces rapports ne sont pas significativement différents et ces expériences sont à refaire pour une meilleure compréhension du mécanisme.

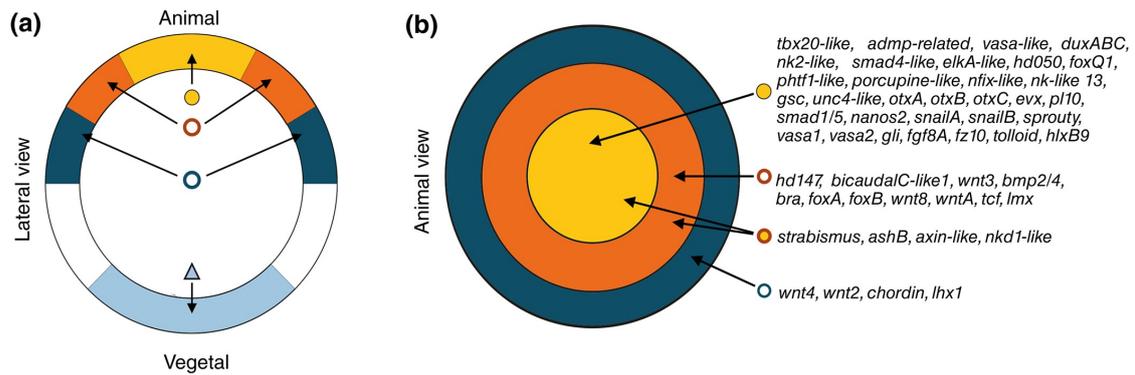
III.2 Gènes sous contrôle de la p- β cat

Nous avons montré qu'au début de la gastrulation, la β cat est phosphorylée lorsque les futures cellules endomésodermales sont soumises à de fortes tensions. Ici, nous allons tester le rôle de cette voie mécanique. Partant du constat que la β cat est un cofacteur de transcription de gènes endomésodermaux (par la voie cWnt) et que cette protéine est phosphorylée dans les futures cellules de l'endomésoderme, se pourrait-il que la p- β cat agisse également comme un signal déclencheur de ces gènes ? En d'autres termes, avons-nous affaire à une voie mécanosensible, parallèle à la voie cWnt ?

Pour répondre à cette question, nous avons effectué des RTqPCR (cf. Part.II.1.4.1) sur des embryons dont les tensions cellulaires endogènes dues à l'actine ont été inhibées (les embryons StbmMO). Afin de valider qu'un gène est mécanosensible, nous devons observer un défaut d'expression sous injection de morpholinos (qui bloque les contraintes endogènes) puis une restitution au moins partielle de l'expression du gène après application de contraintes exogènes.

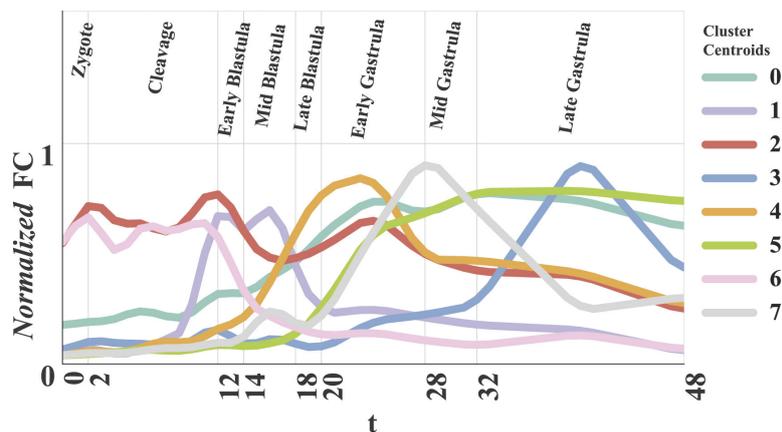
Nous sommes dans les mêmes conditions expérimentales que lors des expériences de la Part.III.1.2.2 : les embryons sont injectés avant les premiers clivages cellulaires, puis nous appliquons des compressions uni-axiales globales au moment de la gastrulation. Cependant, nous fixons les embryons une heure après. En effet, si l'expression des gènes que nous observons est une conséquence de la phosphorylation de la β cat, alors il doit y avoir un délai de l'ordre de l'heure entre la phosphorylation et l'expression du gène.

La question est de savoir quels gènes nous devons tester en priorité. La Fig.III.13 référence les domaines spatiaux (1. a et b) ainsi que les groupes temporels de co-expression (2). Si les domaines spatiaux sont relativement précis, les groupes temporels sont plus confus : la courbe d'expression des gènes identifiés comme appartenant à un même groupe peut varier d'un gène à l'autre, et surtout, il y a une variabilité pouvant aller jusqu'à quatre heures entre deux gènes d'un même groupe.



(1) **Domaines de co-expression génique de l'embryon au stade blastula**

Quatre domaines d'expression ont été identifiés dans l'hémisphère animal : le domaine central (jaune), l'anneau central (jaune), le domaine central **et** l'anneau central (jaune et orange), et l'anneau externe (bleu foncé). Figure issue de la publication [Röttinger et al. \(2012\)](#)



(2) **Huit groupes de gènes identifiés** Figure issue de la publication [Abdol et al. \(2017\)](#)

Fig. III.13 **Rappel de l'expression spatiale et temporelle génique chez l'embryon précoce**

Issu de [Röttinger et al. \(2012\)](#) et [Abdol et al. \(2018\)](#)

Nous avons commencé par cibler les gènes endomésodermaux cibles de la β cat.

Spatialement, les gènes à cibler en priorité parmi ces gènes sont ceux du domaine central (jaune), car c'est dans les cellules de ce domaine qu'est phosphorylée la β cat. Au niveau des groupes temporels, les groupes intéressants à cibler semblent être les groupes 0,4,5,7, et même 2, car les gènes de ces groupes connaissent un pic d'expression au stade early-gastrula. Cependant, il ne faut pas négliger les gènes du groupe 1. En effet, même si leur niveau d'expression semble s'effondrer avant la gastrulation, on peut voir que le niveau est tout de même maintenu pendant le stade early-gastrula. Le relarguage de la β cat par voie mécanique n'a peut-être pas

pour rôle de déclencher l'expression de gènes, mais peut-être de la maintenir comme cela a été observé chez la *Drosophila* pour le gène *twist* [Brunet et al. \(2013\)](#).

Nous avons utilisé deux méthodes complémentaires pour contrôler l'expression génique : les RTqPCR et les ISH (cf. [Part.II.1.4.1](#)). Les expériences analysées par RTqPCR ont été faites par Hereroa Johnston (Collaboration Eric Rottinger, IR-CAN, Nice).

III.2.1 Résultats

III.2.1.1 Le cas Dishevelled

Dsh a été caractérisée en détail dans la publication [Lee et al. \(2007\)](#). L'ARNm est uniformément présent depuis le stade zygote jusqu'au stade blastula. La protéine, quant à elle, est seulement localisée autour du pronucleus dans le zygote, et reste concentrée de manière asymétrique préférentiellement au pôle oral jusqu'au stade blastula. Au stade early-gastrula, la protéine Dsh est encore présente à ce pôle mais plus faiblement concentrée, et elle disparaît petit à petit lors de la gastrulation. Pour expliquer la localisation asymétrique de la protéine malgré la localisation uniforme de l'ARNm, les auteurs de la publication [Lee et al. \(2007\)](#) proposent un mécanisme de dégradation de la protéine au pôle aboral, même s'ils n'excluent pas l'autre hypothèse concurrente, à savoir la non-traduction de la protéine au pôle aboral. Leur hypothèse est basée sur le fait que lors d'injections uniformes de ARN de Dsh :GFP, la fluorescence (donc la présence de la protéine) n'est observée qu'au pôle oral, donc malgré la présence uniforme de l'ARN, et que lors d'injection de séquence non entière d'ARN, comme Dsh-DIX :GFP, ou d'autre ARN incomplets de Dsh :GFP, la fluorescence est détectable dans tout l'embryon (les auteurs se réfèrent à un article non publié en 2007, et je n'ai pas retrouvé de travaux confirmant cette observation). Comme nous allons le voir, nos observations ne semblent pas confirmer cette hypothèse.

De part son rôle essentiel dans la voie cWnt et PCP, Dsh est nécessaire au bon développement et à la polarisation de l'embryon. En effet, lorsqu'on dégrade la protéine Dsh avec le dominant-négatif Dsh-DIX ([Lee et al., 2007](#)), la stabilisation et la nucléarisation de la β cat -déclenchant la voie cWnt- sont inhibées ainsi que le gène endomésodermal *snail-A*. L'invagination a lieu mais l'archentéron ne se forme pas correctement et semble "plein".

Nous avons pris parti de la localisation asymétrique de la protéine Dsh au pôle oral, pour identifier ce pôle afin de faire des compressions orientées (cf Part.III.1.2.2). Pour cela, nous avons injecté l'ARN de Dsh :GFP qui permet de reconnaître en direct le pôle oral. Bien que cela se soit révélé efficace pour les embryons WT, nous n'avons pas pu réaliser cette expérience pour les embryons StbmMO. En effet, en co-injectant les ARN StbmMO et Dsh :GFP, nous avons eu la surprise de découvrir qu'au moment de la blastula, Dsh-GFP était invisible chez les StbmMO alors qu'elle était encore présente chez les CtrlMO. Cette expérience a été reproduite quatre fois (avec plus de trente embryons par condition) avec toujours le même résultat.

La protéine Dsh :GFP est donc absente chez les StbmMO au stade Blastula. Elle est soit dégradée, soit non traduite.

Les RTqPCR au stade gastrula (cf. Fig.III.14) ont montré la diminution du nombre de transcrits (au minimum 1.8 fois moins). De la même manière, soit la transcription de l'ADN en ARN est inhibée, soit l'ARN est dégradé.

Ces observations peuvent toutes les deux s'expliquer par la dégradation de l'ARN de Dsh lors de l'inhibition de Stbm. Néanmoins, nous ne pouvons pas rejeter le scénario -moins probable car plus complexe- impliquant à la fois l'inhibition de la transcription en ARN et la dégradation de la protéine.

Ces résultats sont surprenants. En effet, il a été rapporté que l'inhibition de Stbm par injection de morpholinos -autrement dit l'inactivation de la voie Wnt/PCP- n'a pas d'effet sur la nucléarisation de la β cat -voie cWnt. Ces résultats ne semblent *a priori* pas en accord avec l'inhibition de Dsh par les injections de StbmMO.

Dans le même sens, il a été décrit que les embryons Dsh-DIX n'expriment pas correctement les gènes *snail-A* et *fz10* Lee et al. (2007), mais aussi que l'injection de StbmMO n'a pas d'impact sur l'expression de ces deux gènes d'après Kumburegama et al. (2011).

Devant ces résultats à première vue contradictoires, nous faisons l'hypothèse que Dsh est dégradée à un stade "tardif" de développement (pré-blastula) de manière à ce que les cascades biochimiques de la voie cWnt, permettant la nucléarisation de la β cat, aient eu le temps d'être activées avant la dégradation de Dsh. Nous ne possédons malheureusement pas encore de film montrant la dynamique de sa dégradation bien que cela nous indiquerait pourtant qu'au temps t de la dégradation de Dsh chez les StbmMO, la voie cWnt est déjà activée.

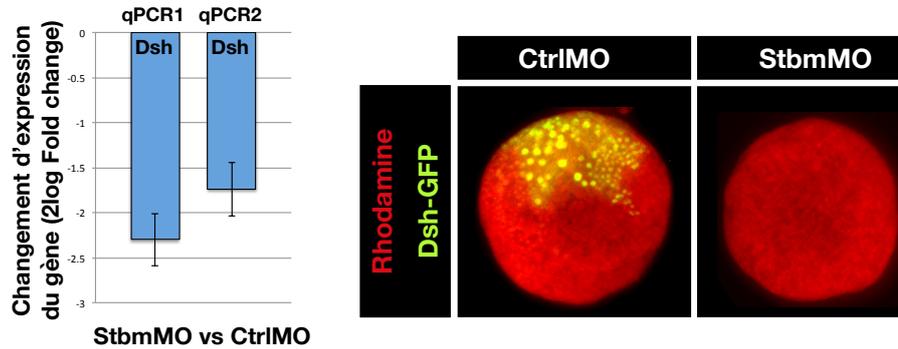


Fig. III.14 **Inhibition de l'ARN et de la protéine Dsh**

A gauche, les résultats des RTqPCR montrant la diminution du nombre de transcrits (gène de référence : GADPH). La barre d'erreur représente l'intervalle de confiance à un σ .

A droite, les embryons sont co-injectés avec les morpholinos (CtrlMO et StbmMO), la rhodamine, et l'ARNm de Dsh :GFP au stade zygote. Au stade Blastula, la GFP n'est pas visible chez les StbmMO.

Il est aussi important de noter qu'il n'y a pas de consensus sur la dépendance en β cat de *snail* (Röttinger et al., 2012), ce qui peut expliquer qu'il ne soit pas sensible au blocage de l'invagination par injection de StbmMO. Nous reviendrons sur l'expression de *fz10* sous injection de StbmMO.

Des résultats plus anciens ont déjà fait état de couplages entre la voie Wnt/PCP et la voie Wnt/ β cat. Il a été rapporté qu'en dégradant la protéine Dsh en utilisant le dominant négatif Dsh-DEP, la formation des "cellules en forme de bouteille" est inhibée, empêchant ainsi l'invagination. En constatant en plus la co-localisation et co-temporalisation des domaines d'expression de Dsh et de Stbm, les auteurs (Kumburegama et al., 2011) font l'hypothèse d'un double rôle pour Dsh, à la fois dans la voie cWnt et Wnt/PCP, comme cela a été montré chez la drosophile et les vertébrés (Theisen et al., 1994; Darken, 2002; Park and Moon, 2002; Jessen et al., 2002). Ils proposent une voie Stbm/Dsh régulant les constrictions apicales grâce au contrôle du cortex d'acto-myosine, et par conséquent, l'invagination. Nos résultats vont dans le sens de cette hypothèse, et indiquent de plus que Stbm ne serait pas un simple activateur de la protéine Dsh mais qu'il régulerait aussi son expression génique (en stimulant sa transcription ou en inhibant la dégradation des ARN).

III.2.1.2 Autres gènes, cibles potentielles de p- β cat

Sur la Fig.III.15, on peut voir les gènes qui ont donné des résultats "reproductibles". Par reproductible, j'entends "qui ont montré un changement d'expression dans le même sens pour les trois qPCR". En effet, beaucoup de gènes ont montré des expressions fluctuantes sans tendance claire identifiable.

La barre grisée correspond à la zone de "non-significativité". Ce seuil a été utilisé dans Röttinger et al. (2012). Toute barre qui sort de la barre grisée est considérée comme un changement significatif.

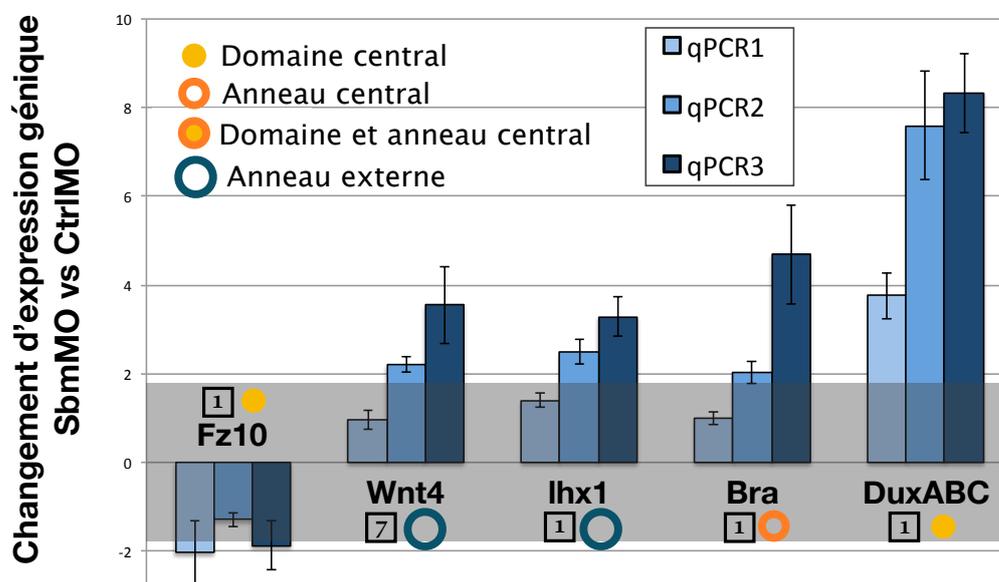


Fig. III.15 Résultats des 3 qPCR réalisées sur les *StbmMO* par rapport aux *CtrlMO*. Gène de référence : *GADPH*

Ici, sont représentés les gènes qui ont montré une tendance nette et reproductible. Au dessus du nom du gène, l'encadré représente le numéro de cluster temporel du gène (se référer Fig.III.13) et le rond de couleur représente son domaine d'expression. Toute barre sortant de la zone grise $[-1.8; +1.8]$ est considérée comme un changement significatif.

- *DuxABC*

duxABC est un gène du premier "cluster" génique de *Nematostella* (cf. Fig.III.13), exprimé très tôt, dès huit heures de développement à 16°C. Il est localisé dans le domaine central, c'est à dire qu'il est exprimé dans les cellules de la plaque pré-*endomesodermale*.

Il a été montré que le domaine d'expression de *duxABC* est agrandi chez les embryons dont la voie cWnt a été inhibée (Röttinger et al., 2012). Pour cela, les auteurs ont injecté des morpholinos inhibant la transcription du domaine de liaison ("binding domain") de Tcf, où la β cat se fixe afin de déclencher la transcription de ses gènes cibles. Tcf étant seulement exprimé dans l'anneau central, les auteurs font l'hypothèse que *duxABC* est exprimé dans le domaine et dans l'anneau central mais qu'il est réprimé dans l'anneau par Tcf. Il serait donc un indicateur négatif de la voie cWnt.

A notre tour, en réalisant des RT-qPCR au stade gastrula, nous observons une surexpression du gène chez les embryons StbmMO par rapport aux embryons CtrlMO (cf. Fig.III.15). Ce gène répond fortement, et de manière reproductible, à l'inhibition des contraintes mécaniques, indiquant peut-être, comme dans la publication Röttinger et al. (2012), une répression de la voie cWnt.

Cependant, sans regarder sa localisation spatiale, nous ne pouvons savoir si le gène est simplement surexprimé dans son domaine classique d'expression (le domaine central) ou si ce domaine est étendu sans que le gène soit surexprimé quantitativement comme cela est le cas dans la publication Röttinger et al. (2012). Pour répondre à cette question, il faudrait faire des ISH de DuxABC chez les embryons StbmMO.

Néanmoins, *DuxABC* étant relié négativement à Tcf, nous faisons l'hypothèse que sa surexpression est liée à la diminution de la phosphorylation de la β cat.

- ***Frizzled 10***

Comme *duxABC*, *frizzled10* (*fz10*) appartient au premier groupe de gène (exprimé à partir de 10hpf à 16°C) et est exprimé dans le domaine central. Fz10 joue un rôle essentiel dans les voies cWnt et PCP (Huang and Klein, 2004). En effet, cette protéine est un régulateur trans-membranaire encodant pour les ligands Wnt extra-cellulaires, et lié à Dsh à l'intérieur de la cellule. Lorsqu'il est activé par un ligand Wnt, Frizzled recrute des complexes intra-cellulaires déclenchant la voie cWnt ainsi que la voie PCP.

Dans l'article Kumburegama et al. (2011), les injections de StbmMO n'ont pas d'influence sur l'expression spatiale de *frizzled10*. Cependant, la technique d'ISH

(*in situ* hybridization) est une méthode non quantitative. Grâce aux RT-qPCR quantitatives, nous observons une sous-régulation quantitative légère de ce même gène sous injection de StbmMO. Ce résultat est très intéressant car il montre une sous-régulation d'un composant essentiel de la voie cWnt. Sans Frizzled, la voie Wnt ne peut pas se mettre en place. De la même manière que nous ne pouvions pas conclure à la mécanosensibilité de la p- β cat avant d'avoir observé une restauration mécanique, nous ne pouvons pas encore conclure sur la mécanosensibilité de *fz10*. En effet, la sous-régulation de Fz10 peut être due à l'inhibition d'une voie dans laquelle Stbm est impliquée, comme la PCP. Afin de s'assurer que l'inhibition des contraintes mécaniques (et donc de la p- β cat) est à l'origine de la sous-régulation de Fz10, il nous faut observer une restitution mécanique du niveau d'expression de *fz10*.

- ***Brachyury***

brachyury, est le fondateur de la famille de gènes T-box et, en tant que facteur de transcription, la protéine est essentiel au bon développement du mésoderme chez la souris (Chesley, 1935), le xénope (Gentsch et al., 2013) et le zebrafish (Martin and Kimelman, 2008). Pour cette raison, il a été étudié en détail chez *Nematostella vectensis* afin d'essayer de comprendre quel pouvait être son rôle chez ce diploblast, ne possédant pas, par définition, de mésoderme (Technau, 2001; Martindale, 2004; Servetnick et al., 2017).

brachyury (*bra*) joue donc un rôle homologue au gène mésodermale *twist* chez la drosophile et au gène *notail* dont il est l'homologue chez le zebrafish (Schulte-Merker et al., 1994). Or dans ces deux espèces, ces gènes sont mécanosensibles ; c'est à dire que leur expression est soit déclenchée, soit maintenue par les mouvements de gastrulation et d'épibolie (Brunet et al., 2013). Pour cette raison, *brachyury* a été l'un des premiers gènes que nous avons étudié.

Chez *Nematostella*, *bra* appartient au premier groupe de gènes à être exprimé, dès huit heures de développement à 16°C. Jusqu'au stade blastula, il est exprimé dans le domaine central et dans l'anneau central, mais au moment de la gastrulation, le signal chute dans le domaine central et s'étend pour n'occuper plus que l'anneau central Abdol et al. (2018). Ce changement de domaine est associé à une chute du nombre de transcrits, visible sur la Fig.III.16.(A). Au moment de la gastrulation, on peut observer une légère augmentation du niveau d'expression.

Récemment, Servetnick et al. (2017) ont utilisé CRISPR/Cas9 pour exciser *bra*-

chury et comprendre son rôle direct dans le développement de *Nematostella*. Dans les embryons *brachyury*⁽⁻⁾ la formation du pharynx et l'élongation échouent, et l'organisation de l'endoderme est perturbée. Pour les auteurs, ces données indiquent que le rôle de *brachyury* n'est pas de spécifier le mésoderme, mais plutôt de délimiter les frontières des différents comportements cellulaires et des feuilletts embryonnaires.

bra a un rôle essentiel dans la voie cWnt. En effet, en l'absence de *bra*, certains gènes de la voie cWnt sont sous-régulés, qu'ils soient exprimés dans l'anneau central (comme *brachyury*) ou dans d'autres domaines, comme le domaine central ou l'anneau externe. Mais le GRN (genetic regulatory network) montre une fois de plus sa complexité. L'inhibition de la voie cWnt (par inhibition de *tcf*) inhibe *bra* (Röttlinger et al., 2012) et l'excision de *bra* a un effet sur les gènes de la voie cWnt, menant les auteurs à conclure à une boucle de régulation. Cependant bien que certains gènes montrent des comportements similaires face aux deux perturbations (comme *fgf-a1*, *foxA*, *wnt2*, *wnt3* et *wnt4*), d'autres ne sont pas régulés dans le même sens (*foxQ1*, *tolloid*, *sprouty* et *otxA*), montrant ainsi que *bra* est nécessaire dans la voie cWnt mais n'agit pas seul.

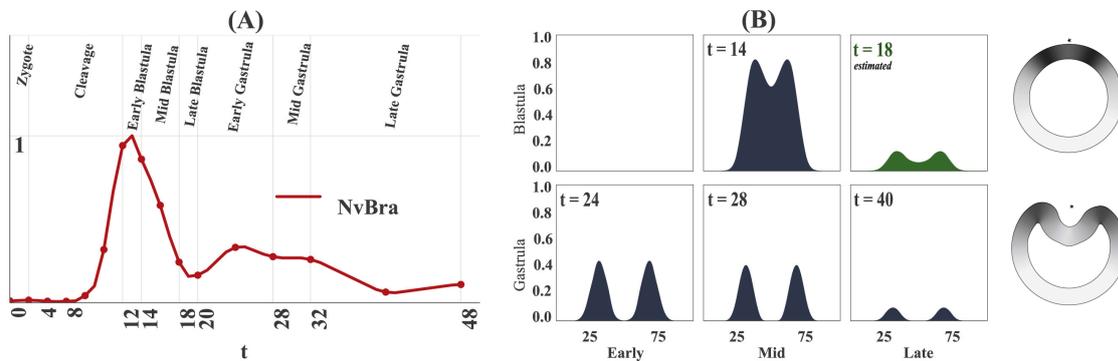


Fig. III.16 **Caractérisation de l'expression temporelle (A) et spatiale (B) de *Brachyury*.**

Image arrangée de la publication *Abdol et al. (2017)*

Les résultats révélés par les qPCR sont très surprenants. Au lieu de la baisse attendue, nous observons une hausse du niveau d'expression chez les StbmMO.

Il faudrait étudier la dynamique d'expression de *bra* pour mieux comprendre ce qu'il se passe réellement chez les embryons StbmMO. En effet, nous savons juste qu'au début de la gastrulation, *brachyury* est surexprimé dans les embryons StbmMO. Nous ne pouvons donc savoir si le premier pic d'expression est maintenu

à un niveau élevé par exemple, si le second pic est plus fort, ou encore si nous avons à faire à un scénario totalement différent.

- ***Wnt4***

Comme nous l'avons déjà évoqué, *wnt4* est lié à la voie cWnt. Il réprime lorsque *bra* est ablaté (Servetnick et al., 2017) ou lorsque *Tcf* est inhibé (Röttinger et al., 2012).

Avec les qPCR, nous observons une hausse de l'expression de *wnt4* chez les embryons StbmMO. Dans le cadre de notre hypothèse, il est étonnant de constater cette hausse. Cependant, elle semble reproductible et cohérente avec la hausse de l'expression de *bra* car on a vu que *wnt4* était réprimé en l'absence de *bra*, et donc potentiellement sur-exprimé par une sur-expression de *bra*.

- ***Lhx1***

lhx1 fait parti du premier groupe de gène, il est exprimé dès 10-12hpf dans l'anneau externe (même domaine d'expression spatiale que *wnt4*). Dans la publication Röttinger et al. (2012), on peut voir qu'il est sous régulé lors de l'inhibition de *Tcf*, mais n'est pas affecté par traitements AZ ou LiCl, gardant un rôle ambiguë quant à la voie cWnt. Ainsi, nous ne pouvons pas exploiter clairement ce résultat pour tester notre hypothèse.

III.2.2 Discussion

Ainsi, bien que nous observions des changements dans l'expression de certains gènes endomésodermaux au stade early-gastrula sous injection de StbmMO, ces modifications restent très difficiles à interpréter.

Les gènes *wnt4*, *bra* et *dsh* ne sont pas régulés dans le sens attendu selon notre hypothèse. Cependant, comme nous l'avons vu, l'exemple de *dsh* nous indique qu'il nous faudrait étudier la dynamique d'expression des gènes pour pouvoir conclure. En effet, il semble impossible que la protéine Dsh n'ait jamais été traduite au regard de la nucléarisation de la β cat et de l'expression non modifiée de *snailA* chez les embryons StbmMO (Kumburegama et al., 2011). En effet, ces deux processus sont inhibés sous injection d'un dominant-négatif de *dsh* (Lee et al., 2007).

De la même manière, conclure sur l'expression de *bra* semble légèrement prématuré. Son expression spatiale est complexe, car on observe un changement de do-

maine entre le stade blastula et early-gastrula et ce changement spatial, associé à une diminution quantitative de son expression, peut être régulée génétiquement et/ou mécaniquement. Une étude récente a montré la mécanosensibilité β cat-dépendante de *bra* dans des conditions peu physiologiques (après 16h de drogue inhibant la myosin-II et 8h de compression) (Pukhlyakova et al., 2018). Ces résultats ne sont *a priori* pas en accord avec ce que nous observons, car ils témoignent d'une inhibition de l'expression de *bra* sous blocage de la myosine-II. Cependant, les temps de blocage ne sont pas les mêmes, et la dynamique de *bra* étant complexe, il est possible que nos observations ne soient pas en contradiction avec les leurs.

Nous avons aussi mis en évidence deux gènes dont l'expression est cohérente avec l'hypothèse d'une sous-régulation endomésodermale sous inhibition des contraintes mécaniques : *duxABC*, qui est un indicateur négatif de la voie cWnt, est sur-régulé de manière importante et reproductible et *fz10*, dont la protéine permet le transducteur trans-membranaire principale de la voie cWnt, est légèrement sous-régulé. Il est très intéressant d'observer que les deux gènes répondant dans le sens de notre hypothèse sont exprimés dans les cellules du domaine central, c'est à dire les cellules de la plaque pré-endomésodermale dans lesquelles nous avons révélé l'existence d'une concentration importante en p- β cat. Il se peut que la régulation mécanique de la β cat soit un paramètre majeur de régulation génique dans le domaine central, et qu'elle soit couplée de manière non triviale à d'autres paramètres dans les domaines plus latéraux.

L'étude génétique est loin d'être terminée. Nous voulons, par exemple, tester d'autres gènes, comme *twist*.

Mais surtout, pour s'assurer que les modifications de l'expression génique observées sont bien déclenchées par la diminution des contraintes mécaniques, nous pouvons principalement réaliser deux types d'expériences. La première serait de vérifier la reproductibilité de ces résultats avec une drogue inhibant la constriction apicale. Cela permettrait de réprimer les contraintes mécaniques seulement au moment de la gastrulation, et sans modifier le réseau de régulation génétique de l'embryon.

Ensuite, pour tester la mécanosensibilité de l'expression des gènes dont l'expression est modifiée par blocage des contraintes mécaniques (soit par l'injection de StbmMO, soit par l'utilisation d'une drogue bloquant le cortex d'actine), il faudra appliquer une restitution mécanique comme nous l'avons fait pour les immunofluorescences de la p- β cat sous injection de StbmMO en Part.III.1.2.2 (description

des compressions en Part.[II.1.3.1](#)). Après l'observation d'une restitution mécanique (partielle ou totale) des niveaux d'expression des gènes, nous pourrons conclure sur la mécanosensibilité des gènes en question.

Chapitre IV

Conclusion

Contents

IV.1 Résumé de la thèse	112
IV.1.1 Contexte et principaux résultats	112
IV.1.2 Résumé des résultats et proposition d'un modèle de la voie mécanosensible pY654- β cat	114
IV.2 Discussion	118
IV.2.1 Mécanismes responsables du mouvement d'invagination.	118
IV.2.2 Déclenchement mécanosensible d'une voie de transcrip- tion	121
IV.3 Conclusion	123

IV.1 Résumé de la thèse

IV.1.1 Contexte et principaux résultats

La science de l'étude de l'embryon n'est pas une science récente bien qu'elle ait beaucoup évolué ces dernières décennies. Après le bouleversement des années 80 avec la découverte des gènes maîtres de différenciation, elle connaît aujourd'hui un nouvel essor avec l'introduction du rôle moteur de la mécanique dans le développement de l'embryon (Chan et al., 2017; Gilmour et al., 2017; Merle and Farge, 2018).

Différentes voies mécanotransductionnelles ont été identifiées, dont une impliquée dans un événement évolutif d'importance, l'émergence du mésoderme (Brunet et al., 2013). Cette découverte, pionnière en la matière, est extrêmement intéressante car très peu de protéines sont conservées dans ce processus si important qu'est la gastrulation, qui permet de ségréger les feuilletts germinaux (Minot, 1883; Technau, 2003; Martindale, 2004).

Nous proposons donc de dater cette voie mécanotransductionnelle induisant la transcription de gènes mésodermaux en étudiant la gastrulation chez le Cnidaire diploblaste *Nematostella vectensis*. Ce choix est motivé par le fait que les Cnidaires sont considérés comme la branche sœur des Bilatériens et que *Nematostella*, lors de la gastrulation, exprime des gènes qui sont des gènes mésodermaux chez les Bilatériens (Martindale, 2004). Cette anémone de mer témoigne donc de l'émergence du mésoderme et car elle possède un tissu mi-mésodermale, mi-endodermale : l'endomésoderme.

Avec *Nematostella*, nous nous sommes confrontés à plusieurs problèmes d'ordre techniques. Tout d'abord, cet organisme est relativement récent en tant que modèle et les outils à notre disposition pour observer en "live imaging" ne sont pas aussi développés que dans d'autres organismes modèles, comme la drosophile par exemple. Il a d'abord fallu adapter des techniques d'immunofluorescence utilisées au laboratoire précédemment pour mener à bien nos expériences. L'utilisation d'un anticorps contre la phosphorylation du site Y-654 de la β cat est une première chez *Nematostella*.

Mais Nv est aussi peu stéréotypée temporellement et morphogénétiquement. Etudier un mécanisme transitoire, et sensible (moins de 20% d'augmentation de la p- β cat chez les Bilatériens) par immunofluorescence (donc avec des images fixes) dans ces conditions s'est révélé extrêmement délicat. Voir émerger une caractéris-

tique parmi une population disparate demande d'étudier un grand nombre d'embryons. Pour palier à ces difficultés, nous avons utilisé l'outil informatique qui permet de faire des analyses précises et ce, à grande échelle. Ce travail a d'abord été initié par Benjamin Gallois (stage de master2, que j'ai encadré avec Emmanuel Farge), puis poursuivi en collaboration avec Florian Sarron.

Les principaux algorithmes permettent de (i) filtrer l'embryon du fond grâce à un filtre Otsu, (ii) de distinguer les jonctions cellulaires du signal intra-cellulaire grâce à la squelettisation réalisée avec le logiciel DisPerSe, et (iii) d'étudier ces signaux cellule par cellule grâce à la segmentation. Toutes ces étapes ont été codées avec le langage Python, qui est open source.

Ces algorithmes nous ont permis de révéler des processus indétectables "à la main", comme des corrélations entre protéines, des changements de répartition spatiale de signal, etc.

La voie mécanotransductionnelle que nous testons ici se résume de la façon suivante. Soumises à de fortes contraintes lors de la gastrulation, la β cat jonctionnelle change de conformation et ouvre un site de phosphorylation (Röper et al., 2018). Dans le cas où le site conservé Y654 est phosphorylé, alors l'interaction entre l'E-cadhérine et la β cat est diminuée et la β cat est relarguée dans le cytoplasme où elle se lie à des facteur de transcription, migre dans le noyau et déclenche la transcription de gènes mésodermaux (Brunet et al., 2013).

Il nous a donc fallu commencer par observer la phosphorylation de la β cat dans les embryons WT de *Nematostella* au moment de la gastrulation. Très vite, nous avons remis en question notre hypothèse de départ, car au lieu d'être localisé dans les cellules les plus courbées lors de l'invagination, un pattern de p- β cat apparaît dans les cellules du domaine central juste avant l'invagination, alors que l'embryon est encore sphérique et donc les cellules peu déformées. Grâce aux analyses informatiques, nous avons pu mettre en évidence que ce motif de p- β cat coïncidait avec un motif similaire en actine jonctionnelle et de manière plus générale, que les signaux d'actine jonctionnelle et de p- β cat intra-cellulaire étaient corrélés linéairement. L'augmentation de la p- β cat dans les cellules de la plaque pré-endomésodermale est faible (de l'ordre de 5%), mais nous savons qu'un changement ténu peut être fonctionnel (Brunet et al., 2013), et nous avons montré que cette augmentation dure plusieurs heures.

Pour tester si une voie est mécaniquement induite par les mouvements morphogénétiques, il est nécessaire d'observer que le blocage de ces mouvements in-

duit l'inhibition de cette voie mais aussi que la restitution mécanique exogène des contraintes restaure en partie ou totalement la voie.

En injectant le morpholino de *Strabismus*, nous pouvons bloquer la traduction des ARN maternels de *Stbm*. Le rôle dans la voie PCP de cette protéine est conservée chez les Cnidaires (Momose et al., 2012) et a été décrite comme nécessaire à la gastrulation chez *Nematostella* (Kumburegama et al., 2011).

Vis à vis du mécanisme, nous sommes revenus sur notre hypothèse de départ qui désignait les déformations cellulaires macroscopiques comme déclencheur de la phosphorylation, pour nous intéresser au cortex d'actine. Nous avons mis en évidence le rôle fondamental de ce cortex, en observant tout d'abord une corrélation linéaire entre l'actine et la β cat puis en révélant le rôle causal de l'actine grâce aux injections de *StbmMO*. Nous avons donc proposé que les contraintes mécaniques à l'origine de la gastrulation induisent l'induction de la phosphorylation avant que les mouvements morphogénétiques ne soient visibles. Nous avons de plus montré une mécanosensibilité du cortex d'actine impliqué dans la constriction apicale menant à l'invagination de l'endomésoderme.

Ce travail permet d'ors et déjà d'affirmer que la voie mécanosensible passant par la phosphorylation Y654 de la β cat est conservée chez les Cnidaires. Elle remonte donc à plus de 600 millions d'années.

Afin de tester l'activité mécanotransductionnelle de cette voie, nous avons réalisé des RT-qPCR sur les *StbmMO*. Nous avons identifié deux gènes du domaine central dont l'expression est modifiée, et ce, conformément à notre hypothèse : *duxABC*, marqueur négatif de la voie cWnt, est sur-régulé, et *fz10*, marqueur positif de voie cWnt est sous-régulé (Röttinger et al., 2012). En dehors de la zone de phosphorylation de la β cat, les deux autres gènes (*bra* et *lhx1*), dont l'expression est modifiée par injection de *StbmMO*, ne répondent pas de la façon attendue, témoignant d'une réaction non triviale du GRN (Genetic Regulatory Network).

IV.1.2 Résumé des résultats et proposition d'un modèle de la voie mécanosensible pY654- β cat

Je résume ici les principaux résultats de cette thèse, qui nous permettent de proposer un modèle. Par soucis de clarté, les résultats sont numérotés de 1 à 11 et

IV.1 RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX RÉSULTATS ET PROPOSITION D'UN MODÈLE 115

ces numéros servent de référence pour expliquer le modèle proposé ci-après.

1. La phosphorylation Y654 de la β cat ne coïncide pas avec les mouvements macroscopiques de la gastrulation (Part.III.1.1.1).
2. L'actine jonctionnelle et la p- β cat intra-cellulaire sont corrélées linéairement dans toutes les cellules de l'embryon au début de la gastrulation (Part.III.1.1.2).
3. Au début de la gastrulation, les taux de p- β cat augmentent subtilement (\sim 5%) mais durablement (plusieurs heures) dans les cellules du domaine central au moment de leur constriction apicale (Part.III.1.1.1 et Part.III.1.1.3).
4. Les injections de StbmMO permettent de réduire de moitié la proportion d'embryons qui invaginent (Part.III.1.2.1).
5. Sous injection de StbmMO, le signal d'actine diminue de 30% en moyenne (Part.III.1.2.1).
6. L'inhibition due la densification du réseau d'actine par injection de StbmMO induit la diminution de la phosphorylation de la β cat de 10% en moyenne (Part.III.1.2.1).
7. Les compressions mécaniques sur les embryons CtrlMO et StbmMO ne changent pas significativement le phénotype de l'embryon (Part.III.1.2.2).
8. Les compressions mécaniques induisent le renforcement du cortex d'actine dans tous les embryons (CtrlMO augmentation de 30%, StbmMO augmentation de 10%) (Part.III.1.2.2).
9. Les compressions mécaniques et/ou le renforcement du réseau d'actine restaurent les niveaux de phosphorylation de la β cat des embryons StbmMO mais ne modifient pas celui des CtrlMO (Part.III.1.2.2).
10. Les compressions mécaniques sur les embryons WT induisent la constriction apicale de 20% des embryons (Part.III.1.3).
11. Les compressions mécaniques sur les embryons WT permettent d'augmenter le signal d'actine de 30% en moyenne (Part.III.1.3).

Strabismus, qui est déjà asymétriquement concentré au pôle oral dans le zygote (Kumburegama et al., 2011), permet la densification du réseau d'actine au début de la gastrulation (5). La protéine est également nécessaire pour déclencher les mouvements morphogénétiques de la gastrulation (4, 7+10).

Le renforcement du réseau d'actine, qui est soumis à une boucle de rétroaction positive (8, 11), permet de concentrer et de stabiliser mécaniquement la phosphorylation Y654 de la β cat dans ces mêmes cellules (2+3, 6+9).

Les études génétiques en aval de cette voie restent trop préliminaires pour les inclure dans ce modèle.

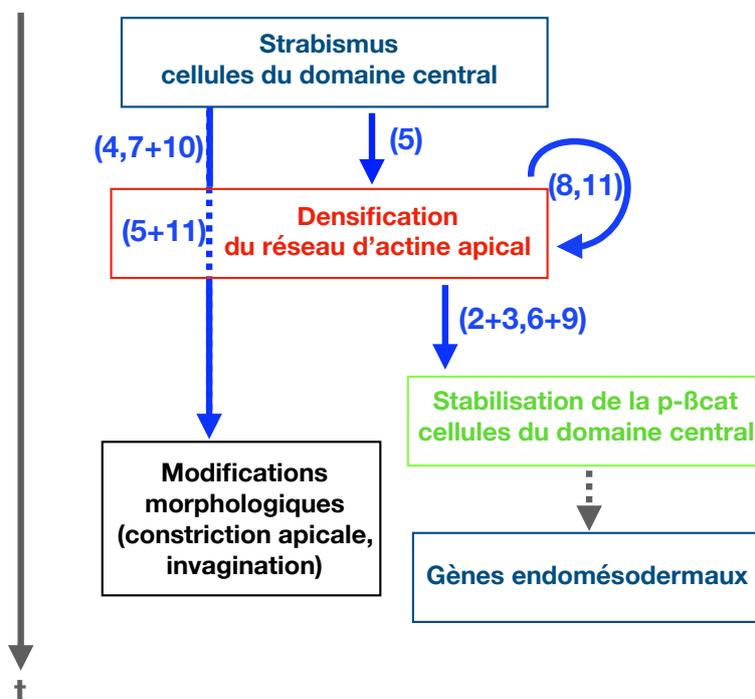


Fig. IV.1 **Modèle proposé : La Voie pY654- β cat Mécanosensible chez *Nematostella vectensis***

Les flèches bleues représentent ce que nous avons montré par ce travail de thèse.

Les numéros associés renvoient aux résultats récapitulés en page précédente.

La flèche grise en pointillé indique qu'il faudra de plus amples investigations avant de pouvoir se prononcer sur cette implication.

La flèche bleue en pointillé signifie que nous n'avons pas définitivement prouvé que les modifications morphologiques induites par *Stbm* passent par le renforcement du réseau d'actine.

IV.2 Discussion

IV.2.1 Mécanismes responsables du mouvement d'invagination.

Dans nos mains, l'injection du morpholino de *Stbm* permet de diviser par deux le nombre d'embryons qui invaginent, mais n'avons pas réussi à pas bloquer tout processus morphogénétique. En effet, la constriction apicale qui marque le début de la gastrulation n'est pas bloquée par injection de *StbmMO*. Cependant, dans la publication [Kumburegama et al. \(2011\)](#), le phénotype "non invaginé" est assigné à tous les embryons dont l'archentéron est vide. Selon cette définition, la constriction apicale est un phénotype "non invaginé" et on ne peut pas connaître la proportion d'embryons constrictés dans leurs mains.

En nous basant sur les simulations réalisées par [Tamulonis et al. \(2011\)](#), trois paramètres semblent nécessaires, et, lorsqu'ils sont bien ajustés, suffisants pour accomplir une invagination complète et ressemblante à celle de *Nv*, à partir d'une sphère de cellules. Les deux paramètres qui permettent de déclencher le début de l'invagination sont la constriction apicale et la perte d'adhésion basale des cellules du domaine central. Bien qu'une simulation ne garantisse pas que le phénomène se réalise de cette façon, nous pouvons en tirer quelques enseignements et faire quelques hypothèses.

Tout d'abord, dans la simulation, diminuer seulement la constriction apicale n'aboutit au blocage de la gastrulation qu'après un certain seuil, et encore, l'embryon conserve une invagination résiduelle induite par la diminution de l'adhésion basale des cellules du domaine central (cf. [Fig.III.9](#)). En dessous de ce seuil, l'embryon peut gastruler, quasi-normalement. Cela pourrait expliquer les grandes difficultés que nous avons eu à bloquer la gastrulation et à trouver la concentration et le volume adéquat à injecter. Car trop augmenter les doses nuit au bon développement de l'embryon et la balance entre efficacité et non perturbation du développement est difficile à trouver et, malheureusement, à reproduire.

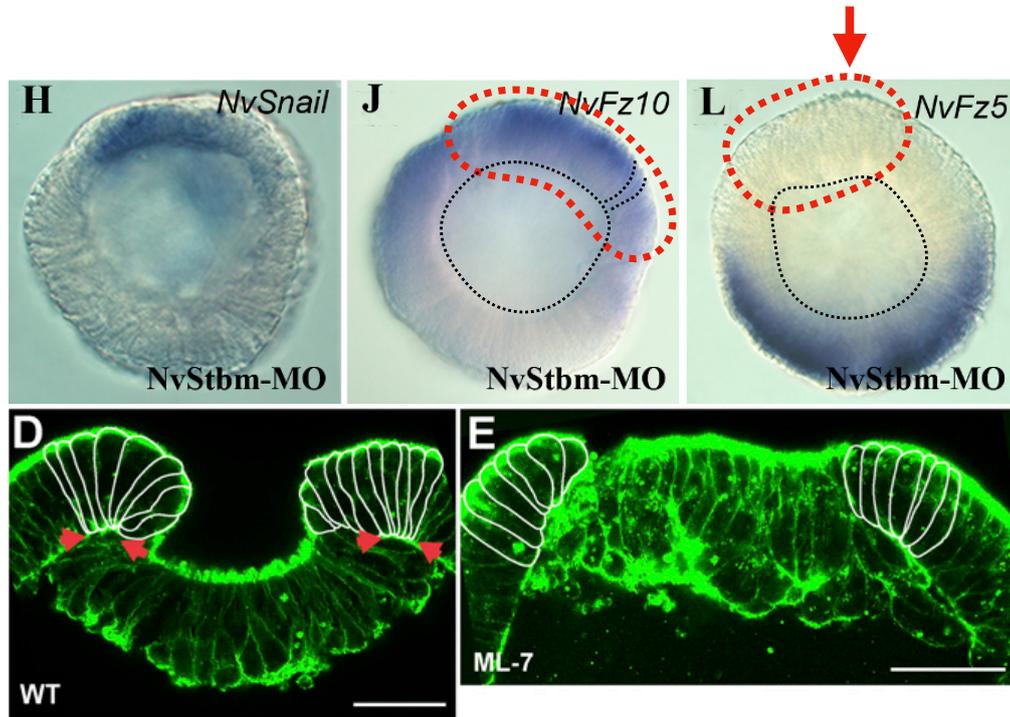


Fig. IV.2 **Difficulté de blocage des mouvements morphogénétiques de la gastrulation**

Sur deux des trois images montrant clairement l'embryon injecté avec *StbmMO*, au stade gastrula, on peut distinguer les changements cellulaires caractéristiques du début de la gastrulation (domaine oral entouré en rouge). Dans l'embryon du milieu (*NvFz10*), on distingue des cellules dont l'axe apico-basal converge fortement vers le centre du pôle oral, laissant penser à une constriction apicale. Dans les deux embryons de droite (*NvFz10* et *NvFz5*), le blastocèle a légèrement changé de forme en s'aplatissant oralement (cercle noir pointillé). Enfin, sur l'embryon de droite (*NvFz5*), on peut voir à la fois l'épaississement de la plaque pré-endomésodermale et le bourgeonnement apical des mêmes cellules indiquant une compression forte (flèche rouge) et probablement une constriction apicale. Il est intéressant de noter qu'on ne retrouve pas ces caractéristiques sur le premier embryon (*NvSnail*) mais aussi qu'il semble très abîmé.

L'image en immunofluorescence montre le pôle oral d'un embryon sous *ML-7* (inhibiteur de myosine). Cette drogue ne bloque pas la formation des cellules bouteilles.

Images adaptées de [Kumburegama et al. \(2011\)](#) et [Pukhlyakova et al. \(2018\)](#).

Ensuite, même en ayant injecté la bonne dose de morpholino, nous ne bloquons pas totalement les mouvements morphogénétiques du tout début de la gastrulation. Cela peut être dû au fait qu'on ne bloque pas totalement la constriction apicale ou alors qu'on ne bloque pas la perte d'adhésion basale des cellules du domaine central, comme dans la simulation. Si cette adhésion est diminuée, les cellules peuvent alors minimiser leur énergie corticale en adoptant la forme de bouteille (bottle shape), où le côté apical de la cellules est étroit alors que le côté basal peut s'étendre. Nous avons montré que le cortex d'actine répond positivement aux contraintes mécaniques car les compressions induisent le renforcement du cortex quelque soit le type et la condition de l'embryon (CtrlMO et StbmMO, "blastulas-like", constrictés et invaginés). Il est donc possible que la formation des cellules en forme de bouteille induise mécaniquement le renforcement du cortex d'actine et déclenche de manière mécanique la constriction apicale qui n'avait pas été déclenchée par inhibition de Stbm.

Nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle Stbm est lié à une autre voie, mécanosensible, qui permet d'initier la constriction apicale. Par exemple, si Stbm est impliqué dans la perte d'adhésion basale des cellules du domaine central, alors on peut expliquer que les compressions sur les embryons StbmMO ne changent pas le phénotype car les cellules restent liées malgré un renforcement mécaniquement induit du cortex d'actine, tandis que les compressions sur les WT induisent une augmentation de la constriction. Dans les WT, l'adhésion basale des cellules, déjà diminuée par Stbm, pourrait être encore plus affaiblie par les compressions, ce qui aurait pour effet d'accélérer la formation des "cellules bouteilles". Lorsque l'adhésion basale est diminuée, ces cellules sont pincées mécaniquement sur le côté apical par les tissus environnant, ce qui pourrait induire dans une boucle positive de rétro-action mécanique induisant le renforcement apical du cortex d'actine et la constriction.

Les auteurs de la publication [Pukhlyakova et al. \(2018\)](#) font une autre hypothèse : en observant que la formation des cellules bouteilles n'est pas inhibée par ML-7, ils postulent que la constriction apicale ne requiert pas l'action de la myosine-II. Cependant, il est important de noter que la formation de cellules bouteilles est principalement déclenchée par la perte d'adhésion basale des cellules et moins par leur constriction apicale chez *Nematostella* ([Magie et al., 2007](#); [Tamulonis et al., 2011](#)). Il semblerait donc plus probable que ces résultats suggèrent seulement que la myosine-II n'est pas impliquée dans la diminution de l'adhésion basale des cellules

du blastopore.

Quoiqu'il en soit, en injectant StbmMO ou en bloquant la myosine-II, il semble très difficile d'inhiber totalement tout mouvement morphogénétique de la gastrulation. Cela a participé à rendre les résultats de cette thèse délicats et longs à obtenir. Tout d'abord, nous avons fait un long travail d'optimisation (d'un an environ) pour essayer d'être dans les meilleures conditions pour bloquer les mouvements morphogénétiques par injection de StbmMO, sans jamais atteindre l'inhibition de 90% décrite dans [Kumburegama et al. \(2011\)](#) avant de remettre en question ces résultats. Nos proportions d'embryons non-invaginés, constrictés, et invaginés, ont finalement été confirmées par l'équipe de Eric Röttinger, et nous nous sommes donc résolu au fait que, par cette méthode, nous ne pourrions pas atteindre un blocage plus efficace de la gastrulation.

Nous ne faisons pas face à une inhibition "on/off", qui aurait été plus facile à analyser. Nous avons dû diviser en trois groupes phénotypiques chacune des conditions alors même que la pauvre reproductibilité du développement de Nv nous imposait d'analyser beaucoup d'embryons. Beaucoup d'injections aussi ont été soit inefficaces, soit trop perturbatrices (entraînant la mort embryonnaire), pour être analysées.

Les résultats présentés en [Part.III.1.2](#) ont donc requis trois ans, entre l'optimisation des injections, et la réalisation des manipulations, et l'analyse en aval.

IV.2.2 Déclenchement mécanosensible d'une voie de transcription

Bien que nous ayons montré que la voie mécanosensible déclenchant la phosphorylation Y654 de la β cat était conservée chez l'ancêtre des Cnidaires et des Bilatériens, nous n'avons pas clairement mis en évidence son rôle. En effet, il reste encore beaucoup de travail à faire sur les gènes en aval de cette voie pour comprendre comment agit la p- β cat.

Il faut confirmer la mécanosensibilité des gènes dont l'expression est modifiée par injection de StbmMO (*wnt4*, *fz10*, *dsh*, *lhx1* et *bra*).

Tout d'abord, nous pouvons utiliser un inhibiteur des contractions de l'actine, pour vérifier si nous observons les mêmes modifications d'expression génique. Si tel est le cas, il est peu probable que la cause de ces modifications soit l'inhibition

de la cascade biochimique en aval de *stbm*, mais plutôt l'inhibition de la cascade mécanique induite par les contraintes créées par *stbm*.

Ensuite, il nous faudra tester l'importance de l'induction mécanique de la phosphorylation Y654 de la β cat dans la transcription génique. Dans ce but, nous sommes en train de tester des drogues inhibant la phosphorylation Y654 de la β cat.

Enfin, il nous faudra appliquer des contraintes mécaniques physiologiques sur les embryons inhibés, pour tester l'activation mécanique de la p- β cat et de l'expression génique.

Ces expériences sont primordiales car le rôle de *Stbm* est ambigu. Nous observons la diminution du nombre de transcrits *Fz10* et *Dsh*. Les deux protéines faisant parti de la voie PCP et de la voie cWnt, nous pouvons imaginer un mécanisme de régulation lié à *Stbm*, mais l'inhibition de l'expression des gènes est plus surprenante. A notre connaissance, ce résultat n'a jamais été observé auparavant.

Comme nous l'avons vu, il semble très peu probable que sous injection de *StbmMO*, l'ARN de *Dsh* n'ait jamais été traduite en protéine au cours du développement, car la nucléarisation de la β cat et l'expression de *snailA* ne sont pas inhibées sous injection de *StbmMO* alors qu'elles le sont par la sur-expression de dominant négatif de *Dsh* (Kumburegama et al., 2011). Afin de mieux comprendre les interactions *Stbm/Dsh*, nous pourrions caractériser la disparition de *Dsh*, en prenant un film (timeline) de l'embryon après la co-injection de *Dsh-GFP* et de *StbmMO*.

Nous avons mis en lumière deux gènes probablement mécanosensibles exprimés dans le domaine central donc dans les cellules de la plaque pré-endomésodermale qui constrictent et s'invaginent dans le blastocèle. Ces deux gènes vont dans le sens de notre hypothèse : *duxABC*, qui est un marqueur négatif de la voie cWnt, est sur-régulé et *fz10*, qui joue un rôle essentiel dans la voie cWnt est sous-régulé. Ces résultats sont très positifs et nous invitent à poursuivre nos investigations. Nous devons absolument tester leur mécanosensibilité par une restauration des contraintes mécaniques.

Les deux autres gènes identifiés répondent de manière plus difficile à analyser. L'expression WT de *bra* est complexe avec un changement de domaine spatial au même moment que la transition blastula-invagination. Bloquer cette transition mécani-

quement bloque peut-être aussi la relocalisation de *bra* et son inhibition dans le domaine central, ce qui pourrait expliquer sa sur-expression. Ce ne sont que des hypothèses qu'il sera nécessaire de tester par ISH. Mais la mécanosensibilité de *bra* a été récemment reportée (Pukhlyakova et al., 2018) ce qui nous laisse assez confiant quant à notre hypothèse. De manière cohérente, *bra* est lié à *wnt4* qui est lui aussi sur-régulé sous injection de StbmMO. Ces changements non triviaux surviennent chez des gènes exprimés en dehors de la plaque pré-endomésodermale et la sur-expression de *bra* domine probablement sur l'expression de *wnt4* par rapport à l'inhibition de la β cat dans le domaine central.

IV.3 Conclusion

L'émergence du mésoderme est une transition extrêmement importante d'un point de vue évolutif. La grande majorité des Metazoa (animaux) connus sont triploblastes (30 phylum sur 36) (Technau, 2003). L'apparition du mésoderme est liée à l'émergence d'une symétrie bilatérale, et à une vaste diversification du règne animal.

La gastrulation, qui permet la ségrégation de l'endoderme et du mésoderme intérieurs de l'ectoderme extérieur est un phénomène qui varie énormément d'un phylum à l'autre, avec des processus aussi variés que l'invagination, l'immigration cellulaire, la délamination etc. Si les modes de gastrulation sont peu conservés (indiquant une faible pression évolutive), le rôle de la β caténine dans la différenciation du mésoderme a été montré chez de nombreuses espèces (Leptin, 1991; Schohl and Fagotto, 2003; Jessen et al., 2002; Wikramanayake et al., 2003). Elle permet d'activer la transcription de marqueurs mésodermaux comme *twist* ou *brachyury*. Cependant, encore une fois, aucun signal biochimique susceptible d'activer cette protéine qui soit commun à tous les Bilatériens n'a été mis en évidence jusqu'ici.

Suite aux travaux précédents réalisés au laboratoire sur les Bilatériens (Brunet et al., 2013), nous proposons une voie mécanosensible à l'origine du mésoderme. En effet, les contraintes de la gastrulation, quelque soit son mode, sont conservées et pourraient servir de signal induisant la translocation nucléaire de la β cat. Lors de la gastrulation, les cellules sont soumises à de fortes tensions qui induisent, sous l'action de Src-family-kinase, la phosphorylation Y654 de la β cat des jonctions cellulaires (Röper et al., 2018). Son interaction avec l'E-cadherine est diminuée est elle

est relarguée dans le cytoplasme puis transloque dans le noyau, où, en tant que co-facteur de transcription, elle active l'expression des gènes mésodermaux.

Ce mécanisme, pour lequel nous avons de plus en plus de preuves, notamment grâce à cette thèse, expliquerait brillamment qu'aucune voie biochimique conservée en amont de l'activation de la β cat induisant la spécification du mésoderme n'ait été identifiée.

De plus, la mécanosensibilité de la β cat a été récemment découverte dans plusieurs processus physiologiques, pas seulement liés au développement embryonnaire. Par exemple, l'activation mécanique de la β cat est impliquée dans l'inhibition de l'adipogenèse (Sen et al., 2008; Ekelund et al., 2011), ou dans la tumorigenèse (Fernández-Sánchez et al., 2015). En effet, la pression exercée par la croissance d'une tumeur chez la souris active dans les tissus sains avoisinants les programmes de développement tumoraux par phosphorylation Y654 de la β cat. Cela peut être expliqué par la ré-activation des voies mécanosensibles du développement embryonnaire, qui est un processus favorisant l'apparition et l'évolution des cancers (Shang et al., 2017).

L'identification de la voie mécanosensible pY654- β cat chez un Diploblaste est donc une découverte essentielle, que nous pouvons dater à plus de 600 millions d'années. Comme nous l'avons identifiée dans l'endomésoderme d'un Cnidaire, il est possible que cette voie soit encore plus ancienne, et liée à l'émergence même d'une cavité gastrique. La mécanosensibilité de la β cat aurait peut-être déclenché la spécialisation des cellules de la cavité intérieure dans l'Urmetazoa lors de l'internalisation des tissus (ancêtre commun de tous les Métazoaires) (Fernandez-Sanchez et al., 2015).

Quoiqu'il en soit, la mécanosensibilité de la β cat semble être un processus générique, conservé, et présent chez l'humain. Cela en fait un sujet d'étude de première importance dans les recherches à venir.

Annexe A

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ADT	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
AZ	Azakenpaullone, C ₁₅ H ₁₀ BrN ₃ O, inhibiteur de la protéine GSK3
<i>βcat</i>	<i>β</i> caténine
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
bra	Brachyury
C&E	Convergence extension
CBA	Cnidarian Bilaterian Ancestor
ctrl	Contrôle
cWnt	La voie Wnt canonique
DIG	Digoxigenin
dsh	Disheveled
Dsh-DIX	Construction de la protéine Dishevelled dont le domaine DIX est supprimé (inhibition de la voie cWnt)
Dsh-DEP	Construction de la protéine Dishevelled dont le domaine DEP est supprimé (inhibition de la voie PCP et Wnt/Ca ²⁺)

E-cad	E-cadhérine
evo-devo	Evolutionary Developmental biology / Biologie évolutive du développement
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
fz10	Frizzled10
GFP	Green Fluorescent Protein / protéine fluorescente verte
GRN	Genetic Regulatory Network / Réseau de régulation génique
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
ISH	<i>In situ</i> hybridisation / hybridation <i>in situ</i>
LiCl	Chlorure de lithium,..
ML-7	hydrochloride, myosin light chain inhibitor, C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₂ S.HCl
MO	Morpholino
Myo-II	myosine II
NBT	Nitro-blue tetrazolium chloride
ntl	Notail
Nv	<i>Nematostella vectensis</i>
p-βcat	β caténine phosphorylée sur le site Y654
PCP	Planar Cell Polarity pathway / la voie Polarité Planaire Cellulaire
PDMS	Polydimethylsiloxane
PFA	Paraformaldéhyde
RT-qPCR	Retro-Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction
stbm	Strabismus

twt	Twist
WT	Wild type / Souche sauvage
Y-27632	Dihydrochloride, p160ROCK inhibitor, C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₂ .2HCl
Y654	Tyrosine 654

Annexe B

Merle and Farge (2018)

Trans-scale mechanotransductive cascade of biochemical and biomechanical patterning in embryonic development: the light side of the force

Tatiana Merle and Emmanuel Farge



Embryonic development is made of complex tissue shape changes and cell differentiation tissue patterning. Both types of morphogenetic processes, respectively biomechanical and biochemical in nature, were historically long considered as disconnected. Evidences of the biochemical patterning control of morphogenesis accumulated during the last 3 decades. Recently, new data revealed reversal mechanotransductive feedback demonstrating the strong coupling between embryonic biomechanical and biochemical patterning. Here we will review the findings of the emerging field of mechanotransduction in animal developmental biology and its most recent advancements. We will see how such mechanotransductive cascade of biochemical and mechanical patterning events ensures trans-scale direct cues of co-regulation of the microscopic biomolecular activities with the macroscopic morphological patterning. Mechanotransduction regulates many aspects of embryonic development including efficient collective cell behaviour, distant tissues morphogenesis coordination, and the robust coordination of tissue shape morphogenesis with differentiation.

Address

Mechanics and Genetics of Embryonic Development group, Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR168, Inserm, Marie Curie UnivParis 06, Institut Curie, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Corresponding author: Farge, Emmanuel (efarge@curie.fr)

Current Opinion in Chemical Biology 2018, 55:111–118

This review comes from a themed issue on **Differentiation and disease**

Edited by **Katja Röper** and **Xosé R. Bustelo**

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.07.003>

0955-0674/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Embryogenesis consists of the development of biomechanical morphology of tissues and biochemical cell differentiation patterns. In the developing embryo, the biomechanical and biochemical patterning were long considered as disconnected. The first was initially

thought to be exclusively regulated by Newton's laws of Physics, with tissue growth as a major driving force [1], while the second was subsequently thought to be merely induced by the biochemical cascade based on the interactions between the biomolecules produced by the genome [2,3].

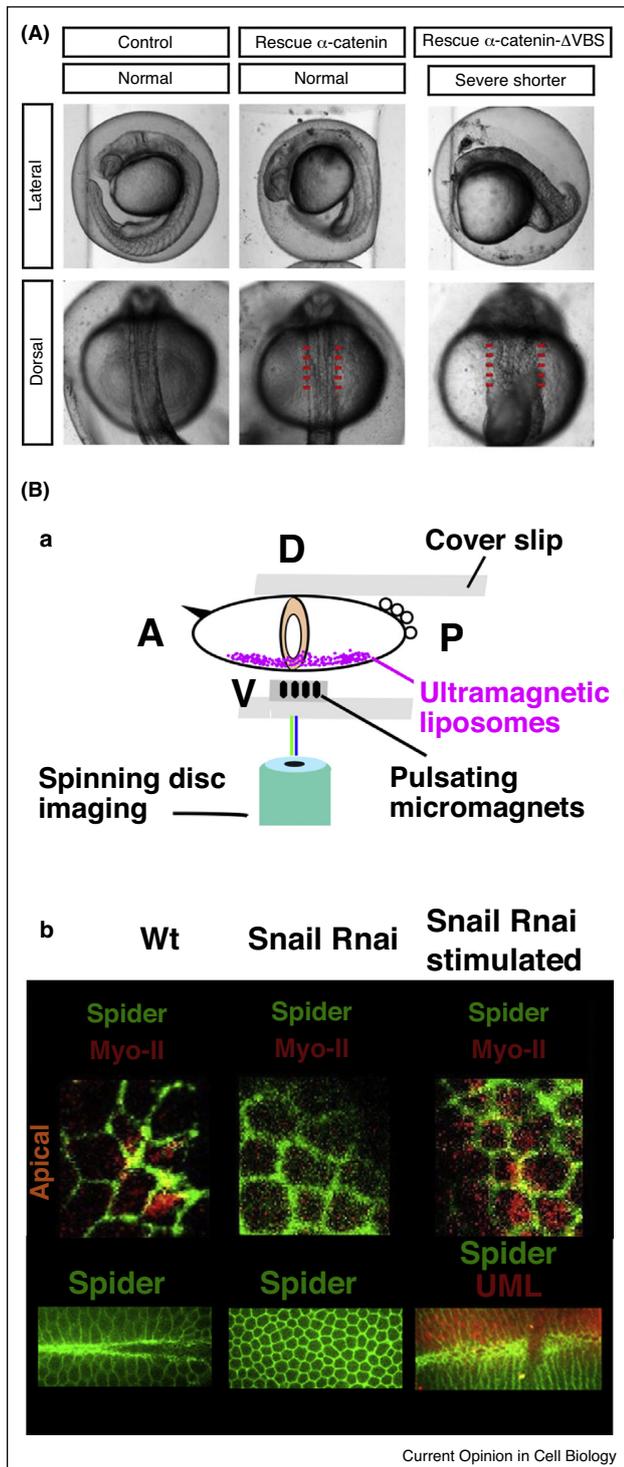
The biochemical regulation of embryonic mechanical patterning by the expression of master differentiation genes was discovered in the 90's, such as mesoderm invagination controlled by the expression of the genes *twist* and *snail* in *Drosophila melanogaster* embryos [4]. In addition, the antero-posterior patterning genes *bicoid*, *nanos* and *torso-like* are required for convergence-extension movements (C&E) at the onset of *Drosophila* embryo gastrulation [5]. Similarly, *Xwnt-5a* was suggested to be involved in C&E movements in *Xenopus* embryos [6] and *silberblick/wnt11* and *wnt5* were found to be necessary for proper C&E movements in zebrafish embryos [7].

The underlying molecular mechanisms downstream of this regulation are based on a genetic regulation of anisotropies in the intracellular concentration of a molecular motor: Myosin-II (Myo-II) [8]. For instance, the Twist and Snail proteins were found to be required for the medio-apical accumulation of Myo-II in *Drosophila* embryos. This acto-myosin meshwork constricts mesoderm cell apices resulting in an apical shrinkage that triggers the mesoderm epithelium invagination [9].

These findings interestingly showed that embryo morphogenesis, that obeys the laws of Newtonian Physics, is the product of the physical conditions and of the biochemical patterns, that both introduce at a given developmental stage the internal forces that will determine the next stage.

Inversely, it has been shown in the 2000s that biochemical developmental patterns at a given stage can also be the product of the biomechanical patterns of the precedent stage through mechanotransduction processes. This introduces at given developmental stages, new biochemical signal inputs of mechanical origin. For instance, in gastrulating *Drosophila* embryos, mechanical strains developed by C&E induce beta-catenin (β -cat) signalling activation. This activation leads to Twist expression in the anterior endoderm, and is vitally involved in functional anterior mid-gut cell differentiation at larvae stage

Figure 1



(A) Defect of embryonic convergent-extension morphogenesis development during late epiboly somitogenesis, in the *ctnna1* E- α -catenin mutant rescued with the E- α -catenin Δ VBS lacking the mechanosensitive Vinculin binding site, compared to rescued with the wild-type E- α -catenin. **(B-a)** Quantitative mimicking of soft Sna-dependent apex pulsations in *sna*-defective embryos lacking

[10,11]. Similarly, during bone development in mouse embryos, *sox9* is expressed downstream of β -cat mechanical activation in response to muscle spontaneous activity to prevent bone differentiation in joints [12].

Here we will review the findings and most recent advances in the field reporting the existence of such mechanotransductive cues in animal embryonic development *in vivo*. We will focus on the mechanotransductive trigger of active morphogenetic biomechanical patterning, and on cell biochemical differentiation and specification patterning. We will describe the physiological functions of such coupling between the developmental biochemical patterning cascade and biomechanical shape development. Based on this trans-scale deterministic co-regulation of molecular activities with macroscopic properties, we will present how long-range rapid mechanotransductive cell-cell interactions generate either collective cell behaviour or embryonic morphogenetic movement coordination. We will additionally discuss how it engenders robust coordination between biochemical and biomechanical morphogenesis during embryonic development.

The mechanical trigger of Myo-II dependent active biomechanical morphogenesis

Myo-II protein is the molecular motor driving forces in embryonic active morphogenetic movements. Its mechanosensitive behaviour was initially found in cell culture [13]. *In vivo*, a simple micro-pipet aspiration of *Drosophila* embryos ectoderm increases the junctional concentration of Myo-II, suggesting a re-enforcement of junctions. Myo-II concentration also increases in ectoderm tissue in response to the C&E morphogenetic movements of gastrulation in *Drosophila* embryos [14]. In addition to re-enforcing tissue resistance to deformation, tension also stabilizes Myo-II at the purse-string caused by a wound during *Drosophila* embryogenesis [15]. The purse string tension increases and generates the wound closure.

The generalisation of such mechanically induced re-enforcement of junctions and of tissue integrity in response to embryonic morphogenetic movements was recently observed in early zebrafish embryos. In mutants with central domain-defective α -catenin, a domain known to be mechanosensitive in cell culture, the mechanical strains due to gastrulation led to C&E and embryo elongation defects [16^{*}] (Figure 1A). In cell

pulsations (here *sna* RNAi, as well as *sna* and *halo sna* mutants –not shown) by magnetic forces generated with pulsatile micro-magnets on the order of the cell size applied on the mesoderm cells injected with ultra-magnetic liposomes, *in vivo*, **(b)** rescues the apical accumulation of Myo-II and of the mesoderm invagination from *sna*-defective embryos lacking apical stabilisation of Myo-II and mesoderm invagination (ventral views).

culture, such domains mechanically open to effectors such as Vinculin leading to the active re-enforcement of adherens junctions [17]. A similar molecular process was thus proposed to be at work to ensure normal C&E morphogenesis in response to the strains generated by the earliest embryonic morphogenetic movements [16^{*}]. A mechanosensitive maintenance of adherens junctions has also been demonstrated to preserve tissue integrity during *Drosophila* mesoderm invagination and during *C-elegans* embryo morphogenesis [18,19]. Interestingly, the Yap/Taz mechanosensitive signalling pathway [20] has also been found to be required for the maintenance of the overall shape of the zebrafish embryo. In this case, the Rho GTPase activating protein ARHGAP18 preserves the embryonic tissue stiffness against gravity-induced deformations in a Yap/Taz dependent process [21].

Yet, Myo-II mechanosensitivity is not only involved in the tissue resistance to endogenous morphogenetic movements. It also triggers morphogenetic movements in response to the mechanical strains developed by the morphogenetic movements of the precedent stage. Indeed, the Fog-dependent medio-apical accumulation of Myo-II — that leads to the epithelial mesodermal cells apex constrictions and to mesoderm invagination in *Drosophila* embryos — has been found to be mechanotransductively induced by the Snail-dependent cell apex pulsations that just precede.

First indicated by mechanical perturbations through indenting the embryo [22], this was demonstrated by the quantitative rescue of *sna*-dependent pulsations in *snail* mutants. A network of pulsating micromagnets was applied to *snail* mutant embryos injected with magnetic liposomes [23^{*}]. Such physiological mechanical rescue, of pure physical origin, quantitatively mimicked the Snail-dependent mechanical strains, and Fog-dependently rescued both the medio-apical accumulation of Myo-II and mesoderm invagination (Figure 1B).

As an underlying molecular mechanism, the *sna*-dependent apex pulsations were found to mechanically inhibit Fog endocytosis and to enhance Fog exocytosis, presumably by membrane flattening and tension increase, thereby triggering the Rho downstream pathway leading to medio-apical accumulation of Myo-II [22]. Interestingly, the existence of a defect of endocytosis in the mesoderm versus the ectoderm was recently corroborated in early gastrulating *Drosophila* embryos [24].

In addition to mechanotransductive cues, the shape of the embryo was found to determine the shape of the actomyosin meshwork [25].

Furthermore, the mechanical strains developed by mesoderm invagination stretches the posterior pole of the embryo, in which Fog is also expressed. As a

consequence, this leads to the Fog-dependent mechanotransductive activation of apical Myo-II accumulation and to the initiation of the posterior endoderm invagination [23^{*}]. This process, in turn, mechanically participates in the morphogenetic movement of C&E by antero-posterior cell elongation [26,27]. And this C&E morphogenetic movement also positively feeds back into apical Myo-II accumulation in the posterior endoderm and robustly participate together with mesoderm invagination in the initiation of the posterior endoderm invagination [23^{*}]. Thus, the mechanosensitive behaviour of Myo-II is at the node of an active self-induced biomechanical cascade of morphogenetic movements. Mechanotransductive feedback processes are also involved in organogenesis. The mechanical strains developed by contractile apoptotic cells were found to enhance junctional apico-basal Myo-II concentration in neighbouring cells, thereby leading to tissue folding in *Drosophila* leg joint formation [28]. Cells can also stock geometrical surrounding information via biochemical cues to control their own geometrical properties. In the *Drosophila* pupal epithelium, through the recruitment of Mud proteins, tricellular junctions (TCJs) orient cell division via the astral microtubules by pulling on the mitotic spindle [29^{**}]. Mechanotransduction is also involved in plant development. Meristem shaping and coordinated cell growth are regulated by mechano-sensitive microtubule reorganisation via Katanin [30,31].

An active biomechanical patterning cascade is thus at work during embryonic development, adding to the well-known biochemical inductive cascade of patterning gene expression.

Moreover, as we will see, the mechanical strains developed by the biomechanical cascade can also participate, in turn, to determine the biochemical patterning cascade.

The mechanical regulation of biochemical patterning

Myo-II is by far not the only biomolecule whose behaviour is mechanosensitive. Transcription or co-transcription factor activation can also be strain dependent. For instance, the transcription factor NF- κ B translocates into the nucleus in response to mechanical deformation in endothelial cells in culture leading to PDGF growth factor expression [32]. In zebrafish, laminar shear stress generated by blood flow induces Yap nuclear translocation. This transcription factor then stimulates endothelial cell division and contributes to vessel maintenance [33]. And Smad1 is one of the first transcription factors shown to be mechanotransductively involved in cell differentiation by triggering myoblast-osteoblast transdifferentiation [34].

In vivo, the β -cat protein is responsible for the mechanical induction of the *twist* mesodermal gene expression in the

early *Drosophila* ectoderm submitted to external uni-axial global deformation [10]. The mechanosensitivity of β -cat was found to vitally trigger the mechanical induction of Twist expression in the anterior endoderm. β -Cat activates the downstream differentiation of the anterior mid-gut following its mechanically induced partial release from the cell junctions and its transfer from the cytoplasm to the nucleus in response to C&E compression during gastrulation. To perturb mechanical strains in epithelium and inhibit the anterior endoderm compression within the wild-type genetic background (WT), compressing tissues were ablated with a two photons laser. To rescue physiological compressions in the WT, a magnetic field gradient was used to micromanipulate the neighbouring tissues loaded with super-paramagnetic nano-particles [11].

The β -cat mechanosensitivity is also an important mechanism to stimulate and trigger mesodermal genes expression in the *Drosophila* (Twist) and zebrafish (*brachyury*) embryos mesoderm, in response to its invagination and to epiboly initiation, respectively. Under mechanical tensions, Src42A phosphorylates the Y654- β -cat major site of interaction with E-cadherins (E-cad) leading to the release of a pool of β -cat from the junctions to the cytoplasm and the nucleus [35]. Mechanical induction might also be involved in *brachyury* expression during *Nematostella* gastrulation [36].

Interestingly in pathological contexts, β -cat mechanical activation, leading to the expression of tumorous target genes like *cyclin D1*, *myc* and *zeb-1* in strained healthy tissues, is also involved in tumor progression due to skin and breast tumours stiffness and colon tumor growth pressure *in vivo* [37,38]. We also can notice that treatments activating the β -cat pathway with mechanical vibrations in adipocytes, repressing the adipogenic Glycogene Synthase, are developed to fight against obesity [39].

β -cat mechanosensitivity was recently found to be physiologically involved in several distinct developmental processes. In particular, it was proposed to initiate feather follicle differentiation during chicken development. Indeed, in response to epidermis buckling under Myo-II contractile tension, β -cat becomes phosphorylated on Y654 and translocates into the nucleus of bent cell domains. When Myo-II contractile activity was blocked with blebbistatin, no tissue buckling was observed. As a result, β -cat activation and the expression of its target gene *bmp2*, known to be upstream of follicle cell differentiation, were inhibited [40**] (Figure 2A).

In addition to β -cat, phosphorylation of the mechanosensitive Yap factor was also recently found to regulate the earliest differentiation of inner-cell mass of pre-implantation mouse embryos, during cell engulfment morphogenesis. This follows the first asymmetric division after

fertilization, and was proposed to be the consequence of the high acto-myosin contraction of the cell engulfed by the less contractile one [41*]. The inhibition of the Myo-II contractile activity with blebbistatin prevents cell engulfment. As a result, in a doublet, both cells express inner cell-like markers, that is high levels of cytoplasmic phosphorylated-Yap and low levels of Cdx2 expression (Figure 2B).

We saw above how internal morphogenetic forces can regulate tissue developmental biochemical patterning. Interestingly, mechanical strains that are external to tissues can also influence biochemical development.

For instance, mechanical constraints applied by the uterus on the growing mouse embryo lead to the mechanical induction of Cer1 expression in its distal endoderm. This protein is involved in the determination of the antero-posterior axis of mouse embryonic development [42].

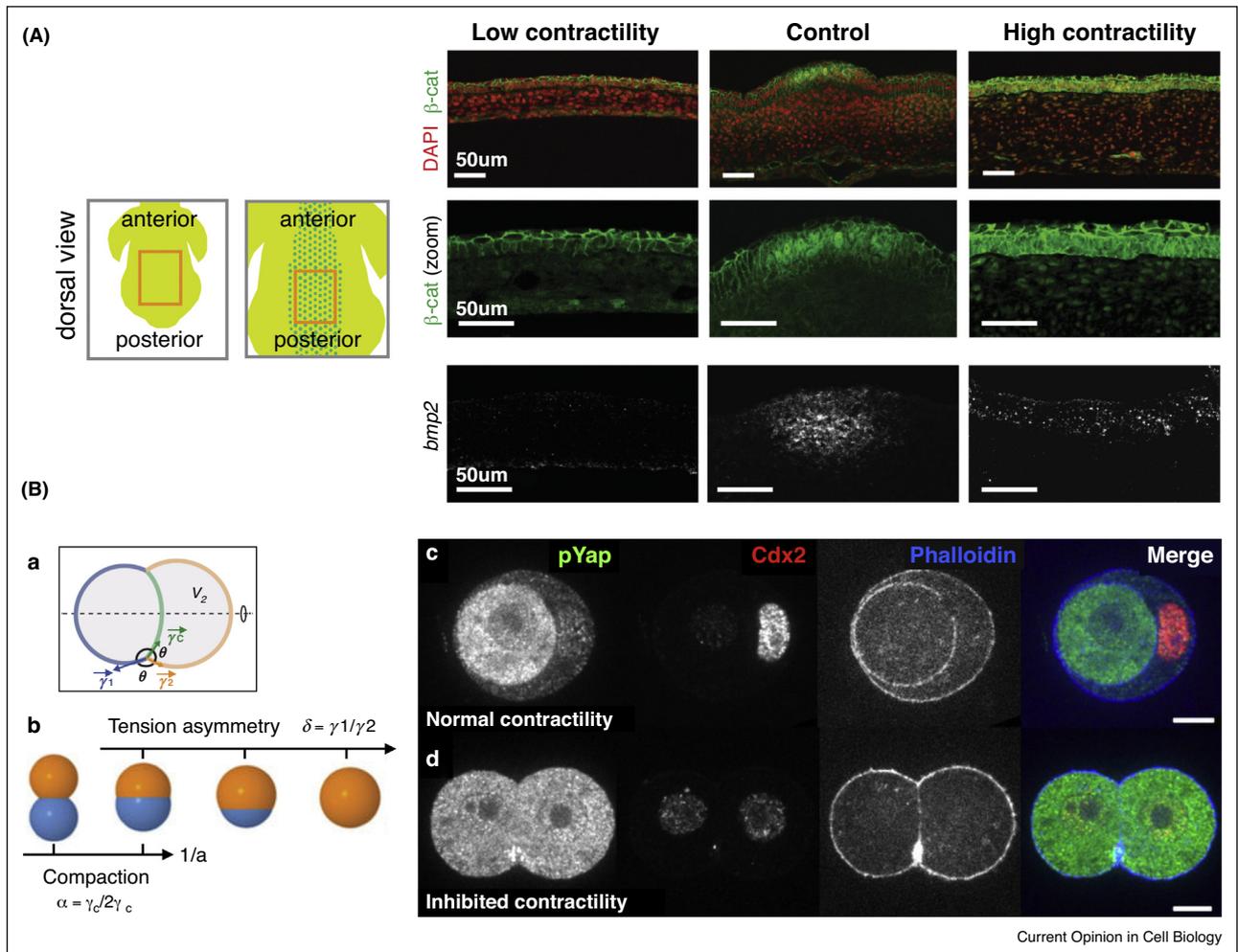
In late stages of zebrafish embryos development, the oscillatory shear stress induced by the blood flow stimulates the expression of the endocardial flow-responsive *klf2a* gene. This gene was found to control the fibronectin synthesis that initiates cardiac valve development through the canonical Wnt/ β -cat pathway [43,44].

In mouse embryos, the oscillatory shear stress of the lymphatic fluid enhances the β -cat signalling pathway in endothelial cells, and the expression of target genes, such as FOXC2, that regulates lymphatic vasculature development [45].

The integrative physiological functions of trans-scale mechanical and mechanotransductive cues in development

Predicting the macroscopic behaviours of living systems based on their molecular activities through an integrative reductionist approach from one scale to another remains an active field of biology. The challenge lies in untangling the complex interactions through different scales. In contrast, mechanical strains consist of a very simple cue, as it crosses all scales, thereby directly coupling the molecular microscopic with the macroscopic patterning scale. Indeed, as we saw, the Myo-II activity, which is biochemically patterned, generates mechanical strains leading to macroscopic biomechanical morphogenetic movements. These morphogenetic movements in turn mechanotransductively modulate the activity of Myo-II at the molecular level, which triggers other active morphogenetic movements. Macroscopic strains additionally regulate the biochemical activities leading to (co-)transcription factor nuclear translocation at the molecular level, thereby modulating developmental gene expression.

Figure 2



(A) Contractility triggers β -catenin nuclearisation in the forming primordium of early chicken embryos and is upstream of the primordia gene expression program. Contractility is low on the left due to blebbistatin treatment (25 μ M Bb) and high on the right due to high substrate stiffness without blebbistatin treatment (25 nM CA) compared to control conditions on the centre. β -catenin localization (IF), and *bmp2* expression (FISH) depends on the contractility and on the buckling deformation of the sample. **(B)** First morphogenetic movement of cell internalisation in mouse embryos mechanically depends on the cell contractility asymmetry and leads to asymmetric differentiation. **(a)** Diagram of cell doublet. γ_1 , γ_2 and γ_c are the surface tensions of the two cells and the contact. **(b)** Numerical simulation showing the equilibrium state of a doublet from a 16-cell-stage mouse embryo. The first cell fate depends on the equilibrium state of the doublet. **(c,d)** Immunostaining of control (25 μ M of non-efficient Bb) and inhibited by blebbistatin (25 μ M Bb) doublets showing p-Yap, the Cdx2 outer layer cells expression and phalloidin.

In other words, in embryonic patterning, the mechano-sensitivity of the biochemical and active biomechanical components allows mechanical cues to be privileged mode of direct interaction between the biochemically active and reactive microscopic molecular regulators of embryogenesis and the macroscopic morphological phenotype of the embryo [46,47].

Among the physiological functions of such mechano-biochemical cascade that underlie embryogenesis, we can notice integrative rapid and long-range cell-cell interactions. For instance, in the *Drosophila* embryo, line

tensions of acto-myosin cables robustly maintain differentiation boundaries across tissues [48,49]. Also, collective cell apex constrictions, coordinated across the mesoderm tissue by rapid and long-range mechanotransductive cell-cell interactions, are required for tissue invagination at gastrulation [23*].

Physiological functions also reveal a robust coordination between biomechanical and biochemical patterning. For instance, the mechanical induction of Twist expression ensures that only the internalized tissue at gastrulation will maintain Twist expression, and will *in fine*

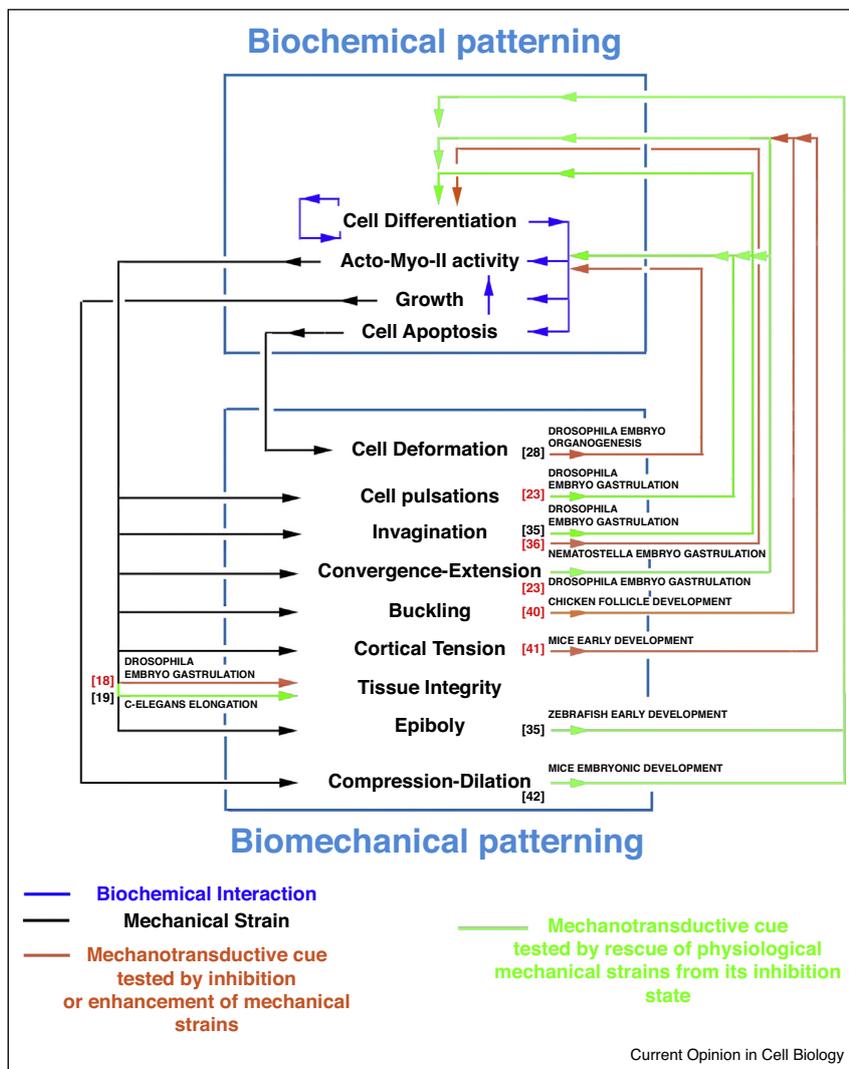
differentiate into mesodermal internal organs [35]. Similarly in early mouse embryos only the not-ingulfted cells express the *Cxd2* gene responsible for the trophectoderm identity, and will not develop as an embryonic tissue [41*].

Such mechanical cues were additionally found, and proposed, to mediate long-range coordination of biomechanical and biochemical patterning, throughout the whole embryo. For instance, ventral mesoderm invagination triggers the initiation of posterior endoderm invagination within the 2 min time scale, thereby coordinating mesoderm with endoderm invagination at gastrulation [23*]. In addition, germ-band extension mediates both the anterior

endoderm specification — through β -cat activation — and the posterior endoderm invagination — through the *Fog/MyoII* pathway —, thereby synchronising two processes 100 cells (500 μ m) apart [11,23*]. These effects may be of particular importance under conditions in which the dynamics and complex topology of the embryonic tissues prevent the establishment of the long-range morphogen gradients that are efficient at earliest stages where cells are arranged in simpler, static geometrical patterns.

And indeed, integrating both the macroscopic biomechanical and microscopic biochemical patterns through such reciprocal trans-scale mechanical and mechanotransductive interaction, explains

Figure 3



Synthesis of the findings of mechanotransductive cues found as involved in embryonic development (green and brown arrows), within the general context of biochemical interactions (arrows in blue) and of the biochemical regulation of biomechanical patterning (arrows in black). Most recent findings of the two last years are referred in red.

embryonic processes as important as gastrulation, initial tissue differentiation, maintenance of patterning boundaries, coordination of morphogenetic movements and the coordination of biomechanical/biochemical patterning (Figure 3).

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

The 'Mechanics and Genetics of Embryonic and Tumor Development' lab is currently funded by the FRM (Grant # DEQ20150331702), the ANR (Grant # 16CE14002801), and the PSL-IRIS-OCAV (Grant # ANR1-10-IDEX-0001-02 PSL). Tatiana Merle is funded by the ED-PIF (doctoral funding 1767/2014) and the FRM (Grant # FDT20170436944).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Thomson DAW: *On Growth and Form*. 1917.
 2. Lewis EB: **A gene complex controlling segmentation in *Drosophila***. *Nature* 1978, **276**:565-570.
 3. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E: **Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila***. *Nature* 1980, **287**:795-801.
 4. Leptin M: **Twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development**. *Genes Dev* 1991, **5**:1568-1576.
 5. Irvine KD, Wieschaus E: **Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes**. *Development* 1994, **120**:827-841.
 6. Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J, Fraser S: **Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis***. *Development* 1993, **119**:97-111.
 7. Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW: **Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation**. *Nature* 2000, **405**:76-81.
 8. Young PE, Pesacreta TC, Kiehart DP: **Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during *Drosophila* embryogenesis**. *Development* 1991, **111**:1-14.
 9. Dawes-Hoang RE, Parmar KM, Christiansen AE, Phelps CB, Brand AH: **Wieschaus EF: folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization**. *Development* 2005, **132**:4165-4178.
 10. Farge E: **Mechanical induction of twist in the *Drosophila* foregut/stomodaeal primordium**. *Curr Biol* 2003, **13**:1365-1377.
 11. Desprat N, Supatto W, Pouille P-A, Beaupaire E, Farge E: **Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos**. *Dev Cell* 2008, **15**:470-477.
 12. Kahn J, Shwartz Y, Blitz E, Krief S, Sharir A, Breitel DA, Rattenbach R, Relaix F, Maire P, Rountree RB *et al.*: **Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate**. *Dev Cell* 2009, **16**:734-743.
 13. Effler JC, Kee YS, Berk JM, Tran MN, Iglesias PA, Robinson DN: **Mitosis-specific mechanosensing and contractile-protein redistribution control cell shape**. *Curr Biol* 2006, **16**:1962-1967.
 14. Fernandez-Gonzalez R, Simoes Sde M, Roper JC, Eaton S, Zallen JA: **Myosin II dynamics are regulated by tension in intercalating cells**. *Dev Cell* 2009, **17**:736-743.
 15. Kobb AB, Zulueta-Coarasa T, Fernandez-Gonzalez R: **Tension regulates myosin dynamics during *Drosophila* embryonic wound repair**. *J Cell Sci* 2017, **130**:689-696.
 16. Han MK, Hoijman E, Noel E, Garric L, Bakkens J, de Rooij J: **alphaE-catenin-dependent mechanotransduction is essential for proper convergent extension in zebrafish**. *Biol Open* 2016, **5**:1461-1472.
- Here, Han et al. confirmed the key role of α -cat mechanosensitivity in the correct regulation of C&E movements. In α -cat mutants, they rescued cadherin adhesion, but not α -cat mechanosensitive function, by injecting α -cat mRNAs with a deficient mechanotransductive site: the Vinculin interacting site domain. In cell culture, this domain mechanically opens to Vinculin when α -cat is stretched leading to adherens junction re-enforcement. Interestingly, mRNA injections led to defects in the polarity of mesoderm cell movements towards the dorsal pole of the embryo, possibly due to adherens junctions remodeling/stabilization defects. This generated defects in the C&E movement required for proper embryonic morphogenesis, including embryo elongation, demonstrating the necessity for this mechanotransductive site in zebrafish development.
17. Yao M, Qiu W, Liu R, Efremov AK, Cong P, Seddiki R, Payre M, Lim CT, Ladoux B, Mege RM *et al.*: **Force-dependent conformational switch of alpha-catenin controls vinculin binding**. *Nat Commun* 2014, **5**:4525.
 18. Weng M, Wieschaus E: **Myosin-dependent remodeling of adherens junctions protects junctions from Snail-dependent disassembly**. *J Cell Biol* 2016, **212**:219-229.
 19. Zhang H, Landmann F, Zahreddine H, Rodriguez D, Koch M, Labouesse M: **A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis**. *Nature* 2011, **471**:99-103.
 20. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S *et al.*: **Role of YAP/TAZ in mechanotransduction**. *Nature* 2011, **474**:179-183.
 21. Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrmdt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SF, Osada Y *et al.*: **YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape**. *Nature* 2015, **521**:217-221.
 22. Pouille PA, Ahmadi P, Brunet AC, Farge E: **Mechanical signals trigger myosin II redistribution and mesoderm invagination in *Drosophila* embryos**. *Sci Signal* 2009, **2**:ra16.
 23. Mitrossilis D, Roper JC, Le Roy D, Driquez B, Michel A, Menager C, Shaw G, Le Denmat S, Ranno L, Dumas-Bouchiat F *et al.*: **Mechanotransductive cascade of Myo-II dependent mesoderm and endoderm invaginations in embryo gastrulation**. *Nat Commun* 2017, **8**:13883.
- Here, to rescue the *snail*-dependent soft fluctuations, Mitrossilis et al. used a network of oscillating micromagnets in front of the mesoderm of *snail* mutant embryos injected with ultra-magnetic liposomes. Importantly, this network could generate pulsatile magnetic forces and restore dynamically the missing forces *in vivo* at the cell-scale resolution. Mitrossilis et al. rescued both Myo-II apical accumulation and mesoderm invagination demonstrating that Fog-dependent mechanotransductive cues trigger gastrulation in response to *snail*-dependent apex pulsations *in vivo*. This demonstrated that gastrulation is mechanotransductively triggered by cell apex size fluctuations in *Drosophila* embryos.
24. Jha A, van Zanten TS, Philippe JM, Mayor S, Lecuit T: **Quantitative control of GPCR organization and signaling by endocytosis in epithelial morphogenesis**. *Curr Biol* 2018.
 25. Chanet S, Miller CJ, Vaishnav ED, Ermentrout B, Davidson LA, Martin AC: **Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force**. *Nat Commun* 2017, **8**:15014.
 26. Lye CM, Blanchard GB, Naylor HW, Muresan L, Huisken J, Adams RJ, Sanson B: **Mechanical coupling between endoderm invagination and axis extension in *Drosophila***. *PLoS Biol* 2015, **13**e1002292.
 27. Collinet C, Rauzi M, Lenne PF, Lecuit T: **Local and tissue-scale forces drive oriented junction growth during tissue extension**. *Nat Cell Biol* 2015, **17**:1247-1258.
 28. Monier B, Gettings M, Gay G, Mangeat T, Schott S, Guarner A, Suzanne M: **Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding**. *Nature* 2015, **518**:245-248.

29. Bosveld F, Markova O, Guirao B, Martin C, Wang Z, Pierre A, ●● Balakireva M, Gague I, Ainslie A, Christophorou N *et al.*: **Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis.** *Nature* 2016, **530**:495-498.

In *Drosophila* pupal epithelium, cells round up during mitosis and therefore lose their interphase shape anisotropy. In these conditions, Bosveld *et al.* asked how cells can achieve the Herwig's rule that stipulates that cells will divide along their long-axis direction. They showed that tricellular junctions (TCJs) recruit the Dynein-associated protein Mud to exert forces on the mitotic spindle and control its position during mitosis. Using laser ablation, they could show that Mud pulls forces via the astral microtubules. Remarkably, the predictions of the associated Mud-model were significantly better than the former Shape-model ones. By showing how TCJs play a major role in orienting cell divisions in *Drosophila* embryo epithelium, this study describes how cells can stock geometrical surrounding information via biochemical cues and control their own geometrical properties.

30. Uyttewaal M, Burian A, Alim K, Landrein B, Borowska-Wykret D, Dedieu A, Peaucelle A, Ludynia M, Traas J, Boudaoud A *et al.*: **Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in Arabidopsis.** *Cell* 2012, **149**:439-451.
31. Verger S, Long Y, Boudaoud A, Hamant O: **A tension-adhesion feedback loop in plant epidermis.** *Elife* 2018, **7**.
32. Hay DC, Beers C, Cameron V, Thomson L, Flitney FW, Hay RT: **Activation of NF-kappaB nuclear transcription factor by flow in human endothelial cells.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1642**:33-44.
33. Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, Terai K, Fukui H, Fukuhara S, Ando K, Miyazaki T, Yokota Y, Schmelzer E *et al.*: **Flow-dependent endothelial YAP regulation contributes to vessel maintenance.** *Dev Cell* 2017, **40**:523-536 e526.
34. Rauch C, Brunet AC, Deleule J, Farge E: **C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **283**:C235-243.
35. Brunet T, Bouclet A, Ahmadi P, Mitrossilis D, Driquez B, Brunet A-C, Henry L, Serman F, Béalle G, Ménager C *et al.*: **Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria.** *Nat Commun* 2013, **4**.
36. Pukhlyakova E, Aman AJ, Elsayad K, Technau U: **beta-Catenin-dependent mechanotransduction dates back to the common ancestor of Cnidaria and Bilateria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018.
37. Fernandez-Sanchez ME, Barbier S, Whitehead J, Bealle G, Michel A, Latorre-Ossa H, Rey C, Fouassier L, Claperon A, Brulle L *et al.*: **Mechanical induction of the tumorigenic beta-catenin pathway by tumour growth pressure.** *Nature* 2015, **523**:92-95.
38. Samuel MS, Lopez JI, McGhee EJ, Croft DR, Strachan D, Timpson P, Munro J, Schroder E, Zhou J, Brunton VG *et al.*: **Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and beta-catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth.** *Cancer Cell* 2011, **19**:776-791.
39. Shoham N, Gefen A: **Mechanotransduction in adipocytes.** *J Biomech* 2012, **45**:1-8.
40. Shyer AE, Rodrigues AR, Schroeder GG, Kassianidou E, Kumar S, ●● Harland RM: **Emergent cellular self-organization and mechanosensation initiate follicle pattern in the avian skin.** *Science* 2017, **357**:811-815.

Shyer *et al.* used nascent skin of chicken embryos to study the follicle formation. They importantly propose that the self-cellular aggregation, giving rise to tissue compaction and buckling, triggers the β -catenin

activation and initiates the downstream follicle gene *bmp2*. Interestingly, they could demonstrate that β -cat is activated through the phosphorylation of its highly conserved Y654 site [50]. These findings are consistent with the observations in *Drosophila* and zebrafish embryos [35]. By blocking acto-myosin tension with blebbistatin, the authors blocked both the follicle tissue buckling, and the activation of the β -cat pathway with the expression of its target gene *bmp2* that initiates follicle differentiation and formation. By increasing the stiffness of the cell culture substrate, the authors prevented buckling and presumably increased the mean tension overall the tissue, consistently leading to the ectopic activation of the β -cat pathway and of the expression of its target gene *bmp2*.

41. Maitre JL, Turlier H, Illukkumbura R, Eismann B, Niwayama R, ● Nedelec F, Hiiragi T: **Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification.** *Nature* 2016, **536**:344-348.

Maitre *et al.* proposed that the first morphogenetic movements — here engulfment — of the mouse vertebrate embryo is crucial for primary differentiation between embryonic cell mass and cell layer external tissues. The differentiation of the inner cell mass, that will eventually lead to the embryonic tissue in contrast to the external future cell layer, is importantly proposed to be mechanically regulated through the signalling of the Yap mechanosensitive factor. By blocking acto-myosin contractibility with blebbistatin, the authors blocked cell engulfment, Yap signalling pathway activation and the expression of its target gene *Cdx2* marker of outer cell differentiation. The rescue of outer-cell-like fate with physical tools mimicking physiological cortical tension in blebbistatin-treated embryos would definitively demonstrate that such fate specification in mouse embryos is mechanically induced.

42. Hiramatsu R, Matsuoka T, Kimura-Yoshida C, Han SW, Mochida K, Adachi T, Takayama S, Matsuo I: **External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos.** *Dev Cell* 2013, **27**:131-144.
43. Steed E, Faggianelli N, Roth S, Ramspacher C, Concordet JP, Vermot J: **Klf2a couples mechanotransduction and zebrafish valve morphogenesis through fibronectin synthesis.** *Nat Commun* 2016, **7**:11646.
44. Goddard LM, Duchemin AL, Ramalingan H, Wu B, Chen M, Bamezai S, Yang J, Li L, Morley MP, Wang T *et al.*: **Hemodynamic forces sculpt developing heart valves through a KLF2-WNT9B paracrine signaling axis.** *Dev Cell* 2017, **43**:274-289 e275.
45. Cha B, Geng X, Mahamud MR, Fu J, Mukherjee A, Kim Y, Jho EH, Kim TH, Kahn ML, Xia L *et al.*: **Mechanotransduction activates canonical Wnt/beta-catenin signaling to promote lymphatic vascular patterning and the development of lymphatic and lymphovenous valves.** *Genes Dev* 2016, **30**:1454-1469.
46. Chan CJ, Heisenberg CP, Hiiragi T: **Coordination of morphogenesis and cell-fate specification in development.** *Curr Biol* 2017, **27**:R1024-R1035.
47. Fernandez-Sanchez ME, Serman F, Ahmadi P, Farge E: **Mechanical induction in embryonic development and tumor growth integrative cues through molecular to multicellular interplay and evolutionary perspectives.** *Methods Cell Biol* 2010, **98**:295-321.
48. Monier B, Pelissier-Monier A, Brand AH, Sanson B: **An actomyosin-based barrier inhibits cell mixing at compartmental boundaries in Drosophila embryos.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:60-65 sup pp 61-69.
49. Aliee M, Roper JC, Landsberg KP, Pentzold C, Widmann TJ, Julicher F, Dahmann C: **Physical mechanisms shaping the Drosophila dorsoventral compartment boundary.** *Curr Biol* 2012, **22**:967-976.

Bibliographie

- A.M. Abdol, Andrew Bedard, Imke Lánský, and J.A. Kaandorp. High-throughput method for extracting and visualizing the spatial gene expressions from in situ hybridization images : A case study of the early development of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Gene Expression Patterns*, 27 :36–45, January 2018. ISSN 1567133X. doi : 10.1016/j.gep.2017.10.005. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567133X17301151>. 99, 105
- Amir M. Abdol, Eric Röttinger, Fredrik Jansson, and Jaap A. Kaandorp. A novel technique to combine and analyse spatial and temporal expression datasets : A case study with the sea anemone *Nematostella vectensis* to identify potential gene interactions. *Developmental Biology*, 428(1) :204–214, August 2017. ISSN 00121606. doi : 10.1016/j.ydbio.2017.06.004. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160617301008>. 32, 33, 34, 99, 106
- John Alberts, Bruce ; Wilson. *Biologie molculaire de la cellule*. Medecine Sciences, 1993. 8
- Aldine Amiel and Evelyn Houliston. Three distinct rna localization mechanisms contribute to oocyte polarity establishment in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Developmental Biology*, 327(1) :191 – 203, 2009. ISSN 0012-1606. doi : <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.007>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160608014231>. 48
- F. J. Ayala, A. Rzhetsky, and F. J. Ayala. Origin of the metazoan phyla : Molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2) :606–611, January 1998. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.95.2.606. URL <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.2.606>. 18

- Daniel Botman, Eric Röttinger, Mark Q. Martindale, Johann de Jong, and Jaap A. Kaandorp. A Computational Approach towards a Gene Regulatory Network for the Developing *Nematostella vectensis* Gut. *PLoS ONE*, 9(7) :e103341, July 2014. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0103341. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103341>. 81
- Thibaut Brunet, Adrien Bouclet, Padra Ahmadi, Démosthène Mitrossilis, Benjamin Driquez, Anne-Christine Brunet, Laurent Henry, Fanny Serman, Gaëlle Béalle, Christine Ménager, Frédéric Dumas-Bouchiat, Dominique Givord, Constantin Yanicostas, Damien Le-Roy, Nora M. Dempsey, Anne Plessis, and Emmanuel Farge. Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechano-transduction in Bilateria. *Nature Communications*, 4, November 2013. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/ncomms3821. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms3821>. 16, 19, 21, 22, 25, 34, 36, 37, 80, 88, 100, 105, 112, 113, 123
- Andrés E. Carrasco, William McGinnis, Walter J. Gehring, and Eddy M. De Robertis. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell*, 37(2) : 409–414, June 1984. ISSN 00928674. doi : 10.1016/0092-8674(84)90371-4. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867484903714>. 18
- Sean B. Carroll. *Endless forms most beautiful : the new science of evo devo and the making of the animal kingdom*. Norton, New York, 1st ed edition, 2005. ISBN 978-0-393-06016-4. 18
- Chii J. Chan, Carl-Philipp Heisenberg, and Takashi Hiragi. Coordination of Morphogenesis and Cell-Fate Specification in Development. *Current Biology*, 27(18) :R1024–R1035, September 2017. ISSN 09609822. doi : 10.1016/j.cub.2017.07.010. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982217308680>. 15, 112
- Paul Chesley. Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *Journal of Experimental Zoology*, 70 :429–459, May 1935. doi : 10.1002/jez.1400700306. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jez.1400700306>. 105
- Jerry A. Coyne. Switching on evolution. *Nature*, 435(7045) :1029–1030, June 2005. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi : 10.1038/4351029a. URL <http://www.nature.com/articles/4351029a>. 19

- R. S. Darken. The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *The EMBO Journal*, 21(5) :976–985, March 2002. ISSN 14602075. doi : 10.1093/emboj/21.5.976. URL <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/21.5.976>. 30, 102
- R. E. Dawes-Hoang. folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization. *Development*, 132(18) :4165–4178, August 2005. ISSN 0950-1991, 1477-9129. doi : 10.1242/dev.01938. URL <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01938>. 10
- Desprat. Tissue Deformation Modulates Twist Expression to Determine Anterior Midgut Differentiation in *Drosophila* Embryos. *Developmental Cell*, 15(3), 2008. ISSN 15345807. doi : 10.1016/j.devcel.2008.07.009. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580708002888>. 14, 16, 17, 22
- Wolfgang Driever and Christiane Nüsslein-Volhard. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell*, 54(1) :95–104, July 1988. ISSN 00928674. doi : 10.1016/0092-8674(88)90183-3. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867488901833>. 7
- Timothy Q. DuBuc, Thomas B. Stephenson, Amber Q. Rock, and Mark Q. Martindale. Hox and Wnt pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation. *Nature Communications*, 9(1), December 2018. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/s41467-018-04184-x. URL <http://www.nature.com/articles/s41467-018-04184-x>. 27
- Christopher C. DuFort, Matthew J. Paszek, and Valerie M. Weaver. Balancing forces : architectural control of mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(5) :308–319, May 2011. ISSN 1471-0072, 1471-0080. doi : 10.1038/nrm3112. URL <http://www.nature.com/articles/nrm3112>. 6, 7, 13
- Sirio Dupont, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giullitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, Jimmy Le Digabel, Mattia Forcato, Silvio Bicciato, Nicola Elvassore, and Stefano Piccolo. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474 :179, June 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature10137>. 12
- Sevi Durdu, Murat Iskar, Celine Revenu, Nicole Schieber, Andreas Kunze, Peer Bork, Yannick Schwab, and Darren Gilmour. Luminal signalling links cell com-

- munication to tissue architecture during organogenesis. *Nature*, 515 :120, October 2014. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature13852>. 15
- Janet C. Effler, Yee-Seir Kee, Jason M. Berk, Minhchau N. Tran, Pablo A. Iglesias, and Douglas N. Robinson. Mitosis-Specific Mechanosensing and Contractile-Protein Redistribution Control Cell Shape. *Current Biology*, 16(19) :1962–1967, October 2006. ISSN 09609822. doi : 10.1016/j.cub.2006.08.027. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206020380>. 11
- Ulf Ekelund, Herve Besson, Jian'an Luan, Anne M May, Stephen J Sharp, Søren Brage, Noemie Travier, Antonio Agudo, Nadia Slimani, Sabina Rinaldi, Mazda Jenab, Teresa Norat, Traci Mouw, Sabine Rohrmann, Rudolf Kaaks, Manuela M Bergmann, Heiner Boeing, Françoise Clavel-Chapelon, Marie-Christine Boutron-Ruault, Kim Overvad, Marianne Uhre Jakobsen, Nina Føns Johnsen, Jytte Halkjaer, Carlos A Gonzalez, Laudina Rodriguez, Maria José Sanchez, Larraitz Arriola, Aurelio Barricarte, Carmen Navarro, Timothy J Key, Elisabeth A Spencer, Philippos Orfanos, Androniki Naska, Antonia Trichopoulou, Jonas Manjer, Eiliv Lund, Dominico Palli, Valeria Pala, Paolo Vineis, Amalia Mattiello, Rosario Tumino, H Bas Bueno-de Mesquita, Saskia W van den Berg, Andreani D Odysseos, Elio Riboli, Nicolas J Wareham, and Petra H Peeters. Physical activity and gain in abdominal adiposity and body weight : prospective cohort study in 288,498 men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4) :826–835, April 2011. ISSN 0002-9165, 1938-3207. doi : 10.3945/ajcn.110.006593. URL <https://academic.oup.com/ajcn/article/93/4/826/4597734>. 124
- Emmanuel Farge. Mechanical Induction of Twist in the Drosophila Foregut/Stomodaeal Primordium. *Current Biology*, 13(16) :1365–1377, August 2003. ISSN 09609822. doi : 10.1016/S0960-9822(03)00576-1. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982203005761>. 14, 16, 17, 22
- Rodrigo Fernandez-Gonzalez, Sérgio de Matos Simoes, Jens-Christian Röper, Suzanne Eaton, and Jennifer A. Zallen. Myosin II Dynamics Are Regulated by Tension in Intercalating Cells. *Developmental Cell*, 17(5) :736–743, November 2009. ISSN 15345807. doi : 10.1016/j.devcel.2009.09.003. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580709003852>. 11
- María Elena Fernández-Sánchez, Sandrine Barbier, Joanne Whitehead, Gaëlle

- Béalle, Aude Michel, Heldmuth Latorre-Ossa, Colette Rey, Laura Fouassier, Audrey Claperon, Laura Brullé, Elodie Girard, Nicolas Servant, Thomas Rio-Frio, Hélène Marie, Sylviane Lesieur, Chantal Housset, Jean-Luc Gennisson, Mickaël Tanter, Christine Ménager, Silvia Fre, Sylvie Robine, and Emmanuel Farge. Mechanical induction of the tumorigenic β -catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature*, 523 :92 EP –, 05 2015. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature14329>. 25, 80, 124
- Maria-Elena Fernandez-Sanchez, Thibaut Brunet, Jens-Christian Röper, and Emmanuel Farge. Mechanotransduction's impact on animal development, evolution, and tumorigenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31 :373–397, 2015. ISSN 1530-8995. doi : 10.1146/annurev-cellbio-102314-112441. 124
- John R. Finnerty, Kevin Pang, Pat Burton, Dave Paulson, and Mark Q. Martindale. Origins of bilateral symmetry : Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675) :1335–1337, May 2004. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1091946. 28
- Jens H. Fritzenwanker and Ulrich Technau. Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Development Genes and Evolution*, 212(2) :99–103, March 2002. ISSN 0949944X. doi : 10.1007/s00427-002-0214-7. URL <http://link.springer.com/10.1007/s00427-002-0214-7>. 40
- Jens H. Fritzenwanker, Grigory Genikhovich, Yulia Kraus, and Ulrich Technau. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Developmental Biology*, 310(2) :264–279, October 2007. ISSN 00121606. doi : 10.1016/j.ydbio.2007.07.029. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607012171>. 44
- G. Genikhovich and U. Technau. Induction of Spawning in the Starlet Sea Anemone *Nematostella vectensis*, In Vitro Fertilization of Gametes, and Dejellying of Zygotes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(9) :pdb.prot5281–pdb.prot5281, September 2009a. ISSN 1559-6095. doi : 10.1101/pdb.prot5281. URL <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot5281>. 40
- G. Genikhovich and U. Technau. In Situ Hybridization of Starlet Sea Anemone (*Nematostella vectensis*) Embryos, Larvae, and Polyps. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(9) :pdb.prot5282–pdb.prot5282, September 2009b. ISSN 1559-6095.

- doi : 10.1101/pdb.prot5282. URL <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot5282>. 48
- George E. Gentsch, Nick D.L. Owens, Stephen R. Martin, Paul Piccinelli, Tiago Faial, Matthew W.B. Trotter, Michael J. Gilchrist, and James C. Smith. In Vivo T-Box Transcription Factor Profiling Reveals Joint Regulation of Embryonic Neuromesodermal Bipotency. *Cell Reports*, 4 :1185–1196, September 2013. doi : 10.1016/j.celrep.2013.08.012. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124713004361>. 105
- Darren Gilmour, Martina Rembold, and Maria Leptin. From morphogen to morphogenesis and back. *Nature*, 541(7637) :311–320, January 2017. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi : 10.1038/nature21348. URL <http://www.nature.com/articles/nature21348>. 112
- N. W. Goehring, P. K. Trong, J. S. Bois, D. Chowdhury, E. M. Nicola, A. A. Hyman, and S. W. Grill. Polarization of PAR Proteins by Advective Triggering of a Pattern-Forming System. *Science*, 334(6059) :1137–1141, November 2011. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.1208619. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208619>. 15
- Mitchell K. L. Han, Esteban Hoijman, Emily Noël, Laurence Garric, Jeroen Bakkers, and Johan de Rooij. E-catenin-dependent mechanotransduction is essential for proper convergent extension in zebrafish. *Biology Open*, 5(10) : 1461–1472, October 2016. ISSN 2046-6390. doi : 10.1242/bio.021378. URL <http://bio.biologists.org/lookup/doi/10.1242/bio.021378>. 12
- Cadet Hand and Kevin R Uhlinger. The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone *nematostella vectensis*. *The Biological bulletin.*, 182 :169–176, 1992. URL <https://www.biodiversitylibrary.org/part/8125>. 26, 40, 44
- Carl-Philipp Heisenberg, Masazumi Tada, Gerd-Jörg Rauch, Leonor Saúde, Miguel L. Concha, Robert Geisler, Derek L. Stemple, James C. Smith, and Stephen W. Wilson. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*, 405 :76, May 2000. URL <http://dx.doi.org/10.1038/35011068>. 7

- Andreas Hejnol, Matthias Obst, Alexandros Stamatakis, Michael Ott, Greg W. Rouse, Gregory D. Edgecombe, Pedro Martinez, Jaume Baguñà, Xavier Bailly, Ulf Jondelius, Matthias Wiens, Werner E. G. Müller, Elaine Seaver, Ward C. Wheeler, Mark Q. Martindale, Gonzalo Giribet, and Casey W. Dunn. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proceedings. Biological Sciences*, 276(1677) :4261–4270, December 2009. ISSN 1471-2954. doi : 10.1098/rspb.2009.0896. 27
- Denis Herman. L'origine de la gastrulation. 1997. URL http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/591/MS_1997_12_1503.pdf?sequence=9&isAllowed=y. 19
- Jay R. Hove, Reinhard W. Köster, Arian S. Forouhar, Gabriel Acevedo-Bolton, Scott E. Fraser, and Morteza Gharib. Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature*, 421 :172, January 2003. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature01282>. 14
- Hui-Chuan Huang and Peter S. Klein. The Frizzled family : receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology*, 5(7) :234, 2004. ISSN 1474-760X. doi : 10.1186/gb-2004-5-7-234. 104
- Hyman. *The Invertebrates-Protozoa Through Ctenophora*. 1923. URL <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.461506/page/n0>. 19
- Wieschaus E. Irvine KD. Cell intercalation during drosophila germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development*, 120(1), 1994. 7
- Stefan M Jahnel, Manfred Walzl, and Ulrich Technau. Development and epithelial organisation of muscle cells in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Frontiers in Zoology*, 11(1) :44, 2014. ISSN 1742-9994. doi : 10.1186/1742-9994-11-44. URL <http://www.frontiersinzoology.com/content/11/1/44>. 28
- Jason R. Jessen, Jacek Topczewski, Stephanie Bingham, Diane S. Sepich, Florence Marlow, Anand Chandrasekhar, and Lilianna Solnica-Krezel. Zebrafish trilobite identifies new roles for *Strabismus* in gastrulation and neuronal movements. *Nature Cell Biology*, 4(8) :610–615, August 2002. ISSN 1465-7392. doi : 10.1038/ncb828. 102, 123

- G. Jägersten. *On the Early Phylogeny of the Metazoa : The Bilaterogastraea Theory*. Almqvist & Wiksells Boktr., 1955. URL <https://books.google.fr/books?id=iJF-GwAACAAJ>. 19
- Kahn. Muscle Contraction Is Necessary to Maintain Joint Progenitor Cell Fate. 16, 2009. ISSN 15345807. doi : <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.013>. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580709001750>. 16
- Iva Kelava, Fabian Rentzsch, and Ulrich Technau. Evolution of eumetazoan nervous systems : insights from cnidarians. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 370(1684) :20150065, December 2015. ISSN 0962-8436, 1471-2970. doi : 10.1098/rstb.2015.0065. URL <http://rstb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rstb.2015.0065>. 27
- Anna B. Kobb, Teresa Zulueta-Coarasa, and Rodrigo Fernandez-Gonzalez. Tension regulates myosin dynamics during *Drosophila* embryonic wound repair. *Journal of Cell Science*, 130(4) :689–696, February 2017. ISSN 0021-9533, 1477-9137. doi : 10.1242/jcs.196139. URL <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.196139>. 11
- E.S. Kornikova, T.G. Troshina, S.V. Kremnyov, and L.V. Belousov. Neuro-mesodermal patterns in artificially deformed embryonic explants : A role for mechano-geometry in tissue differentiation. *Developmental Dynamics*, 239(3) : 885–896, March 2010. ISSN 10588388, 10970177. doi : 10.1002/dvdy.22238. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.22238>. 23
- Shalika Kumburegama, Naveen Wijesena, Ronghui Xu, and Athula H Wikramanayake. Strabismus-mediated primary archenteron invagination is uncoupled from Wnt/SZ-catenin-dependent endoderm cell fate specification in *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria) : Implications for the evolution of gastrulation. *EvoDevo*, 2(1) :2, 2011. ISSN 2041-9139. doi : 10.1186/2041-9139-2-2. URL <http://www.evodevojournal.com/content/2/1/2>. 29, 30, 41, 42, 83, 86, 101, 102, 104, 107, 114, 117, 118, 119, 121, 122
- Arne Kusserow, Kevin Pang, Carsten Sturm, Martina Hroudá, Jan Lentfer, Heiko A. Schmidt, Ulrich Technau, Arndt von Haeseler, Bert Hobmayer, Mark Q. Martindale, and Thomas W. Holstein. Unexpected complexity of the Wnt gene family in

- a sea anemone. *Nature*, 433(7022) :156–160, January 2005. ISSN 0028-0836, 1476-4679. doi : 10.1038/nature03158. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature03158>. 32, 34
- Benoît Landrein, Annamaria Kiss, Massimiliano Sassi, Aurélie Chauvet, Pradeep Das, Millan Cortizo, Patrick Laufs, Seiji Takeda, Mitsuhiro Aida, Jan Traas, Teva Vernoux, Arezki Boudaoud, and Olivier Hamant. Mechanical stress contributes to the expression of the STM homeobox gene in Arabidopsis shoot meristems. *eLife*, 4, December 2015. ISSN 2050-084X. doi : 10.7554/eLife.07811. URL <https://elifesciences.org/articles/07811>. 15
- Mary Constance Lane. *Gastrulation : From Cells to Embryo* . Edited by Claudio D Stern . Cold Spring Harbor (New York) : Cold Spring Harbor Laboratory Press. \$150.00. xvi + 731 p ; ill. ; index. ISBN : 0-87969-707-5. 2004. *The Quarterly Review of Biology*, 80(2) :245–245, June 2005. ISSN 0033-5770, 1539-7718. doi : 10.1086/433092. URL <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/433092>. 19
- Michael J Layden, Eric Röttinger, Francis S Wolenski, Thomas D Gilmore, and Mark Q Martindale. Microinjection of mRNA or morpholinos for reverse genetic analysis in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Nature Protocols*, 8(5) :924–934, April 2013. ISSN 1754-2189, 1750-2799. doi : 10.1038/nprot.2013.009. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2013.009>. 41, 42
- Michael J. Layden, Fabian Rentzsch, and Eric Röttinger. The rise of the starlet sea anemone *Nematostella vectensis* as a model system to investigate development and regeneration : Overview of starlet sea anemone *Nematostella vectensis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Developmental Biology*, 5(4) :408–428, July 2016. ISSN 17597684. doi : 10.1002/wdev.222. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/wdev.222>. 27, 28, 29
- Lucas Leclère and Fabian Rentzsch. RGM Regulates BMP-Mediated Secondary Axis Formation in the Sea Anemone *Nematostella vectensis*. *Cell Reports*, 9(5) :1921–1930, December 2014. ISSN 22111247. doi : 10.1016/j.celrep.2014.11.009. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124714009632>. 28

- Lucas Leclère, Markus Bause, Chiara Sinigaglia, Julia Steger, and Fabian Rentzsch. Development of the aboral domain in *Nematostella* requires *-catenin* and the opposing activities of *S ix3/6* and *F rizzled5/8*. *Development*, 143(10) :1766–1777, May 2016. ISSN 0950-1991, 1477-9129. doi : 10.1242/dev.120931. URL <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.120931>. 41, 42
- S. Leduc. *Thorie physico-chimique de la vie et gnrations spontanées*. 1910. 3
- Patricia N. Lee, Shalika Kumburegama, Heather Q. Marlow, Athula H. Wikramanayake, and M. Q. Martindale. Asymmetric developmental potential along the animal–vegetal axis in the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled. *Developmental Biology*, 310(1) :169–186, October 2007. ISSN 00121606. doi : 10.1016/j.ydbio.2007.05.040. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607011104>. 29, 41, 45, 48, 100, 101, 107
- Tanmay P. Lele, Jay Pendse, Sanjay Kumar, Matthew Salanga, John Karavitis, and Donald E. Ingber. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *Journal of Cellular Physiology*, 207(1) :187–194, April 2006. ISSN 00219541, 10974652. doi : 10.1002/jcp.20550. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.20550>. 44
- M Leptin. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes & Development*, 5(9) :1568–1576, September 1991. ISSN 0890-9369. doi : 10.1101/gad.5.9.1568. URL <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.5.9.1568>. 7, 123
- E.B. Lewis. A gene complex controlling segmentation in *drosophila*. *Nature*, 276 : 565, December 1978. URL <http://sns.ias.edu/~tlusty/courses/landmark/Lewis1978.pdf>. 5
- Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2CT Method. *Methods*, 25(4) : 402–408, December 2001. ISSN 10462023. doi : 10.1006/meth.2001.1262. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>. 47
- Catriona Y. Logan and Roel Nusse. THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1) :781–810, November 2004. ISSN 1081-0706, 1530-8995. doi :

- 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126. URL <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>. 20
- Craig R. Magie, Marymegan Daly, and Mark Q. Martindale. Gastrulation in the cnidarian *Nematostella vectensis* occurs via invagination not ingression. *Developmental Biology*, 305(2) :483–497, May 2007. ISSN 00121606. doi : 10.1016/j.ydbio.2007.02.044. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607001807>. 48, 72, 120
- Tadanori Mammoto, Akiko Mammoto, Yu-suke Torisawa, Tracy Tat, Ashley Gibbs, Ratmir Derda, Robert Mannix, Marlieke de Bruijn, Chong Wing Yung, Donggeun Huh, and Donald E. Ingber. Mechanochemical Control of Mesenchymal Condensation and Embryonic Tooth Organ Formation. *Developmental Cell*, 21(4), October 2011. ISSN 15345807. doi : 10.1016/j.devcel.2011.07.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153458071100298X>. 14
- Benjamin L. Martin and David Kimelman. Regulation of Canonical Wnt Signaling by Brachyury Is Essential for Posterior Mesoderm Formation. *Developmental Cell*, 15 :121–133, July 2008. doi : 10.1016/j.devcel.2008.04.013. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580708001767>. 105
- M. Q. Martindale. Investigating the origins of triploblasty : ‘mesodermal’ gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria ; class, Anthozoa). *Development*, 131(10) :2463–2474, April 2004. ISSN 0950-1991, 1477-9129. doi : 10.1242/dev.01119. URL <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01119>. 19, 27, 28, 105, 112
- Jean-Léon Maître, Hervé Turlier, Rukshala Illukkumbura, Björn Eismann, Ritsuya Niwayama, François Nédélec, and Takashi Hiragi. Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature*, 536(7616) :344–348, August 2016. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi : 10.1038/nature18958. URL <http://www.nature.com/articles/nature18958>. 15
- Tatiana Merle and Emmanuel Farge. Trans-scale mechanotransductive cascade of biochemical and biomechanical patterning in embryonic development : the light side of the force. *Current Opinion in Cell Biology*, 55 :111–118, December 2018. ISSN 09550674. doi : 10.1016/j.ceb.2018.07.003. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067418300991>. iii, 112, 129, 138

- C. S. Minot. ORIGIN OF THE MESODERM. *Science (New York, N.Y.)*, 2(47) : 815–818, December 1883. ISSN 0036-8075. doi : 10.1126/science.ns-2.47.815. 112
- Démosthène Mitrossilis, Jens-Christian Röper, Damien Le Roy, Benjamin Driquez, Aude Michel, Christine Ménager, Gorky Shaw, Simon Le Denmat, Laurent Ranno, Frédéric Dumas-Bouchiat, Nora M. Dempsey, and Emmanuel Farge. Mechano-transductive cascade of Myo-II-dependent mesoderm and endoderm invaginations in embryo gastrulation. *Nature Communications*, 8 :13883, January 2017. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/ncomms13883. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms13883>. 14, 23
- Tsuyoshi Momose, Yulia Kraus, and Evelyn Houliston. A conserved function for Strabismus in establishing planar cell polarity in the ciliated ectoderm during cnidarian larval development. *Development (Cambridge, England)*, 139(23) :4374–4382, December 2012. ISSN 1477-9129. doi : 10.1242/dev.084251. 114
- R. T. Moon, R. M. Campbell, J. L. Christian, L. L. McGrew, J. Shih, and S. Fraser. Xwnt-5a : a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development (Cambridge, England)*, 119(1) :97–111, September 1993. ISSN 0950-1991. 7
- Akankshi Munjal and Thomas Lecuit. Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development*, 141(9), 2014. ISSN 0950-1991, 1477-9129. doi : 10.1242/dev.091645. URL <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.091645>. 7
- Sundar Ram Naganathan, Sebastian Fürthauer, Masatoshi Nishikawa, Frank Jülicher, and Stephan W Grill. Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left–right symmetry breaking. *eLife*, 3, December 2014. ISSN 2050-084X. doi : 10.7554/eLife.04165. URL <https://elifesciences.org/articles/04165>. 15
- Noriyuki Nishioka, Ken-ichi Inoue, Kenjiro Adachi, Hiroshi Kiyonari, Mitsunori Ota, Amy Ralston, Norikazu Yabuta, Shino Hirahara, Robert O. Stephenson, Narumi Ogonuki, Ryosuke Makita, Hiroki Kurihara, Elizabeth M. Morin-Kensicki, Hiroshi Nojima, Janet Rossant, Kazuki Nakao, Hitoshi Niwa, and Hiroshi Sasaki. The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophoderm from Inner Cell Mass. *Developmental Cell*, 16(3) :398–410, March 2009. ISSN 15345807. doi : 10.1016/j.devcel.2009.02.003.

- URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153458070900077X>.
15
- J. Noordermeer, J. Klingensmith, N. Perrimon, and R. Nusse. *dishevelled* and *armadillo* act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature*, 367(6458) : 80–83, January 1994. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/367080a0. 20
- Trista E. North, Wolfram Goessling, Marian Peeters, Pulin Li, Craig Ceol, Allegra M. Lord, Gerhard J. Weber, James Harris, Claire C. Cutting, Paul Huang, Elaine Dzierzak, and Leonard I. Zon. Hematopoietic Stem Cell Development Is Dependent on Blood Flow. *Cell*, 137(4) :736–748, May 2009. ISSN 00928674. doi : 10.1016/j.cell.2009.04.023. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409004486>. 14
- Christiane Nüsslein-Volhard and Eric Wieschaus. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287 :795, October 1980. URL <http://dx.doi.org/10.1038/287795a0>. 5
- Shawn M. Olsen, Joshua D. Stover, and Jiro Nagatomi. Examining the Role of Mechanosensitive Ion Channels in Pressure Mechanotransduction in Rat Bladder Urothelial Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(2) :688–697, February 2011. ISSN 0090-6964, 1573-9686. doi : 10.1007/s10439-010-0203-3. URL <http://link.springer.com/10.1007/s10439-010-0203-3>. 14
- Mattias Ormestad, Mark Q Martindale, and Eric Rttnger. A comparative gene expression database for invertebrates. *EvoDevo*, 2(1), 2011. ISSN 2041-9139. doi : 10.1186/2041-9139-2-17. URL <http://evodevojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2041-9139-2-17>. 29
- Maiyon Park and Randall T. Moon. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nature Cell Biology*, 4(1) : 20–25, January 2002. ISSN 1465-7392, 1476-4679. doi : 10.1038/ncb716. URL <http://www.nature.com/articles/ncb716>. 102
- Peifer and Wieschaus. The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell*, 63(6), 1990. ISSN 00928674. doi : 10.1016/0092-8674(90)90413-9. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867490904139>. 80

- M Peifer. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, 76(5) :789–791, March 1994. ISSN 00928674. doi : 10.1016/0092-8674(94)90353-0. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867494903530>. 20
- M. Peifer, C. Rauskolb, M. Williams, B. Riggleman, and E. Wieschaus. The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. *Development (Cambridge, England)*, 111(4) :1029–1043, April 1991. ISSN 0950-1991. 20
- Marina Peralta, Emily Steed, Sébastien Harlepp, Juan Manuel González-Rosa, Fabien Monduc, Ana Ariza-Cosano, Alfonso Cortés, Teresa Rayón, Jose-Luis Gómez-Skarmeta, Agustín Zapata, Julien Vermot, and Nadia Mercader. Heartbeat-Driven Pericardiac Fluid Forces Contribute to Epicardium Morphogenesis. *Current Biology*, 23(18) :1726–1735, September 2013. ISSN 09609822. doi : 10.1016/j.cub.2013.07.005. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982213008282>. 14
- Hervé Philippe, Romain Derelle, Philippe Lopez, Kerstin Pick, Carole Borchiellini, Nicole Boury-Esnault, Jean Vacelet, Emmanuelle Renard, Evelyn Houliston, Eric Quéinnec, Corinne Da Silva, Patrick Wincker, Hervé Le Guyader, Sally Leys, Daniel J. Jackson, Fabian Schreiber, Dirk Erpenbeck, Burkhard Morgenstern, Gert Wörheide, and Michaël Manuel. Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships. *Current Biology*, 19(8) :706–712, April 2009. ISSN 09609822. doi : 10.1016/j.cub.2009.02.052. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982209008057>. 27
- Lara Planas-Paz, Boris Strilić, Axel Goedecke, Georg Breier, Reinhard Fässler, and Eckhard Lammert. Mechanoinduction of lymph vessel expansion : Mechanoinduced lymph vessel expansion. *The EMBO Journal*, 31(4) :788–804, February 2012. ISSN 02614189. doi : 10.1038/emboj.2011.456. URL <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.456>. 14
- Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S. F. Gabriel Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi

- Nishina, Carl-Philipp Heisenberg, and Makoto Furutani-Seiki. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3d body shape. *Nature*, 521 :217, March 2015. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature14215>. 13
- Farge E. Pouille, Amhadi P.; Brunet AC. Mechanical Signals Trigger Myosin II Redistribution and Mesoderm Invagination in Drosophila Embryos. 2, 2009. ISSN 1937-9145. doi : 10.1126/scisignal.2000098. URL <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2000098>. 14, 23
- Ekaterina Pukhlyakova, Andrew J. Aman, Kareem Elsayad, and Ulrich Technau. -Catenin-dependent mechanotransduction dates back to the common ancestor of Cnidaria and Bilateria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(24) :6231–6236, June 2018. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.1713682115. URL <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1713682115>. 30, 32, 34, 35, 108, 119, 120, 123
- N. H. Putnam, M. Srivastava, U. Hellsten, B. Dirks, J. Chapman, A. Salamov, A. Terry, H. Shapiro, E. Lindquist, V. V. Kapitonov, J. Jurka, G. Genikhovich, I. V. Grigoriev, S. M. Lucas, R. E. Steele, J. R. Finnerty, U. Technau, M. Q. Martindale, and D. S. Rokhsar. Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization. *Science*, 317(5834) :86–94, July 2007. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.1139158. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1139158>. 32
- Cyril Rauch, Anne-Christine Brunet, Julie Deleule, and Emmanuel Farge. C₂C₁₂ myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283(1) : C235–C243, July 2002. ISSN 0363-6143, 1522-1563. doi : 10.1152/ajpcell.00234.2001. URL <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00234.2001>. 14, 15
- Wilhelm Roux. Der kampf der theile im organismus. 1881. URL <http://docnum.unistra.fr/cdm/compoundobject/collection/coll113/id/41242/rec/1>. 3
- Joseph F. Ryan, Patrick M. Burton, Maureen E. Mazza, Grace K. Kwong, James C. Mullikin, and John R. Finnerty. The cnidarian-bilaterian ancestor possessed at least 56 homeoboxes : evidence from the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Genome Biology*, 7(7) :R64, 2006. ISSN 1474-760X. doi : 10.1186/gb-2006-7-7-R64. 27

- Joseph F. Ryan, Maureen E. Mazza, Kevin Pang, David Q. Matus, Andreas D. Baxevanis, Mark Q. Martindale, and John R. Finnerty. Pre-Bilaterian Origins of the Hox Cluster and the Hox Code : Evidence from the Sea Anemone, *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE*, 2(1) :e153, January 2007. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0000153. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000153>. 18
- Jens-Christian Röper, Démosthène Mitrossilis, Guillaume Stirnemann, François Waharte, Isabel Brito, Maria-Elena Fernandez-Sanchez, Marc Baaden, Jean Salamero, and Emmanuel Farge. The major -catenin/E-cadherin junctional binding site is a primary molecular mechano-transducer of differentiation in vivo. *eLife*, 7, July 2018. ISSN 2050-084X. doi : 10.7554/eLife.33381. URL <https://elifesciences.org/articles/33381>. 16, 23, 25, 113, 123
- Eric Röttinger, Paul Dahlin, and Mark Q. Martindale. A Framework for the Establishment of a Cnidarian Gene Regulatory Network for “Endomesoderm” Specification : The Inputs of β -Catenin/TCF Signaling. *PLoS Genetics*, 8(12) : e1003164, December 2012. ISSN 1553-7404. doi : 10.1371/journal.pgen.1003164. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003164>. 32, 33, 35, 42, 47, 81, 99, 102, 103, 104, 106, 107, 114
- Anne Schohl and François Fagotto. A role for maternal beta-catenin in early mesoderm induction in *Xenopus*. *The EMBO journal*, 22(13) :3303–3313, July 2003. ISSN 0261-4189. doi : 10.1093/emboj/cdg328. 23, 123
- S. Schulte-Merker, F. J. van Eeden, M. E. Halpern, C. B. Kimmel, and C. Nüsslein-Volhard. no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development (Cambridge, England)*, 120(4) :1009–1015, April 1994. ISSN 0950-1991. 105
- Buer Sen, Zhihui Xie, Natasha Case, Meiyun Ma, Clinton Rubin, and Janet Rubin. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology*, 149(12) :6065–6075, December 2008. ISSN 0013-7227. doi : 10.1210/en.2008-0687. 124
- Marc D. Servetnick, Bailey Steinworth, Leslie S. Babonis, David Simmons, Miguel Salinas-Saavedra, and Mark Q. Martindale. Cas9-mediated excision of *Nematostella brachyury* disrupts endoderm development, pharynx formation and oral-aboral patterning. *Development*, 144(16) :2951–2960, August 2017. ISSN 0950-

- 1991, 1477-9129. doi : 10.1242/dev.145839. URL <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.145839>. 105, 107
- Shuang Shang, Fang Hua, and Zhuo-Wei Hu. The regulation of β -catenin activity and function in cancer : therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 8(20), May 2017. ISSN 1949-2553. doi : 10.18632/oncotarget.15687. URL <http://www.oncotarget.com/fulltext/15687>. 124
- Kristin Sherrard, François Robin, Patrick Lemaire, and Edwin Munro. Sequential Activation of Apical and Basolateral Contractility Drives Ascidian Endoderm Invagination. *Current Biology*, 20(17) :1499–1510, September 2010. ISSN 09609822. doi : 10.1016/j.cub.2010.06.075. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210008730>. 10
- A. E. Shyer, T. Tallinen, N. L. Nerurkar, Z. Wei, E. S. Gil, D. L. Kaplan, C. J. Tabin, and L. Mahadevan. Villification : How the Gut Gets Its Villi. *Science*, 342(6155) :212–218, October 2013. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.1238842. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1238842>. 15
- Amy E. Shyer, Tyler R. Huycke, ChangHee Lee, L. Mahadevan, and Clifford J. Tabin. Bending Gradients : How the Intestinal Stem Cell Gets Its Home. *Cell*, 161(3) :569–580, April 2015. ISSN 00928674. doi : 10.1016/j.cell.2015.03.041. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741500361X>. 15
- Amy E. Shyer, Alan R. Rodrigues, Grant G. Schroeder, Elena Kassianidou, Sanjay Kumar, and Richard M. Harland. Emergent cellular self-organization and mechanosensation initiate follicle pattern in the avian skin. *Science*, 357(6353) :811–815, August 2017. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.aai7868. URL <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aai7868>. 16, 17
- Matias Simons and Marek Mlodzik. Planar Cell Polarity Signaling : From Fly Development to Human Disease. *Annual Review of Genetics*, 42(1) :517–540, December 2008. ISSN 0066-4197, 1545-2948. doi : 10.1146/annurev.genet.42.110807.091432. URL <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.42.110807.091432>. 41
- T. Sousbie. The persistent cosmic web and its filamentary structure - I. Theory and implementation : Persistent cosmic web - I : Theory and im-

- plementation. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 414(1) : 350–383, June 2011. ISSN 00358711. doi : 10.1111/j.1365-2966.2011.18394.x. URL <https://academic.oup.com/mnras/article-lookup/doi/10.1111/j.1365-2966.2011.18394.x>. 55
- David L. Stern and Virginie Orgogozo. THE LOCI OF EVOLUTION : HOW PREDICTABLE IS GENETIC EVOLUTION ? *Evolution*, 62(9) :2155–2177, September 2008. ISSN 00143820, 15585646. doi : 10.1111/j.1558-5646.2008.00450.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1558-5646.2008.00450.x>. 19
- Carlos Tamulonis, Marten Postma, Heather Q. Marlow, Craig R. Magie, Johann de Jong, and Jaap Kaandorp. A cell-based model of *Nematostella vectensis* gastrulation including bottle cell formation, invagination and zippering. *Developmental Biology*, 351(1) :217–228, March 2011. ISSN 00121606. doi : 10.1016/j.ydbio.2010.10.017. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160610011371>. 30, 31, 72, 87, 118, 120
- Technau. Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. 2001. doi : BioEssays23:788-794. 27, 28, 105
- Ulrich Technau. Origin and evolution of endoderm and mesoderm. 2003. 27, 28, 112, 123
- H. Theisen, J. Purcell, M. Bennett, D. Kansagara, A. Syed, and J. L. Marsh. dishevelled is required during wingless signaling to establish both cell polarity and cell identity. *Development (Cambridge, England)*, 120(2) :347–360, February 1994. ISSN 0950-1991. 102
- D’Arcy Wentworth Thompson. *On growth and form*. Cambridge : At the University Press New York : The Macmillan Compagny, 1942. 5
- A. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237(641) :37–72, 1952. ISSN 00804622. URL <http://www.jstor.org/stable/92463>. 5
- Aysu Uygur, John Young, Tyler R. Huycke, Mervenaz Koska, James Briscoe, and Clifford J. Tabin. Scaling Pattern to Variations in Size during Development of the Vertebrate Neural Tube. *Developmental Cell*, 37(2) :127–135, April 2016. ISSN 15345807. doi : 10.1016/j.devcel.2016.03.024. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580716301691>. 11

- Athula H. Wikramanayake, Melanie Hong, Patricia N. Lee, Kevin Pang, Christine A. Byrum, Joanna M. Bince, Ronghui Xu, and Mark Q. Martindale. An ancient role for nuclear β -catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature*, 426(6965) :446–450, November 2003. ISSN 0028-0836, 1476-4679. doi : 10.1038/nature02113. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature02113>. 34, 41, 48, 123
- L. Wolpert. Gastrulation and the evolution of development. *Development (Cambridge, England). Supplement*, pages 7–13, 1992. 19
- Yan Yang, Safedin Beqaj, Paul Kemp, Ilana Ariel, and Lucia Schuger. Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia. *Journal of Clinical Investigation*, 106(11) :1321–1330, December 2000. ISSN 0021-9738. doi : 10.1172/JCI8893. URL <http://www.jci.org/articles/view/8893>. 14
- Mingxi Yao, Wu Qiu, Ruchuan Liu, Artem K. Efremov, Peiwen Cong, Rima Seddiki, Manon Payre, Chwee Teck Lim, Benoit Ladoux, René-Marc Mège, and Jie Yan. Force-dependent conformational switch of β -catenin controls vinculin binding. *Nature Communications*, 5 :4525, July 2014. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5525>. 12
- Masaaki Yoshigi, Laura M. Hoffman, Christopher C. Jensen, H. Joseph Yost, and Mary C. Beckerle. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of Cell Biology*, 171(2) :209–215, October 2005. ISSN 0021-9525, 1540-8140. doi : 10.1083/jcb.200505018. URL <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200505018>. 44
- P.E. Young, T.C. Pesacreta, and D.P. Kiehart. Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during drosophila embryogenesis. *Development*, 111(1) : 1–14, 1991. ISSN 0950-1991. URL <http://dev.biologists.org/content/111/1/1>. 10
- Huimin Zhang, Frédéric Landmann, Hala Zahreddine, David Rodriguez, Marc Koch, and Michel Labouesse. A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature*, 471(7336) :99–103, March 2011. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi : 10.1038/nature09765. URL <http://www.nature.com/articles/nature09765>. 12