Bases cellulaires et moléculaires de la régénération chez la méduse Clytia hemisphaerica

Sophie Peron

▶ **To cite this version:**

Sophie Peron. Bases cellulaires et moléculaires de la régénération chez la méduse Clytia hemisphaerica. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS325 . tel-03139846

HAL Id: tel-03139846
https://theses.hal.science/tel-03139846

Submitted on 12 Feb 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant (ED515)

Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-Mer UMR7009 CNRS/UPMC

Mécanismes développementaux chez Clytia

Bases cellulaires et moléculaires de la régénération chez la méduse *Clytia hemisphaerica*

Par Sophie Peron

Thèse de doctorat de Biologie du Développement

Dirigée par Evelyn Houliston

Co-encadrée par Lucas Leclère

La thèse sera présentée et soutenue publiquement le 23/09/2019

Devant un jury composé de :

Pr. Eric Quéinnec	Président du jury
Dr. Eve Gazave	Rapporteur
Dr. Eric Röttinger	Rapporteur
Dr. Andrea Pasini	Examinateur
Dr. Evelyn Houliston	Directeur de thèse
Dr. Lucas Leclère	Co-encadrant

“Se tenir sur les épaules des géants.
Et voir plus loin, voir dans l’invisible,
à travers l’espace et à travers le temps.”

Jean Claude Ameisen

Remerciements

Tout d'abord un grand merci à Lucas et Evelyn pour m'avoir acceptée dans l'équipe et pour m'avoir guidée dans la science au cours de ces quatre dernières années. Merci Lucas pour ta patience et ta pédagogie au labo. J'espère avoir réussi à intégrer au moins une partie de ce que tu as tenté de m'apprendre !

Merci à toute l'équipe pour leur aide pour les manips et leurs réponses à mes questions. Particulièrement à Sandra pour les ISH qui ont permis de faire avancer le projet transcriptome, et à Carine pour m'avoir laissé expérimenter l'enseignement. Merci aussi à Chiara pour les conseils de dissection à mon arrivée et pour être restée impliquée à fond dans le projet malgré la distance. Julia, thank you for your good mood, in the lab and in the office. It was nice to work with you ! Merci aussi à Sophie, Gwladys et Priscilla pour leur enthousiasme dans les découpes de méduses.

Un grand merci à tous les indigènes de la mezza (et ex-indigènes) avec qui j'ai passé la plus grande partie de mon temps et qui ont su me sortir les méduses de la tête quand il fallait. Isa, on est arrivées en même temps à Villefranche, je ne m'attendais pas à ce que tu en partes avant moi ! Merci pour toutes tes 'mauvaises idées', comme les urgences amoureux à l'improviste, l'expédition patinoire, faire disparaitre mon bureau … Profite bien des Etats-Unis ! Coralie, je crois que je n'ai même pas besoin dire les deux choses pour lesquelles je dois te remercier. Merci d'avoir encore une fois joué le taxi la semaine dernière, et puis tu sais que tu es toujours la bienvenue à Villefranche, surtout si tu apportes de cookies ! Marianne merci d'avoir parfaitement complémenté mon style de jeu à la pétanque et du coup de nous avoir assuré les bonbons des fanny deux ans de suite ! Merci aussi pour l'assistance R et de m'accompagner dans mes idées de baignade, même en plein hivers. Et bon courage pour ce qui arrive… Thank you Anna for making sure there is always sweet food in the office and also for your company for lunch outside. David, thank you for the snorkeling school trip to the coral cave, and for forcing the mezza to take breaks. Merci Mebarek pour l'initiation au lancer de hache et d'avoir empêché l'intoxication alimentaire au monoï. Julia, même si tu n'es pas restée très longtemps c'était sympas de t'avoir à la mezza.

Merci aussi à tous ceux avec qui j'ai passé des bons moments à Villefranche. Thank you Marta, Angelica and Dalileh for your unusable energy and enthusiasm, Maciej for distracting me with plankton and for making everyone in the lab eat jellyfish, Cat for joining the team. Merci Sameh de t'occuper des microscopes et bonne chance avec tes deux 'anges'. Merci Alex de t'assurer que j'ai toujours des méduses ; Loann pareil et surtout pour le piano. Merci à Géraldine et Marion pour leur contribution à la bonne humeur générale au labo, Manon et Anne pour l'apport de culture japonaise au labo et à Thomas pour les conseils littéraires et musicaux. Merci aussi à Céline pour ton rire communicatif qui s'entend de l'autre bout du bâtiment, à Guy pour ta participation au 'Pétanque-cake', à Faisal pour le fameux thé à la menthe, à Philippe pour avoir répondu à mes 36000 questions de sécurité et à Thierry et Jocelyne pour les repas les jours de pluie.

Merci aussi à tous ceux qui me supportent depuis un moment déjà. Merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue et encouragée à suivre ma voie, et d'être allés jusqu'à me rejoindre à l'autre bout du monde au Chili. Merci aussi pour le 'marathon-relecture' de ces derniers jours. Merci à mon frère d'être là pour partager mes délires issus de l'animation japonaise. Merci Hélène d'avoir fait en sorte qu'on reste en contact depuis l'éternité qu'on se connait. Merci à Karine, Aude, Janie, Perrine pour l'hébergement les fois où j'ai fui la chaleur du sud et/ou pour être venu m'y rejoindre. Ces pauses étaient les bienvenues. Et Aude, merci aussi pour avoir bien alimenté ma playliste de rédaction.

Sommaire

Résumé 1
Abréviations 2
Préface 4

Introduction 5
I Réponse à la blessure chez les métazoaires 6
I.1. Différents mécanismes de réponse à une blessure 6
I.1.1. Processus de cicatrisation 7
I.2.2. Régénération des structures perdues 7
I.2.3. Réparation des tissus 8
I.2. La régénération, une capacité très répandue chez les métazoaires 9
I.2.1. Répartition et variabilité de la capacité de régénération 9
I.2.2. Evolution de la capacité de régénération 12
I.2.3. Modèles principaux d'étude de la régénération 14

II. Mécanismes de régénération 19
II.1. Source des cellules participant à la régénération 19
II.1.1. Régénération morphallactique 19
II.1.2. Activation de cellules souches multipotentes 23
II.1.3. Contribution des cellules différenciées 26
II.2. Intégration et patterning de la structure régénérée 31
II.2.1. Modèle classique : patterning par morphogènes 33
II.2.2. Rôle des éléments structuraux 41

III. Capacités de régénération des cnidaires 50
III.1. Généralités sur les cnidaires 50
III.1.1. Cycle de vie et classification 50
III.1.2. Cellules souches des cnidaires 54
III.1.3 Deux types de cellules caractéristiques des cnidaires :
les nématocytes et les cellules myoépithéliales 56
III.2. Capacités de régénération des polypes 61
III.2.1. L'Hydre : le tout premier modèle de biologie expérimentale 61
III.2.2. *Hydractinia :* un modèle hydrozoaire colonial 69
III.2.3. *Nematostella* : un modèle anthozoaire 73
III.3. Capacités de régénération des méduses 78
III.3.1. Morphologie de la méduse 78
III.3.2. Régénération et transdifférentiation 81
III.3.3. Restauration de la forme méduse après amputation 86
III.3.4. Remodelage, régénération et cicatrisation chez les méduses 90

IV. La méduse *Clytia hemisphaerica* comme modèle d'étude de la régénération 92
IV.1. Cycle de vie de *Clytia* 92
IV.2. Morphologie de la méduse 94
IV.3. *Clytia* comme modèle de biologie du développement 96

V. Objectifs 98

Chapitre I : Processus de régénération et remodelage chez la méduse *Clytia* 99
I. Introduction : *Clytia* comme modèle de régénération 100
I.1. Intérêt de la méduse *Clytia* pour l'étude de la régénération 100
1.2. Capacités de régénération des méduses Z4B 101
1.3. Etude de la régénération du manubrium 103
I.4. Contrôle de la régénération du manubrium chez *Clytia* 103

II Article 112

III. Discussion : Confrontation des différents modèles de régénération chez les méduses 149

Chapitre II : Aspects moléculaires de la régénération du manubrium 152
Préface 153
I. Introduction 155
I.1. Morphologie du manubrium 155
I.2. Types cellulaires du manubrium 157
I.2.1. Cellules épithéliales ectodermiques et gastrodermiques 158
I.2.2. I-cells 158
I.2.3. Cellules nerveuses 160
I.2.4. Nématocytes 163
I.2.5. Cellules glandulaires 164
I.3. Polarité du manubrium 166
I.3.1. Définition du territoire digestif par *FoxA* 166
I.3.2. *Brachyury* comme marqueur du pôle oral 166
I.3.3. La voie Wnt/β-caténine dans le manubrium 169
I.4. Homologie des structures de la méduse et du polype 171
I.5 Objectifs du chapitre 2 173

II. Matériel et méthodes 174
II. 1. Immunohistologie et marquage des cellules en prolifération par incorporation d'EdU 174
II.2. Histologie 174
II.3. Design expérimental du transcriptome 174
II.4. Extraction d'ARN 175

II.5. Séquençage, assemblage et contrôle de la qualité des échantillons 176
II.6. Recherche de gènes d'intérêt 176
II.7. ISH colorimétrique et fluorescente 177

III. Résultats 178
III.1. Description du manubrium de *Clytia* 178
III.2. Données transcriptomiques 183
III.2.1. Design expérimental 183
III.2.2. Qualité des échantillons 184
III.3. Dynamique des gènes au cours de la régénération 189
III.4. Types cellulaires et différenciation pendant la régénération 197
III.4.1. I-cells 197
III.4.2. Ovocytes 198
III.4.3. Cellules nerveuses 200
III.4.4. Nématocytes 202
III.4.5. Cellules gastrodermiques glandulaires et digestives 204
III.4.6. Autres types cellulaires 208
III.5. Détermination des territoires pendant la régénération 211
III.5.1. Définition des territoires oraux et digestifs 211
III.5.2. Expression dynamique de composants de la voie Wnt/β-caténine 211

IV. Discussion 215
IV.1. Différenciation et dédifférenciation au cours de la régénération 215
IV.2. Régénération du pôle oral du manubrium 217
IV.3. Role potentiel de la voie Wnt/β-caténine dans la régénération. 217
IV.4. Une homologie entre la cavité gastrique du polype et le manubrium ? 220

V. Annexes 225

Discussion générale 229
I. Source de cellules pendant la régénération 230
II. Physiologie de la méduse 232
III. Réponse à la blessure 233
IV. Le modèle de l'information de position de Wolpert face à la méduse *Clytia* 236
IV.1. Patterning de l'ombrelle 236
IV.2. Patterning du manubrium 240

Bibliographie 242
Annexe : Génome de *Clytia* 264

Résumé

La méduse hydrozoaire *Clytia hemisphaerica* a une plasticité lui permettant de répondre efficacement à différents types de blessure. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux processus cellulaires et moléculaires au cours de la régénération de l'organe digestif regroupant la bouche et l'estomac (appelé 'manubrium') chez cette méduse. J'ai pu observer que la réponse à la blessure se décompose en trois phases successives : la cicatrisation, le remodelage de l'ombrelle rétablissant la forme méduse et la régénération de certains des organes manquants. La régénération du manubrium repose sur la formation d'une zone de prolifération locale et sur des migrations de cellules souches venant des gonades. Des éléments structuraux, notamment les fibres musculaires, jouent un rôle clef dans le repatterning de l'ombrelle et la position du manubrium régénéré. J'ai également généré des données transcriptomiques des premiers stades de la régénération. Ces données ont permis d'identifier des marqueurs de différents types cellulaires du manubrium, et d'observer leur réapparition séquentielle au cours de la régénération. Elles ont également révélé que la voie Wnt/β-caténine est la voie de signalisation présentant l'expression la plus dynamique dans le manubrium en régénération, jouant très certainement un rôle important dans la régénération de cet organe. Les travaux réalisés confirment le potentiel de la méduse *Clytia* comme modèle de régénération permettant d'adresser de nombreuses questions sur le plan cellulaire et moléculaire, et ainsi de mieux comprendre l'évolution des mécanismes de régénération chez les métazoaires.

Abstract

The hydrozoan jellyfish *Clytia hemisphaerica* displays very efficient wound repair mechanisms after different types of injury. During my PhD, I investigated in the medusa the cellular and molecular processes involved in the regeneration of the feeding organ, called 'manubrium', ensuring the function of the mouth and stomach. I could define three successive phases during the wound response: wound healing, remodeling of the umbrella allowing the rapid recovery of the circular medusae shape, followed by the regeneration of some of the missing organs. Manubrium regeneration relies on local proliferation as well as cell migration from the gonads. Structural elements, especially the muscle fibers, play a key role in the repatterning process of the umbrella and the site of manubrium regeneration. I also generated transcriptomic data covering the early steps of regeneration. These data allowed the identification of markers of different cell types of the manubrium and documentation of their sequential reappearance during regeneration. They also revealed dynamic expression profiles for Wnt/β-catenin pathway components in the regenerating manubrium, strongly suggesting important roles for this pathway during regeneration. This work confirmed the potential of *Clytia* medusae as an experimental model for studying regeneration, allowing conserved cellular and molecular mechanisms to be uncovered, and our knowledge about the evolution of regeneration mechanisms in metazoans to be expanded.

Abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
AEC : Apical Epidermal Cap
AP : Antéro-Postérieur
APC : Adenomatous Polyposis Coli
AMCh-like : Acidic-Mammalian-Chitinase-like
bHLH : Hélice-boucle-hélice
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BrdU : Bromodeoxyuridine
c-néoblastes : Néoblastes clonogéniques
CREB : C-AMP Response Element-Binding protein
CRISPR/Cas9 : Clustered Regularity Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein 9
DIC : Contraste interférentiel différentiel
Dkk : Dickkopf
DV : Dorso-Ventral
ECM : Matrice extracellulaire
EdU : 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
EST : Expressed Sequence Tag
Ex. : Exemple
FGF : Fibroblast Growth Factor
Fig. : Figure
FISH : Hybridation in situ fluorescente
FoxA : Forkhead box A
FPKM: Fragments par kilobase par million
FT : Facteurs de Transcription
Fzl : Frizzled
GFP : Green Fluorescent Protein
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
H : Heures
HE : Hématoxyline-Eosine
hh : Hedgehog
Hpd : Heures post dissection
HU : Hydroxyurée
i-cells : Cellules souches interstitielles
ISH : Hydridation in situ
Mcoll : Minicollagen
MdCA : Ablation du manubrium, zone centrale
MdEj : Ablation du manubrium, méduse entière
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK : MAPK/ERK Kinase

MIH : Homone induisant la maturation des ovocytes
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MMP : Matrix metellaproteinase
MO : Morpholino
Mq :
n.d. : Non disséquée
Otp : Orthopedia
PAS : Periodic Acid Schiff
PCG : Position Control Genes
PFA : Paraformaldéhyde
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
piwi : P-element-induced wimpy testis
PKF : PKF118-310
RF-amide : Neuropeptide Arginine-Phénylalanine suivi d'une amidation C-terminale
RNAi : ARN interférent
PCR : Réaction en chaine par polymérase
SFRP : Secreted Frizzled Related Protein
Shh: Sonic Hedgehog
STK : Serine/Threonine-specific protein kinase
TCF : T-Cell Factor
TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TPA : 12-O-tetradecanoyl-13-acetate
UdEJ : Dissection de l'ombrelle, méduse entière
YL1/2 : Anticorps anti-tubuline-alpha-tyrosylée

Préface

L'étude des capacités de régénération de la méduse *Clytia hemisphaerica* à Villefranche-sur-Mer a commencé en 2014, avec l'arrivée de Lucas Leclère et Chiara Sinigaglia dans l'équipe d'Evelyn Houliston et Tsuyoshi Momose, utilisant *Clytia* comme modèle de biologie du développement. L'idée initiale du projet était de décrypter les mécanismes du patterning de la méduse adulte par l'étude de ses capacités de régénération. Le projet s'est d'abord focalisé sur la restauration de la forme méduse après bissection et la régénération de la gonade et des canaux radiaires après ablation. Le projet a ensuite évolué vers l'étude de la régénération du manubrium, notamment dans le cadre de ma thèse, pour différentes raisons présentées dans le chapitre 1. Le but de ma thèse était de réaliser une caractérisation au niveau cellulaire et moléculaire de la régénération du manubrium chez la méduse *Clytia,* pouvant servir de base pour des études futures de la régénération chez ce modèle.

La structure de ma thèse est la suivante :

L'**introduction** est divisée en quatre sections. La première replace la régénération dans le contexte général de la réponse à la blessure et présente les principaux organismes modèles pour l'étude de régénération. Ensuite j'ai détaillé deux problématiques communes à toute réponse régénérative : la question des sources de cellules alimentant la régénération, et celle du patterning de la structure en régénération. Le but de la troisième section est de présenter les caractéristiques des principaux modèles cnidaires de régénération ainsi que les mécanismes connus de régénération chez les cnidaires. Elle détaille également l'état actuel des connaissances concernant la régénération chez les méduses. La dernière section présente la méduse *Clytia* comme modèle d'étude.

La partie **résultats** comprend deux chapitres. Le premier est focalisé sur les mécanismes cellulaires de la régénération du manubrium, ainsi que sur le repatterning de l'ombrelle au cours de la réponse à la blessure, influençant le positionnement du manubrium en régénération. Ce chapitre s'articule autour du manuscrit présenté, qui sera soumis bientôt au journal eLife. Le deuxième chapitre présente l'analyse transcriptomique réalisée afin 1) d'identifier des marqueurs des types cellulaires du manubrium et de visualiser leur réapparition lors de la régénération et 2) d'identifier des gènes candidats potentiellement impliqués dans la régénération (facteurs de transcription et voies de signalisation).

Dans la partie **discussion**, j'ai choisi de détailler, au vu des processus identifiés lors de ma thèse, les nombreuses potentialités de la méduse *Clytia* comme modèle d'étude de la régénération.

INTRODUCTION

I Réponse à la blessure chez les métazoaires

Les invertébrés marins sont fréquemment blessés par leur environnement. La source principale de blessure est la prédation sublétale. Par exemple, les organismes coloniaux vivants fixés comme les coraux, les éponges ou les bryozoaires sont souvent mangés partiellement par les prédateurs (Harvell 1984; Henry & Hart 2005). Les parties exposées sur les sédiments, comme les palpes et segments postérieurs des polychètes, les bras des ophiures ou encore les siphons des bivalves, servent également de source de nourriture sans entrainer la mort de la proie (de Vlas 1979; Stancyk *et al.* 1994; Tomiyama & Ito 2006; Tomiyama *et al.* 2007). Les autres causes de blessures comprennent l'autotomie défensive, les interactions compétitives intra- ou interspécifiques, l'activité humaine, ainsi que les facteurs abiotiques comme l'abrasion et les mouvements de l'eau (review : (Lindsay 2010)). Une étude récente a montré que 33 à 47% de la faune marine benthique est blessée à un temps donné, les fréquences variant entre les phyla et la localisation (Lindsay 2010). Des mécanismes efficaces de réparation des blessures sont donc nécessaires et ce, à tous les niveaux d'organisation (cellules, tissus, organes, structures, organismes). Les stratégies de réponses aux blessures ne sont pas limitées aux métazoaires ; les bactéries (Hambleton 1971), les protistes (Szubinska 1971; Slabodnick *et al.* 2013) et les plantes (Volkmann & Baluška 1999) en possèdent aussi.

Dans cette section, je vais tout d'abord décrire succinctement les mécanismes de réponse à une blessure, avant de focaliser sur la capacité de régénération, en présentant sa répartition chez les métazoaires, les implications évolutives de sa distribution dans l'arbre phylogénétique et quelques modèles de régénération.

I.1. Différents mécanismes de réponse à une blessure

Suite à une blessure, divers mécanismes sont mis en jeu. Il est possible de les séparer en trois catégories en fonction du degré de restauration de la structure et de la fonction : cicatrisation, réparation des tissus et régénération (Fig.1) (Galliot *et al.* 2017).

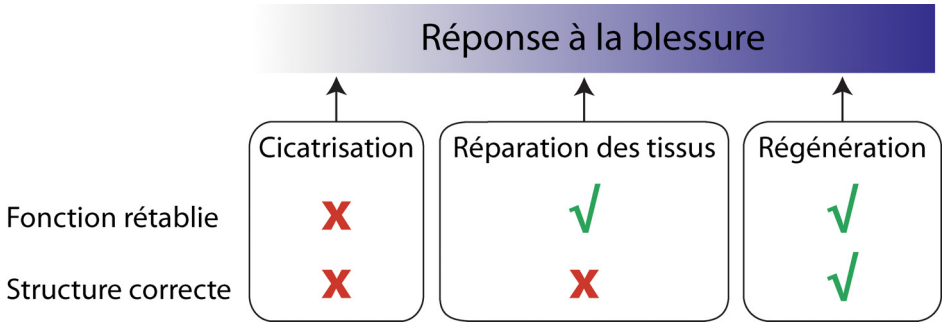


Figure 1 : Différents types de réponse suite à une blessure.

I.1.1. Processus de cicatrisation

La première phase, suite à une blessure, est toujours la cicatrisation. Il s'agit de la ré-épithélialisation de la blessure ou du plan d'amputation. La continuité de l'épithélium est ainsi rétablie, permettant d'éviter l'entrée de pathogènes, les pertes de cellules et de tissus, le choc osmotique ou la dessiccation selon le milieu de vie terrestre ou aquatique. La cicatrisation comprend une phase indépendante de la transcription partagée par quasiment tous les métazoaires (Cordeiro & Jacinto 2013) consistant, entre autre, en l'induction de vagues de calcium (ex. xénope (Benink & Bement 2005)) et la formation d'un gradient d'H_2O_2 (ex. poisson zèbre (Niethammer *et al.* 2009)) permettant la détection du dommage. Ensuite, la ré-épithélialisation de la blessure a lieu grâce à la formation d'un câble d'actomyosine ainsi que la migration et la prolifération des cellules bordant la blessure (review : (Sonnemann & Bement 2011)). Le câble d'actomyosine est une structure contractile supracellulaire composée de filaments d'actine et de myosine. Cette structure est conservée lors de la réponse à la blessure chez les métazoaires (cnidaires : *Clytia hemisphaerica* (Kamran *et al.* 2017)), arthropodes : drosophile (Antunes *et al.* 2013), mammifères : embryons de souris (McCluskey & Martin 1995)). La cicatrisation inclue également une phase d'inflammation consistant en l'infiltration de cellules immunitaires dans la blessure, permettant d'éliminer les pathogènes. Cette phase est assez variable entre les phyla. Par exemple elle implique des amœbocytes chez les cnidaires (Palmer *et al.* 2011; Gold & Jacobs 2013), des hémocytes phagocytant les pathogènes chez les mollusques (Franchini & Ottaviani 2000) et différents types cellulaires du système immunitaire comme les neutrophiles, leucocytes et macrophages chez les mammifères (Martin & Leibovich 2005; Eming *et al.* 2009).

Chez les mammifères, la cicatrisation a principalement lieu par fibrose et entraine la formation d'une cicatrice. La réponse à la blessure s'arrête une fois la blessure recouverte d'un amas de cellules (principalement des fibroblastes) et de matrice extracellulaire (ECM) désorganisée (Gurtner *et al.* 2008). La cicatrisation par fibrose ne permet ni la réparation des tissus, ni l'initiation d'une réponse régénérative. Par exemple, dans le cas d'une blessure dans l'épiderme, la continuité de l'épithélium est bien rétablie grâce à la cicatrice, cependant les follicules pilleux et les glandes de la peau ne sont pas régénérés (Takeo *et al.* 2015). La structure et la fonction sont perdues. En revanche, chez certains animaux, la cicatrisation se poursuit par des étapes permettant la restauration de la fonction et/ou de la structure.

I.2.2. Régénération des structures perdues

Le nom de Thomas Hunt Morgan est associé à la théorie chromosomique de l'hérédité, pour laquelle il obtient le prix Nobel de médecine en 1933. Ses travaux ne se résument pas à la génétique, il a également documenté en détail les capacités de régénération de nombreux métazoaires. Sa définition de la régénération est la suivante :

> "The word regeneration has come to mean, in general usage, not only the replacement of a lost part, but also the development of a new, whole organism, or even a part of an organism, from a piece of an adult, or of an embryo, or of an egg. We must include also

these cases in which the part replaced is less than the part removed, or even different in kind." (Morgan 1901a)

Cette définition de la régénération inclue la restauration d'une structure adulte perdue suite à une blessure, présente dans la plupart des définitions actuelles (Bely & Nyberg 2010), ainsi que la capacité de certains embryons à compenser la perte de blastomères pendant le développement précoce. Morgan a étudié les capacités de régénération, entre autre, de l'hydre, de méduses hydrozoaires, des planaires, des annélides et des amphibiens urodèles (Morgan 1901a). De nombreux métazoaires sont capables de régénérer les structures manquantes, rétablissant à la fois la forme et la fonction perdues.

La régénération est parfois imparfaite. Chez les étoiles de mer *Asterias forbesi*, des bras sur- ou sous-numéraires ont été observés. La présence des cinq muscles aboraux au centre du corps indique que les individus avaient une symétrie originale pentaradiaire, qui a été perdue suite à une blessure (Hotchkiss 1979). Les membres régénérés des lézards, amphibiens, poissons ou insectes sont parfois plus petits que les membres originaux (review : (Maginnis 2006)).

La régénération et la cicatrisation donnent des résultats très différents, cependant les deux processus sont liés. En effet, l'étape de cicatrisation par migration de cellules épithéliales au niveau de la blessure est nécessaire à l'initiation de la régénération (Brockes & Kumar 2008). Chez la salamandre, il est possible d'empêcher la régénération en suturant une couche de peau sur le plan d'amputation, indiquant que des signaux nécessaires au déclenchement de la réponse régénérative sont produits lors de la cicatrisation (Mescher 1976).

I.2.3. Réparation des tissus

La réparation des tissus se distingue de la régénération par le fait qu'elle permet la restauration de la fonction, mais pas de la structure originale.

Le foie est l'organe principal responsable de l'élimination des toxines. Il fait partie des rares organes régénérant chez les mammifères adultes. La régénération du foie a été étudiée chez les rongeurs par hépatectomie partielle, consistant à en ôter les deux tiers (Taub 2004). Une semaine après dissection, la masse originale du foie est restaurée grâce à la prolifération des hépatocytes, les cellules différenciées représentant 80% des cellules du foie (Taub 2004). Cependant, les lobes perdus suite à la dissection ne repoussent pas, il ne s'agit donc pas de régénération. La restauration de la masse hépatique a lieu par croissance compensatoire du ou des lobes restant (Fausto *et al.* 2006) rétablissant ainsi la fonction, mais pas la structure. Chez le poisson zèbre, capable de régénérer la structure de nombreux organes (la nageoire caudale et le cœur entre autres), la régénération du foie a également lieu par croissance compensatoire (Kan *et al.* 2009).

La restauration de la fonction, sans régénérer la structure a aussi été observée à l'échelle d'animaux entiers. Les méduses juvéniles de l'espèce *Aurelia aurita* (scyphozoaire) possèdent huit bras répartis régulièrement autour du disque central portant la bouche. Après amputation,

par exemple de trois bras, la symétrie radiaire est restaurée, non pas en régénérant les bras manquant, mais en réorganisant les cinq bras restants. L'adulte se développant à partir d'une éphyrule à cinq bras adopte une symétrie pentaradiée. Ce phénomène a été appelé symétrisation, et permet le rétablissement de la fonction de nage (Abrams *et al.* 2015). Le même processus a également été observé chez les éphyrules des scyphozoaires *Chrysaora pacifica*, *Mastigias sp.* et *Cotylorhyza tuberculata* (Abrams *et al.* 2015), et chez des méduses hydrozoaires (Hargitt 1899; Schmid & Tardent 1971). Il sera discuté plus en détail dans la section III.3.3 de l'Introduction.

Le cténophore *Mnemiopsis* régénère les parties manquantes, incluant les rangées de peignes et l'organe apical suite à une coupe longitudinale. Certains des fragments observés par Coonfield (1936), n'ont pas réussi à régénérer les rangées de peignes mais ont rétabli la forme circulaire de la même façon que les éphyrules d'*Aurelia aurita*, et continuent de vivre avec des rangées manquantes.

Le phénomène de réparation de la blessure par réorganisation des parties restantes sera plus développé dans la section II.1.1 de l'Introduction.

I.2. La régénération, une capacité très répandue chez les métazoaires

I.2.1. Répartition et variabilité de la capacité de régénération

La capacité de régénération est extrêmement répandue (Sánchez Alvarado 2000; Brockes *et al.* 2001). Des espèces de tous les phyla sont capables de régénérer des parties du corps et les structures régénérées sont extrêmement diverses, allant du corps des planaires au cœur des poissons téléostéens en passant par le système digestif des holothuries (Fig.2).

Cependant, toutes les espèces d'un même phylum n'ont pas nécessairement les mêmes capacités de régénération. Par exemple les capacités de régénération des annélides sont très variables. La plupart sont capables de régénérer les segments antérieurs et postérieurs, une capacité qui est probablement ancestrale aux annélides (review : (Bely 2006)). Cependant, quelques espèces, dont *Arenicola marina* sont incapables de régénérer les segments antérieurs et postérieurs, tandis que d'autres régénèrent uniquement les segments postérieurs. Les espèces dépourvues de capacités de régénération peuvent se trouver dans des groupes connus pour leurs capacités de régénération, comme *Myxicola infundibulum* dans le groupe des sabellidae régénérant le segment antérieur (Bely 2006). Les variations chez les annélides sont aussi visibles par le nombre de segments régénérés et le nombre de segments pouvant être ôtés.

La régénération a lieu à différents niveaux d'organisation biologique, allant de la cellule comme les neurones ou les fibres musculaires, à l'organisme en entier à partir d'un fragment, ce qui nécessite de restaurer l'axe primaire du corps (ex. hydre et planaires) (Fig.3). Un individu peut être capable de régénérer uniquement certains niveaux, et seulement certaines structures par niveau. Par exemple les lézards sont capables de régénérer la queue, mais pas les pattes (Alibardi & Toni 2005). De même, la capacité de régénération varie avec l'âge et le stade du

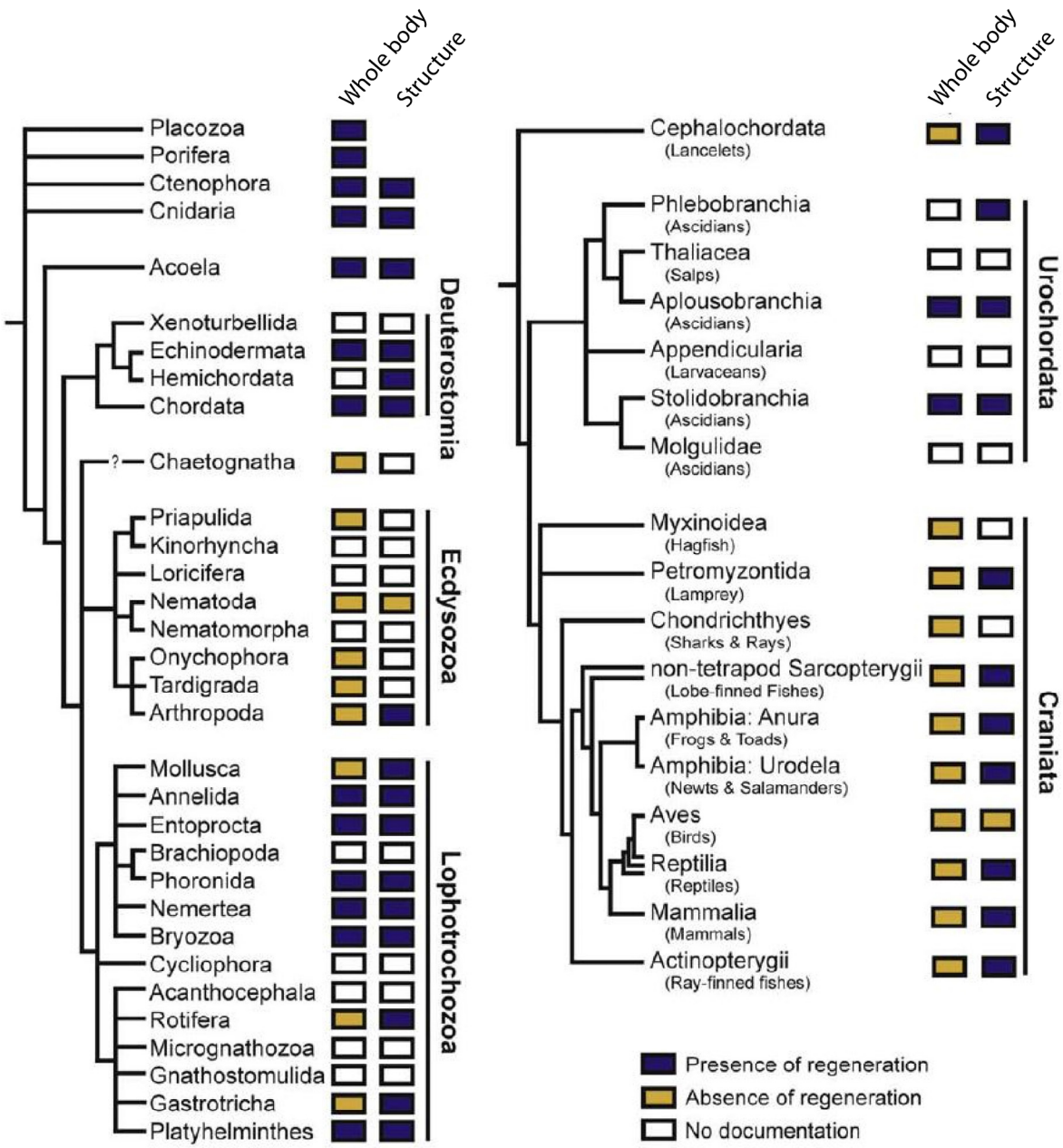


Figure 2 : Répartition de la capacité de régénération et diversité des structures régénérées. De nombreux organismes sont capables de régénérer des parties du corps perdues. Les cnidaires sont connus pour leurs grandes capacités de régénération, par exemple l'hydre peut régénérer l'extrémité orale et aboral après amputation, et même un animal entier à partir de fragments (Bosch 2007, Holstein *et al.* 2003). Certains ecdysozoaires sont capables de régénérer les pattes, comme le cafard *Blattela germinica* (O' Farrell & Stock 1953), l'araignée *Latrodectus variolus* (Randall 1981) et l'amphipode *Paryhale hawaiensis* (Alwes *et al.* 2016). Parmi les lophotrochozoaires, les capacités de régénération des planaires sont connues depuis plus de 100 ans (Morgan 1900). Certains annélides polychaetes et oligochaetes régénèrent les segments antérieurs et postérieurs après amputation (Bely 2006). Certains échinodermes comme le concombre de mer régénèrent le système digestif qu'ils expulsent en cas d'agression (Mashanov & Garcia-Arraras 2011), ou les bras dans le cas des étoiles de mer (Ben Khadra *et al.* 2017), des crinoides (Kondo & Akasaka 2010) et des ophiures (Czarkwiani *et al.* 2016).

Figure 2 : Répartition de la capacité de régénération et diversité des structures régénérées (suite de la légende).
Les ascidies solitaires comme *Ciona* régénèrent le siphon après amputation (Whitaker 1975), et certaines ascidies coloniales comme *Botryllus schlosseri,* le corps entier à partir du système vasculaire (Brown *et al.* 2009). Parmi les vertébrés, les amphibiens urodèles ont les capacités de régénération les plus grandes. Le triton, l'axolotl et le xénope régenèrent des structures aussi diverses que les membres et la rétine (Simon & Tanaka 2013 ; Haas & Whited 2017 ; Del Tsonis & Tsonis 2003). Les poissons téléostéens comme le poisson zèbre régénèrent les nageoires et le cœur (Sehring *et al.* 2016). Les mammifères en revanche ont des capacités de régénération assez limitées. Les structures régénérant sont les bouts des doigts chez les fœtus et juvéniles de souris et humains (Seifert & Muneoka 2018), le foie chez les adultes (Fausto *et al.* 2006), et les bois des cervidés (Li *et al.* 2014).
Adapté de Bely & Nyberg (2010).

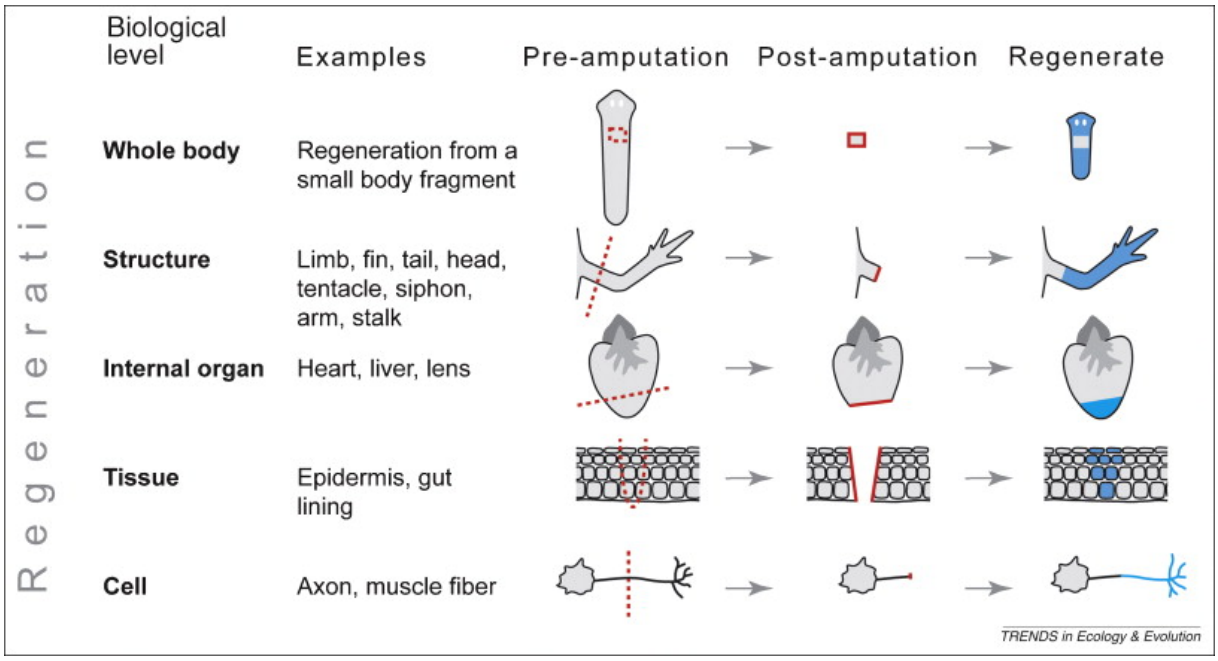


Figure 3 : Niveaux d'organisation biologique présentant une réponse régénérative.
Les lignes rouges pointillées indiquent le plan d'amputation, les lignes rouges continues la zone de coupure et les zones bleues la structure régénérée.
Tiré de Bely & Nyberg (2010).

cycle de vie, les extrémités de doigts des mammifères ne se régénérant qu'au stade fœtus par exemple. Les cas de régénération sont multiples et les structures à régénérer très diverses.

I.2.2. Evolution de la capacité de régénération

La capacité de régénération est très répandue parmi les métazoaires, mais que peut-on dire de son origine évolutive ? Les capacités de régénération les plus grandes, dont celle de régénérer le corps en entier, se situent majoritairement dans les phyla non-bilatériens. Il a été ainsi présumé que la régénération serait une capacité ancestrale des métazoaires, apparue en même temps que la multicellularité (Bely & Nyberg 2010). Les capacités de régénération plus faibles des autres groupes (par exemple chez les vertébrés et de façon plus extrême chez les oiseaux et les mammifères) seraient dues à des restrictions et pertes dans les différentes lignées évolutives chez les bilatériens.

Plusieurs hypothèses expliquent le maintien (ou la réapparition) de la capacité de régénération. Celle-ci peut conférer un réel avantage évolutif, et donc être maintenue de façon active par l'évolution (Bely & Nyberg 2010). Selon ce scénario, le maintien de la capacité de régénération a pu être favorisé par la perte des tissus due à la prédation et aux facteurs abiotiques. Plusieurs auteurs dans les années 1700 (Réaumur 1742 ; Bonnet 1745 ; Lessona 1769 : mentionnés dans (Morgan 1901a)) ont fait le lien entre la capacité de régénération et la susceptibilité aux blessures des structures régénérant, de même que Morgan au début du XXème siècle dans son ouvrage 'Regeneration' (Morgan 1901a). Cependant l'hydre et les planaires, qui ont de grandes capacités de régénération, sont relativement peu blessées dans le milieu naturel (Bely & Nyberg 2010). D'autres mécanismes sont donc probablement en jeu. La capacité de régénération pourrait aussi être maintenue par pléiotropie (couplage entre les processus cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la régénération, et d'autres processus indispensables à la survie de l'organisme, comme le développement ou l'homéostasie des tissus), ou par inertie phylogénique dans les cas où la régénération ne confère pas d'avantage évolutif (Bely & Nyberg 2010).

Si la capacité de régénération a bien une origine unique, sa perte probable au cours de l'évolution au sein des bilatériens indique que celle–ci pourrait conférer un désavantage évolutif. En effet, la régénération a un cout énergétique non négligeable pouvant entrainer une diminution de la croissance et de la reproduction (Maginnis 2006; Naya *et al.* 2007). De plus, la présence d'une structure partiellement régénérée et non fonctionnelle le temps de la régénération, peut entrainer une gêne pour les fonctions normales. Par exemple chez certaines araignées, une patte en régénération a des mouvements moins précis qu'un membre entier et est plus handicapante pour le tissage de la toile qu'un membre manquant (Vollrath 1990).

La perte de la capacité de régénération semble également être corrélée avec le développement de la réponse immunitaire (Mescher & Neff 2005; Brockes & Kumar 2008). Le système immunitaire aurait évolué en parallèle de l'apparition de la mâchoire chez les chordés pour faire face à de nouveaux pathogènes (Matsunaga & Rahman 1998). Chez les mammifères, les blessures se referment par cicatrisation par fibrose, ne permettant pas l'initiation d'une réponse

régénérative. Le seul stade de développement présentant une réponse à la blessure sans fibrose est le stade fœtus, ayant un système immunitaire encore peu développé et la capacité de régénérer le bout des doigts (Mescher & Neff 2005). La corrélation entre l'activation du système immunitaire et la diminution de la capacité de régénération est aussi visible chez le xénope. Les têtards perdent leur capacité à régénérer la queue au moment de l'activation des lymphocytes T (Fukazawa *et al.* 2009).

Un deuxième scénario sur l'origine de la régénération, qui n'est pas incompatible avec une origine unique de la régénération, postule la co-option des processus développementaux pour la régénération. Il est appelé 'hypothèse de l'épiphénomène' pour l'origine de la régénération (Brockes & Kumar 2008; Bely & Nyberg 2010). Il existe de nombreuses similarités entre la régénération et le développement embryonnaire et post-embryonnaire. La capacité de régénération serait une conséquence d'un programme développemental déjà présent (Bely & Nyberg 2010). En effet, certaines voies de signalisation utilisées pour la régénération le sont également pendant le développement, comme Wnt, BMP, RA, FGF (review : (Tiozzo & Copley 2015), arthropodes : *Gryllus bimaculatus* (Nakamura *et al.* 2008), amphibiens : *Ambystoma mexicanum* (Ghosh *et al.* 2008)). Par exemple chez *Nematostella vectensis*, une partie des gènes utilisés pour le développement est réutilisée pour la régénération ; certains gènes spécifiques à la régénération sont également activés suite à l'amputation (Warner *et al.* 2019). Malgré les similarités, régénération et développement sont bien deux phénomènes distincts. Certains processus sont spécifiques à la régénération, comme l'initiation suite à la cicatrisation, la dédifférenciation, transdifférenciation et prolifération de cellules différenciées, qui sont rares lors du développement (Vervoort 2011). De plus, lors de la régénération chez certaines espèces, la structure régénérée provient d'une structure spécialisée appelée blastème (plus de détails dans la section II.1.2 de l'Introduction). Enfin la régénération dépend du système nerveux chez de nombreux organismes (entre autre amphibiens et annélides) et dans certains cas de l'expression de gènes spécifiques à la régénération (Brockes & Kumar 2008).

Il existe aussi des processus cellulaires et moléculaires partagés entre la régénération et la reproduction asexuée (cnidaire : *Nematostella vectensis* (Burton & Finnerty 2009), annélide : *Lumbriculus variegatus* (Martinez *et al.* 2005), *Pristina leidyi* (Bely & Wray 2001), echinodermes (Carnevali 2006), urochordé : *Polycitor proliferus* (Kawamura *et al.* 2008)) et entre la régénération et l'homéostasie (annelides : *Pristina leidyi* (Bely & Wray 2001), lophotrochozoaires : *Schmidtea mediterranea* (Gurley *et al.* 2008)). Au vu des similarités entre certains processus de reproduction asexuée (fragmentation et fission) et la régénération après amputation, il est probable que régénération et reproduction asexuée soient liées d'un point de vue évolutif. La distribution phylogénétique de la régénération n'est pas exactement identique à celle de la reproduction asexuée. Le lien entre les deux a pu être perdu dans certains groupes. Par exemple quelques annélides se reproduisent de façon asexué, mais ne sont pas capables de régénérer des segments manquants (Bely 1999; Bely & Wray 2001).

L'hypothèse de l'origine de la régénération concomitante avec l'apparition de la multicellularité, considère la régénération comme un caractère unique pouvant être placé sur un arbre phylogénétique. Cependant, il existe une grande diversité des structures pouvant être

régénérées, ces dernières ne sont pas toutes directement comparables. Par exemple, la régénération des pattes des salamandres et des bras des étoiles de mer est partagée, ce qui ne veut pas nécessairement dire qu'elle est conservée (Tiozzo & Copley 2015). La conservation impliquerait des mécanismes hérités d'un ancêtre commun. Afin d'étudier l'évolution de la régénération, il semble plus cohérent de comparer l'évolution des mécanismes, plutôt que celle de la capacité de régénération réduite à un caractère (Tiozzo & Copley 2015). Les grands mécanismes de régénération partagés pas tous les métazoaires peuvent être séparés en trois catégories : cicatrisation (réparation de l'épithélium), mobilisation des précurseurs (activation des cellules participant) et morphogenèse (processus permettant la reconstruction totale ou partielle de la structure) (Tiozzo & Copley 2015).

I.2.3. Modèles principaux d'étude de la régénération

Si de nombreux animaux présentent des capacités de régénération, celles des espèces modèles classiques utilisés en biologie du développement (souris, xénope, drosophile, *Caenorhabditis elegans*) sont plutôt limitées. La drosophile régénère les disques imaginaux (structure épithéliale donnant naissance aux structures de l'adulte pendant la métamorphose) (Bergantiños *et al.* 2010). Les axones de *C. elegans* repoussent après section (Ghosh-Roy & Chisholm 2010). Malgré leurs faibles capacités de régénération, les techniques d'imagerie et les outils moléculaires disponibles en font des modèles intéressants. Le poisson zèbre est une exception. Il est capable de régénérer ses nageoires, le cœur, la rétine et la moelle épinière (Akimenko *et al.* 2003; Sehring *et al.* 2016). Les modèles classiques ne permettent pas de couvrir tous les cas de régénération et ne sont pas représentatifs de la diversité des structures à régénérer. Par exemple, aucun n'est capable de régénération du corps en entier. De plus, des modèles variés venant de tous les phyla, dont les non-bilatériens, sont nécessaires pour trancher la question de l'origine de la capacité de régénération.

L'étude de la régénération a été initiée par Trembley en 1744, décrivant les capacités de régénération des polypes **d'hydre** (Trembley 1744). Celles-ci sont maintenant bien connues : l'hydre peut régénérer l'extrémité orale et aborale après amputation, et même un animal entier à partir de fragments ou d'un agrégat de cellules (Gierer *et al.* 1972; Holstein *et al.* 2003; Bosch 2007). L'hydre est maintenant un modèle utilisé en routine au laboratoire, des lignées transgéniques sont disponibles ainsi que de nombreux outils (Galliot 2012) (voir aussi section III.2.1 de l'Introduction).

Parmi les bilatériens, **les planaires** ont des capacités de régénération rivalisant avec celles de l'hydre. Elles ont été décrites pour la première fois en 1774, puis redécouvertes à la fin du XIXème (Fig.4.A) (Randolph 1897; Morgan 1898; Reddien & Alvarado 2004). Les planaires sont capables de régénérer la tête et la queue après amputation et même un organisme complet à partir de fragments. Morgan (1898) a déterminé qu'un fragment faisant 1/279ème d'un animal peut régénérer un animal entier, ce qui correspond à 1000 cellules (Montgomery & Coward 2006). La grande plasticité des planaires permet d'étudier les mécanismes de régénération grâce à une approche de coupes variées.

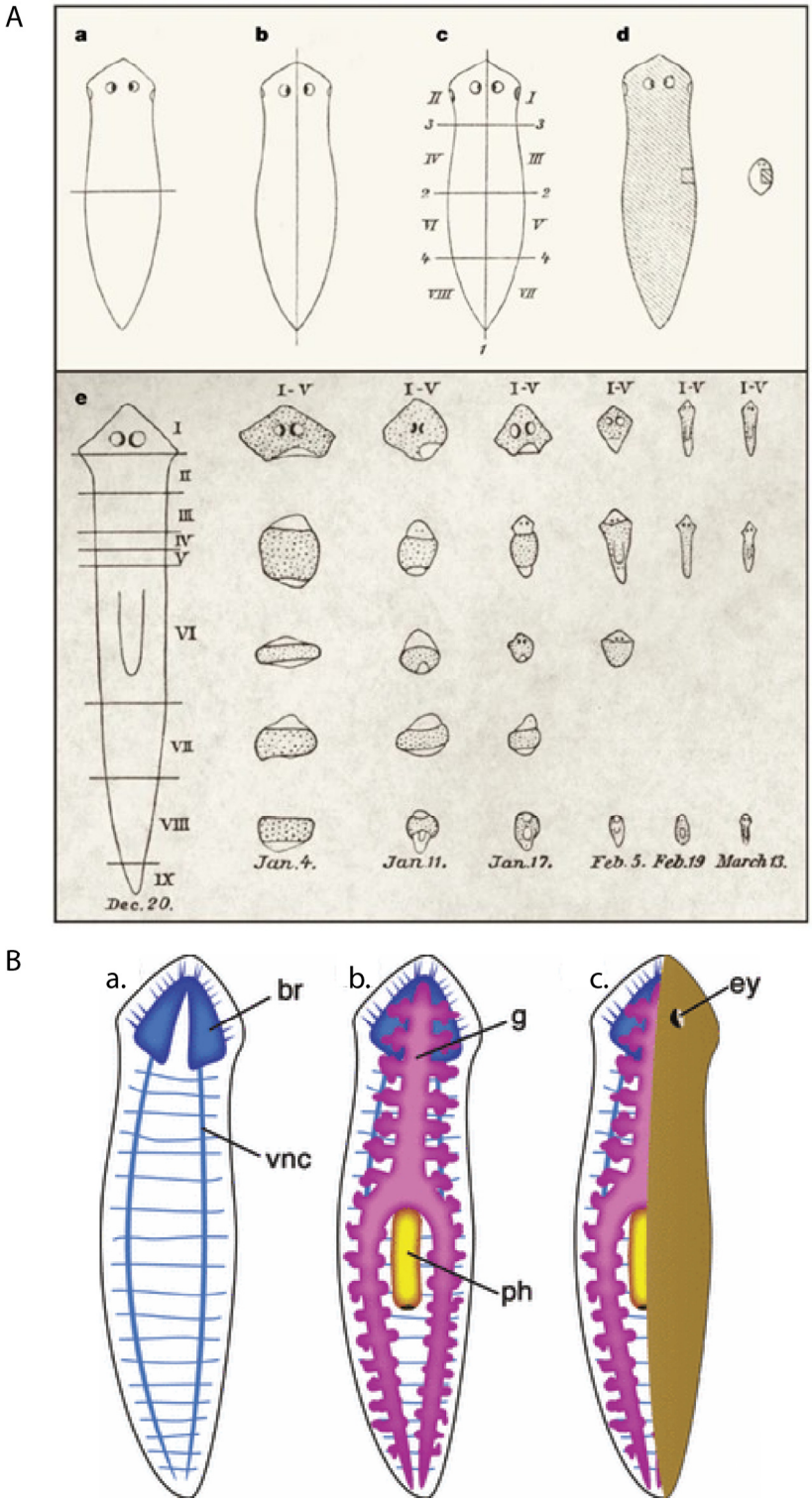


Figure 4 : Les planaires comme modèle d'étude de la régénération.
(A) Dessins tirés des articles originaux de Randolf (1897) et Morgan (1898), illustrant quelques coupes réalisées et la réponse à la blessure des fragments de planaires.
Tiré de Newmark & Alvarado (2002).
(B) Représentation schématique des organes principaux de *Dugesia japonica*. (a) Système nerveux. (b) Système digestif. (c) Epiderme et yeux. Abréviations : br : cerveau, vnc : cordon nerveux ventral, g : intestin, ph : pharynx, ey : œil.
Tiré de Shibata *et al.* (2010).

Les planaires sont des vers plats non parasitiques appartenant au phylum des plathelminthes. Ils possèdent une symétrie bilatérale et des organes bien définis. Toutes les planaires n'ont pas les mêmes capacités de régénération (Egger *et al.* 2007), certaines étant incapables de régénérer le cerveau, les yeux ou le pharynx. Les planaires principalement utilisées pour l'étude de la régénération sont les planaires d'eau douce de l'ordre des triclades. Leur nom vient de la morphologie de leur système gastrovasculaire, organisé en trois branches principales (Fig.4.B). Le système nerveux des planaires est composé d'un ganglion cérébral à deux lobes à l'extrémité antérieure, d'où partent deux cordons nerveux longitudinaux sur le côté ventral (Fig.4.B). Des photorécepteurs et chimiorécepteurs sont localisés à l'extrémité antérieure (Newmark & Alvarado 2002). Les deux espèces principalement utilisées pour l'étude de la régénération sont *Dungesia japonica* et *Schmidtea mediterranea*. Le génome de *Schmidtea méditerranea* est disponible (Grohme *et al.* 2018), ainsi que des outils de perturbation de l'expression de gènes comme le RNAi (Molina *et al.* 2007; Gurley *et al.* 2008; Iglesias *et al.* 2008; Petersen & Reddien 2009a) permettant des études fonctionnelles.

Les autres modèles historiques d'étude de la régénération sont les **amphibiens urodèles**. La première description des capacités de régénération des amphibiens date de 1768 (Spallanzani 1768). Celles-ci sont assez variables. Les tritons et l'axolotl ont les capacités de régénération les plus grandes. Ils sont capables de régénérer les pattes, la queue et des parties du cerveau après ablation (Singh *et al.* 2010, 2018; Simon & Tanaka 2013; Haas & Whited 2017; Urata *et al.* 2018). Le triton régénère également la lentille (Del Rio-Tsonis & Tsonis 2003), et l'axolotl les branchies (Saito *et al.* 2019). Les espèces couramment utilisées aujourd'hui au laboratoire sont les tritons *Notophthalmus viridescens* et *Cynops pyrroghaster*, et l'axolotl *Ambystoma mexicanum*, plus facile à élever que les tritons (plus de détails dans la section II.1.3 de l'Introduction).

Les capacités de régénération de nombreux autres animaux ont été décrites au cours du XXème siècle (ex. annélides : *Eisenia foetida* (Gates 1950), *Platynereis dumerilii* (Müller 1973) ; crustacés : *Asellus aquaticus* (Needham 1950), lophotrochozoaires : *Achatina fulica* et *Helix aspersa* (Wagge & Mittler 1953)). Cependant, le développement des organismes modèle à cette époque a privilégié quelques animaux relativement simples, petits et ayant un cycle de vie court afin d'étudier des problématiques comme le développement et la génétique (drosophile, souris, *C. elegans*). Les outils et les ressources (bases de données, lignées, infrastructures) ont été développés spécifiquement pour ces modèles (Russell *et al.* 2017). La tendance est maintenant au développement d'une plus grande diversité de modèles, dont des organismes adaptés à l'étude de la régénération, et des représentants de différents phyla afin de mettre en évidence différents aspects du processus et aussi de retracer l'histoire évolutive de caractères. Le développement de nouveaux protocoles et l'accès facilité aux ressources génomiques et transcriptomiques a permis l'essor de l'utilisation d'organismes 'non traditionnels' comme modèles d'études de la régénération (Fig.5). Par exemple le crustacé amphipode *Paryhale hawaiensis* est capable de régénérer les membres après ablation. Le séquençage du génome (Kao *et al.* 2016) a permis la création de lignées transgéniques exprimant des marqueurs dans différentes lignées cellulaires. Il est possible d'immobiliser le membre en régénération et ainsi d'imager tout le processus de régénération (Konstantinides & Averof 2014; Alwes *et al.* 2016).

Les lignées transgéniques alliées aux techniques d'imagerie font de *Paryhale* un modèle intéressant pour suivre les différents types cellulaires pendant la régénération. D'autres modèles aujourd'hui couramment utilisés pour l'étude de la régénération comprennent par exemple l'annélide *Platynereis dumerilli* (Planques *et al.* 2019) et l'ascidie coloniale *Botryllus schlosserii*.

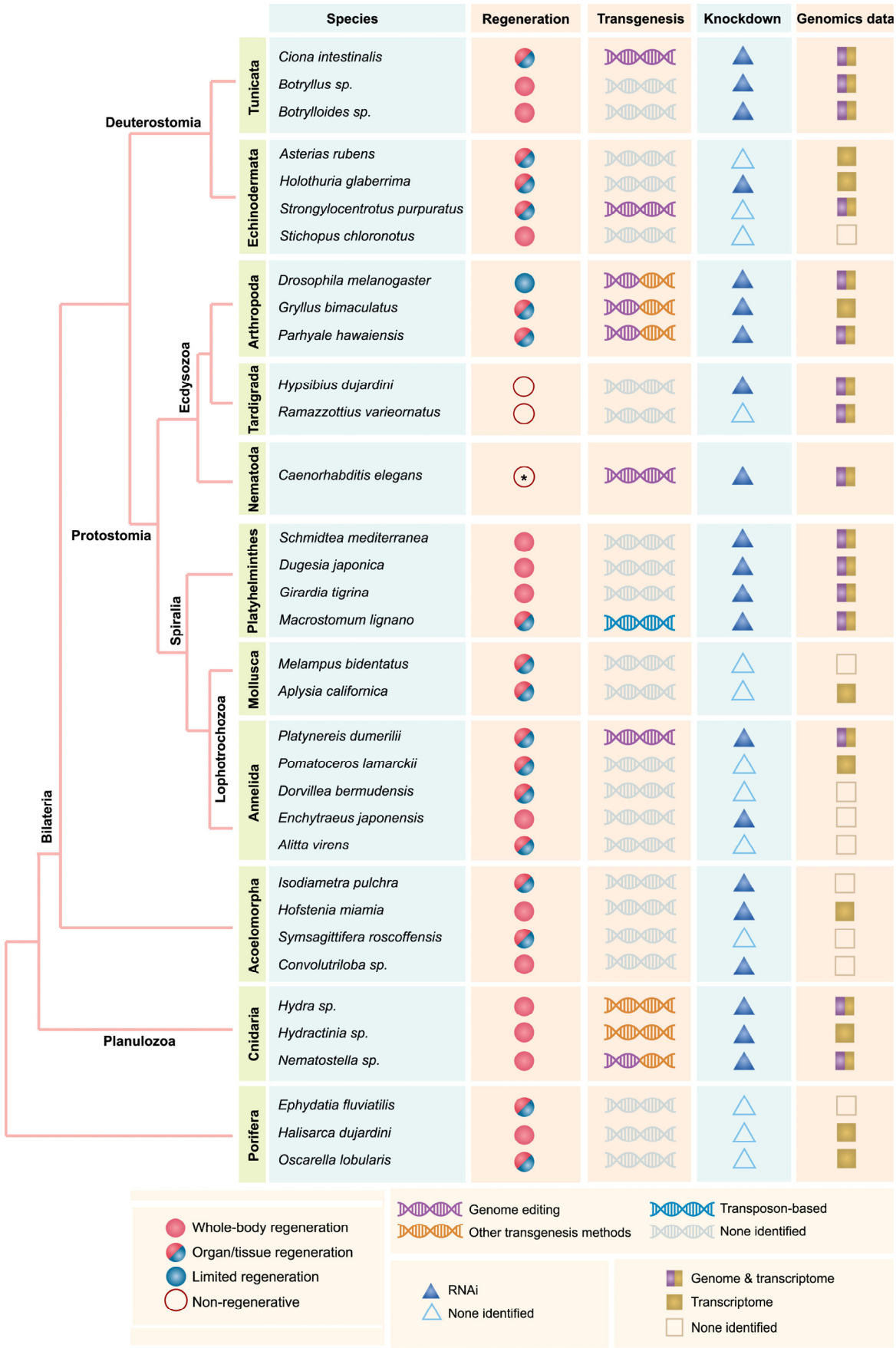


Figure 5 : Outils d'analyse fonctionnelle disponibles chez les modèles invertébrés de régénération.
Adapté de Lai & Abbobaker (2018).

II. Mécanismes de régénération

> "Cellular models for regeneration must explain two essential attributes of adult tissues: the potential for regeneration and the information to guide regeneration. The potential for regeneration refers to the capacity of particular adult cells to replace missing cells. The information for regeneration refers to the molecular instructions that guide which cell types are regenerated." (Witchley *et al.* 2013)

Au cours de la régénération, les différents types cellulaires et leur organisation dans l'espace sont contrôlés précisément, afin d'assurer que la structure régénérée soit fonctionnelle. De plus, celle-ci est intégrée dans l'organisme adulte. Cette section porte sur les deux aspects de la régénération mentionnés par Witchley *et al.* (2013), auxquels je me suis intéressée au cours de la réponse à la blessure chez la méduse *Clytia* : la source des cellules permettant la régénération, et l'information responsable du patterning de la structure en régénération (Fig.6). La question du signal moléculaire déclenchant la régénération est aussi une des questions principales posée par l'étude de la régénération. Comme je n'ai pas pu l'aborder lors de mon étude sur *Clytia*, elle ne sera pas détaillée ici.

II.1. Source des cellules participant à la régénération

Les cellules alimentant les structures en régénération sont d'origines diverses (Fig.7). Il peut s'agir de :

- Cellules encore présentes dans l'organisme se réorganisant et reformant la structure manquante ;
- Cellules souches résidentes capables d'auto-renouvellement et de produire des types cellulaires différenciés (Weissman *et al.* 2001) ;
- Cellules différenciées se dédifférenciant et formant des cellules capables de se diviser et de jouer le rôle de progéniteurs (cellules prolifératives avec nombre limité de division et des possibilités de différenciation souvent limitées à un seul type cellulaire) (Jopling *et al.* 2011) ;
- Cellules différenciées se transdifférenciant (changement d'état différencié) (Jopling *et al.* 2011).

Les cellules souches déjà présentes, ou les progéniteurs formés par dédifférenciation, peuvent être restreints à un type cellulaire (unipotents) ou être capable de donner naissance à de nombreux types cellulaires (multipotents) (Fig.7).

II.1.1. Régénération morphallactique

> "There are known two general ways in which regeneration may take place, although the two processes are not sharply separated, and may even appear combined in the same

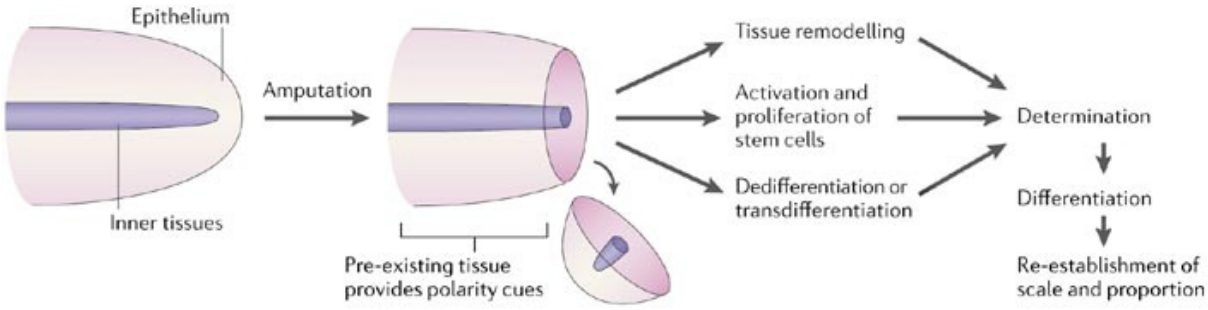


Figure 6 : Mécanismes principaux participant à la régénération.
Ces mécanismes sont communs à toutes les réponses régénératives.
Tiré de Sanchez-Alvarado *et al.* (2006).

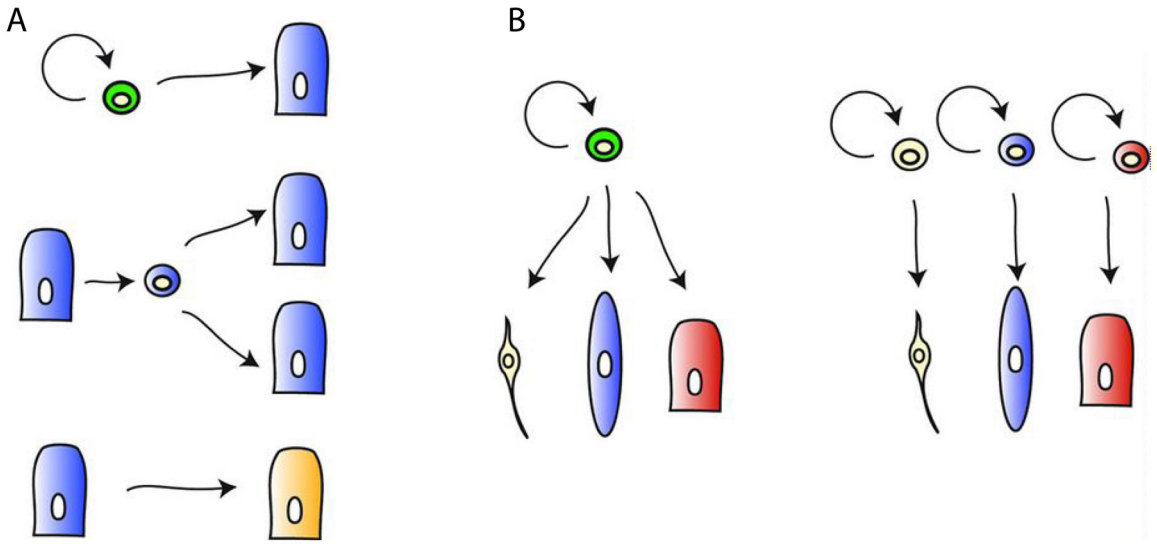


Figure 7 : Cellules contribuant à la régénération.
(A) Autorenouvellement et différenciation d'une cellule souche.
Dédifférenciation produisant un progéniteur produisant d'autres cellules différenciées.
Transdifférenciation d'un type cellulaire en un autre.
(B) Différentes capacités de différenciation des progéniteurs. A gauche, progéniteur donnant naissance à des types cellulaires différents. A droite, progéniteurs produisant uniquement des cellules de même lignée.
Tiré de Tanaka & Reddien (2011).

> form. […]I propose to call those cases of regeneration in which a proliferation of material precedes the development of the new part, 'epimorphosis.' The other mode, in which a part is transformed directly into a new organism, or part of an organism without proliferation at the cut-surfaces, 'morphallaxis'."(Morgan 1901a)

Suite à ses observations sur la régénération chez les planaires, Morgan (1901) définit deux modes de régénération. L'épimorphose est la régénération d'une structure nécessitant la prolifération cellulaire ; et la morphallaxie la régénération basée sur la réorganisation des tissus existants et ne nécessitant pas de prolifération. Les techniques de l'époque n'étaient pas assez perfectionnées pour décrire les mécanismes cellulaires impliqués dans la morphallaxie. La distinction principale entre les deux processus est basée sur l'origine de la structure régénérée, venant des tissus existants pour la morphallaxie, ou de la formation de nouveaux tissus pour l'épimorphose (Morgan 1901a).

Les deux processus peuvent coexister au cours d'une même réponse régénérative (Morgan 1901a). Chez la planaire, sur un fragment postérieur, la tête est régénérée par croissance au niveau de la zone de coupure (épimorphose). Les cellules en prolifération assurent uniquement la régénération de la partie antérieure, et non pas la croissance du reste du corps. Le reste du corps est réorganisé afin de rétablir les bonnes proportions (allongement et amincissement de la planaire) (Fig.4.A) et une organisation correcte des organes (pharynx en position centrale et réorganisation du système gastrovasculaire par exemple). La définition originale de la morphallaxie concerne ce phénomène de remodelage observé chez la planaire, en complément de la régénération par épimorphose.

> "Thus the relative proportions of the planarian are attained by a remodelling of the old tissue. I would suggest that this process of transformation be called a process of morpholaxis." (Morgan 1898)
> "In planarians also the formation of a new worm from a piece involves a change in the form of the old part, as well as the addition of new material at the cut-end." (Morgan 1901a)

Ces observations ont été confirmées par les études plus récentes. Suite à une amputation, seule la tête est régénérée par prolifération à partir des cellules présentes à la zone de coupure. La morphologie globale anormale résultant de la coupe est corrigée par une réorganisation globale des tissus. Il s'agit bien d'un phénomène de morphallaxie (Reddien & Alvarado 2004; Pellettieri 2019).

Les deux termes épimorphose et morphallaxie ont été utilisés dans l'étude de la régénération chez d'autres organismes. Ils sont cependant devenus synonymes d'implication ou non de la prolifération. Ceci est visible par exemple dans la définition de Vervoort (2001):

> "Regeneration that does not require cell divisions is referred to as morphallaxis— the restoration of the missing body part is solely due to the remodeling of pre-existing cells and/or tissues. There are only a few examples of morphallactic regeneration, such as the

initial phases of head regeneration in Hydra and of liver regeneration (after acute pancreatitis) in mammals. In most cases, regeneration requires cell proliferation— this type of regeneration has been named epimorphosis"

Selon cette définition, le seul animal régénérant par morphallaxie, est effectivement l'hydre, pouvant régénérer l'extrémité orale après amputation, même après blocage de la prolifération cellulaire (Cummings & Bode 1984; Galliot 1997). Il y a cependant deux limitations :

- L'amputation doit être faite dans la partie supérieure du corps, la prolifération cellulaire étant nécessaire à la régénération de la partie orale suite à une amputation au milieu du corps (Chera *et al.* 2009).
- De plus, même si la partie orale régénérée en l'absence de division cellulaire est fonctionnelle (capable de se nourrir), elle est incomplète. Le nombre de tentacules régénérés est inférieur à l'original et le système nerveux n'est pas régénéré (Marcum & Campbell 1978; Cummings & Bode 1984).

Même chez la planaire, l'organisme ayant servi à poser la définition originale, la distinction entre épimorphose et morphallaxie n'est pas claire, les deux processus étant imbriqués dans une même réponse régénérative.

"Thus, planarian regeneration cannot be classified into either of the two classic categories. The literature about the terms epimorphosis and morphallaxis is a potential source of confusion" (Agata *et al.* 2003)
"Based on these observations, we propose that 'epimorphosis' and 'morphallaxis' should no longer be used to classify regeneration phenomena, because regeneration cannot actually be divided into these categories." (Agata *et al.* 2007)

Afin de clarifier les définitions, Agata *et al.* (2007) proposent d'abandonner les termes d'épimorphose et de morphallaxie qui sont source de confusion chez la planaire. Ils suggèrent à la place d'utiliser les termes de distalisation et d'intercallation. Au cours de la régénération chez les planaires, les zones de coupure antérieure et postérieure régénèrent respectivement le cerveau et la queue uniquement (distalisation), et les tissus sont ensuite réorganisés pour correspondre à leur nouvelle position (intercallation) (Agata *et al.* 2007). Ces deux termes permettent aussi de décrire la régénération des membres chez les vertébrés.

Pellettieri (2019) propose une nouvelle définition de la morphallaxie, mettant plus l'accent sur l'origine de la structure régénérée, qui était déjà présente dans la définition de Morgan.

"We now know that purely epimorphic or morphallactic regeneration are unlikely to occur in nature […] In light of these considerations, it can be misleading to use Morgan's terminology when referring to a regenerative process in its entirety. Nevertheless, I believe there is justification for continued use of the classic terms, particularly if we allow for a revision to the definition of 'morphallaxis'." (Pellettieri 2019)

Sa nouvelle définition de la morphallaxie est la suivante : “Regenerative process in which anatomical patterning, scale, and proportion are restored through remodeling of an existing part” (Pellettieri 2019). Le terme ‘morphallaxie’ devient synonyme de ‘régénération par remodelage des tissus’. Pelletieri insiste également sur la coexistence de la morphallaxie et l’épimorphose au cours d’une même réponse régénérative (Pellettieri 2019).

Selon cette définition, différents éléments de la réponse régénérative des planaires peuvent être qualifiés de morphallactiques :

- Le patterning global du corps est assuré par l’expression différentielle de gènes le long de l’axe antéro-postérieur (AP). Suite à une amputation, l’expression est ajustée aux nouvelles positions, restaurant le patterning global du corps, ceci même sans prolifération (Witchley *et al.* 2013).

- Le système gastrovasculaire est composé de trois branches primaires, une antérieure et deux postérieures, qui sont ramifiées ensuite avec des branches secondaires et tertiaires (Fig.4.B). Après décapitation, le système gastrovasculaire antérieur est formé par épimorphose, le reste est réorganisé par morphallaxie en fonction du niveau du plan d’amputation et restaure l’organisation des trois branches (Forsthoefel *et al.* 2011).

- Le pharynx est régénéré en dehors de la zone de coupure mais est bien régénéré par prolifération des cellules souches, ce qui est un exemple d’épimorphose. En revanche, la poche pharyngienne dans laquelle il est replié est reformée par réorganisation morphallactique des branches de la cavité gastrovasculaire pendant la régénération.

La régénération morphallactique a été décrite, chez quelques modèles de régénération. L’annélide *Lumbriculus variegatus* régénère la partie antérieure après amputation. Le système nerveux des segments postérieurs est alors réorganisé pour correspondre à la nouvelle position par un processus de morphallaxie (Martinez *et al.* 2005). Chez l’unicellulaire *Stentor coeruleus*, la bissection entraine une restauration de la forme par un réarrangement des parties restantes et non pas par addition de nouvelle partie (Morgan 1901b).

II.1.2. Activation de cellules souches multipotentes

Deux types de cellules souches multipotentes ont été particulièrement bien caractérisés pendant la régénération, il s’agit des cellules souches interstitielles (i-cells) des hydrozoaires et des néoblastes des planaires.

Les néoblastes sont les seules cellules prolifératives des planaires adultes (Fig.8.A). Elles sont localisées dans le parenchyme (tissus entourant l’intestin et le système nerveux) de tout l’animal, à l’exception de l’extrémité de la tête et du pharynx, ce qui peut expliquer le fait que ces régions sont incapables de régénérer seules le reste du corps (Morgan 1898; Newmark & Sánchez Alvarado 2000; Reddien & Alvarado 2004). Il s’agit d’une population hétérogène comprenant des cellules pluripotentes et leurs dérivés (Reddien & Alvarado 2004; Tanaka & Reddien 2011; Wagner *et al.* 2011; Alessandra & Rossi 2019). L’élimination des néoblastes

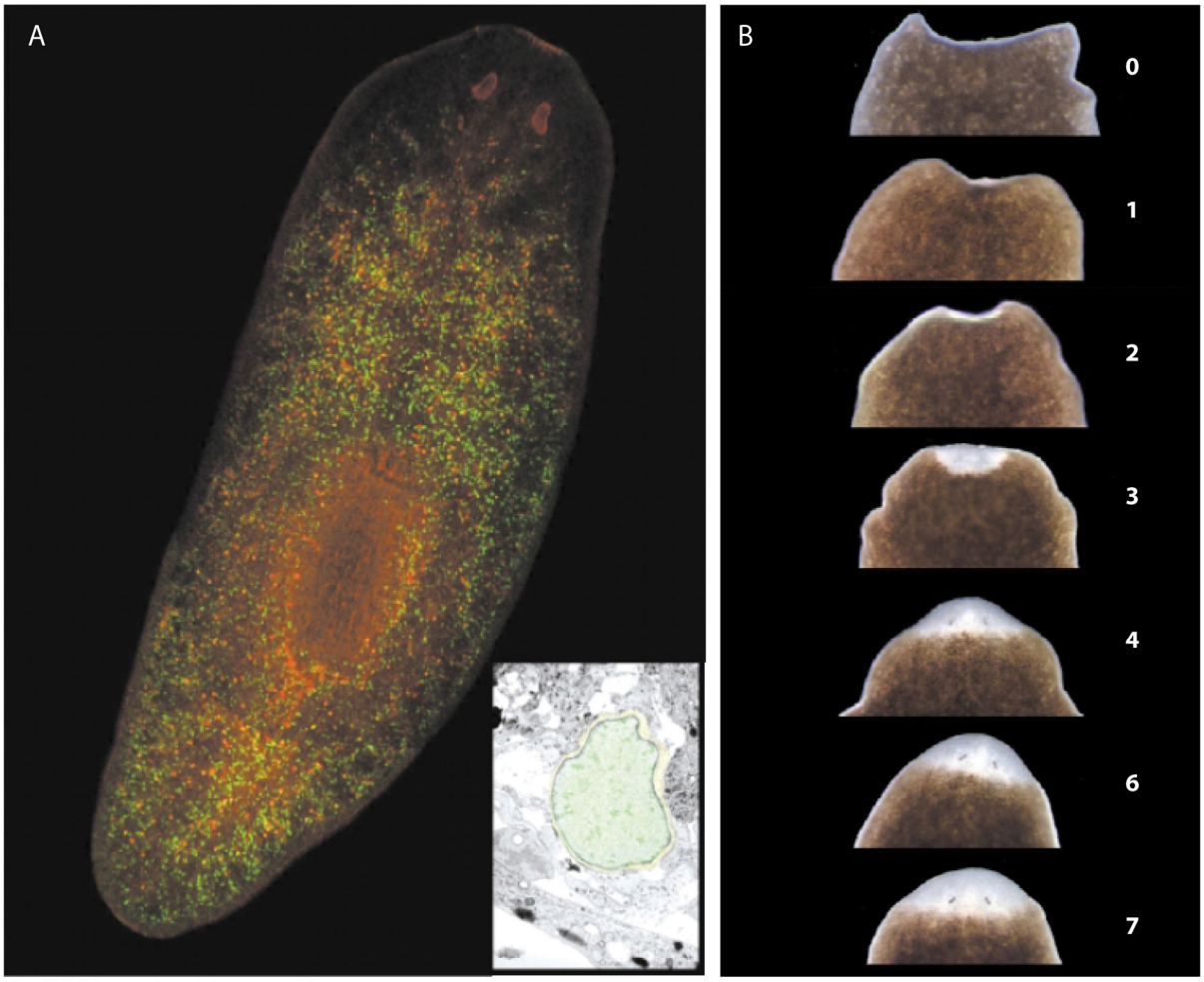


Figure 8 : Régénération épimorphique chez les planaires *Schmidtea mediterranea.*
(A) Localisation des néoblastes dans une planaire non disséquée. En vert, cellules ayant incorporé le BrdU dans les 8h avant la fixation. En rouge, cellules en mitose marquées par l'anticorps anti phospho-histone-H3. Détail d'un néoblaste observé en microscopie électronique à transmission.
(B) Photos d'une planaire en cours de régénération. Le blastème est la zone orale non pigmentée. Les nombres indiquent les jours après décapitation.
Adapté de Newmark & Sanchez-Alvarado (2002).

par irradiation inhibe la régénération et cause la mort des planaires, indiquant leur contribution à la régénération ainsi qu'à l'homéostasie des tissus adultes, qui sont en renouvellement constant (Bardeen & Baetjer 1904). Les cellules souches pluripotentes, appelées néoblastes clonogéniques (c-neoblastes), ont été identifiées par Wagner *et al.* (2011). La démonstration de leur totipotence a été faite de deux façons :

- Il est possible d'irradier les planaires de façon sub-létale, laissant quelques néoblastes après irradiation. Certains de ces néoblastes, les c-néoblastes, donnent naissance par expansion clonale à des clusters de cellules exprimant le marqueur de cellules souches *smedwi1* ainsi que des marqueurs de cellules différenciées. Les c-néoblastes peuvent donc se différencier en plusieurs types cellulaires et sont répartis dans tout le corps de la planaire.
- La démonstration de la multipotence des c-néoblastes a été réalisée en transplantant des c-néoblastes individuels dans des planaires dont toutes les cellules en prolifération ont été préalablement éliminées par irradiation. La transplantation d'un seul néoblaste suffit pour renouveler tous les types cellulaires et ainsi permettre la survie des planaires.

Depuis, des marqueurs moléculaires des c-néoblastes ont été identifiées. Van Wolfswinkel *et al.* (2014) ont généré un jeu de données issu de qRT-PCR sur cellule unique sur un millier de néoblastes isolés, avec 96 gènes incluant des marqueurs de néoblastes, de cycle cellulaire et de dérivés de néoblastes caractérisés. Ceci leur a permis de séparer les néoblastes en trois populations : zeta (ζ), sigma (σ) et gamma (γ) ; les néoblastes σ renfermant les néoblastes pluripotents (van Wolfswinkel *et al.* 2014). Les données récentes de séquençage de transcriptome de cellules uniques confirment le fait que toutes les cellules différenciées des planaires se différencient bien à partir d'une unique population de cellules souches (Plass *et al.* 2018). Elles ont également permis d'identifier une population de néoblastes avec un fort niveau d'expression de *Piwi*, exprimant la *tetraspanin* (codant pour une protéine exprimée à la membrane) et ayant les mêmes caractéristiques que les c-néoblastes (survivent à l'irradiation sublétale, recolonisent l'animal par expansion clonale et la transplantation d'une cellule sauve une planaire irradiée de façon létale) (Zeng *et al.* 2018). La *tetraspanin* est bien exprimée dans les néoblastes σ, préalablement identifiés par Van Wolfswinkel *et al.* (2014) comme la population de cellules contenant les c-néoblastes (Zeng *et al.* 2018).

L'amputation d'une partie de planaire entraine la cicatrisation de la blessure par changement de morphologie et migration des cellules épithéliales (Sanchez Alvarado & Newmark 1998). Puis une première vague de prolifération a lieu dans tout le corps ; il s'agit d'une réponse générique à tout type de blessure (Wenemoser & Reddien 2010). Suite à une perte de tissus uniquement, les néoblastes sont ensuite recrutés vers la zone de coupure, formant une excroissance appelée blastème (Fig.8.B) (Sanchez Alvarado & Newmark 1998; Newmark & Sánchez Alvarado 2000). Il s'agit d'un amas de cellules indifférenciées à partir duquel la nouvelle structure se forme. Le blastème est formé de deux compartiments : une couche superficielle de cellules épithéliales, et une masse interne de cellules mésenchymateuses (Vervoort 2011). Le blastème est une structure observée parmi les invertébrés et vertébrés, associée à la régénération épimorphique. Chez les planaires, la prolifération des néoblastes a lieu dans la zone à la limite entre les tissus restants et le blastème et non pas dans le blastème (Saló & Baguñà 1984, 2002). Les néoblastes contribuent cependant bien à la formation de ce

dernier et à la régénération. En effet, l'élimination des néoblastes par irradiation bloque la formation du blastème et la régénération (Bardeen & Baetjer 1904; Wolff & Dubois 1948; Newmark & Sánchez Alvarado 2000), et la transplantation de tissu non irradié, donc contenant des néoblastes, est suffisante pour rétablir la régénération (Wolff & Dubois 1948). Les néoblastes étant les seules cellules en prolifération des planaires, leur localisation ainsi que leur migration peuvent être visualisées grâce à l'incorporation de l'analogue de la thymidine, la bromodeoxyuridine (BrdU) dans l'ADN pendant la phase de réplication. Après incubation des planaires dans le BrdU et amputation, la présence de cellules marquées au BrdU dans le blastème indique la contribution des néoblastes dans la formation de ce dernier (Newmark & Sánchez Alvarado 2000). La migration des néoblastes vers la zone de coupure a lieu uniquement suite à une blessure. Dans les planaires intactes, les néoblastes sont stationnaires (Guedelhoefer & Alvarado 2012). Le blastème est composé de populations de néoblastes hétérogènes (Scimone *et al.* 2014a).

Chez les polypes hydrozoaires, *Hydractinia* et l'hydre, la régénération de la partie orale après amputation transversale au milieu du corps dépend également d'une population de cellules souches multipotentes, les cellules souches interstitielles (Chera *et al.* 2009; Bradshaw *et al.* 2015). Ces exemples seront détaillés dans la section III.2.1 et III.2.2 de l'Introduction.

II.1.3. Contribution des cellules différenciées

A la différence des planaires, le blastème des vertébrés permettant la régénération des membres est formé par dédifférenciation ou transdifférenciation des cellules adultes à la zone de coupure. Les principaux modèles de régénération des membres chez les vertébrés sont les pattes des amphibiens urodèles (triton, axolotl), la queue du têtard de grenouille et la nageoire caudale du poisson zèbre. Cette section présente deux cas de dédifférenciation (régénération des pattes des urodèles et régénération du cœur et des nageoires du poisson zèbre) et un cas de transdifférenciation (régénération de la lentille du triton).

Cas de la régénération des membres chez les amphibiens

L'étude de la régénération des membres a été faite surtout sur les pattes des tritons et de l'axolotl. L'axolotl est un amphibien néoténique, aquatique en permanence. Son cycle de vie rapide, en comparaison des autres salamandres (moins d'un an), et la possibilité de le compléter au laboratoire, a permis le développement de techniques de modification du génome par CRISPR/Cas9 (Fei *et al.* 2014; Flowers *et al.* 2014) et TALEN (Kuo *et al.* 2015). Les membres des urodèles sont composés de nombreux tissus, comprenant entre autres de l'épiderme, des tissus nerveux périphériques, des muscles, des os et des vaisseaux sanguins du mésoderme, qui doivent être régénéré après amputation. Les pattes sont structurées en trois segments : le bras, l'avant-bras et la main selon l'axe proximo-distal (Fig.9.A).

Après amputation, la blessure cicatrise par migration des cellules épidermiques présentes aux alentours (Haas & Whited 2017), formant un épiderme de blessure (Fig.9.B et C). L'épiderme de blessure a un nombre supérieur de couches de cellules comparé à un épiderme intact. Il est

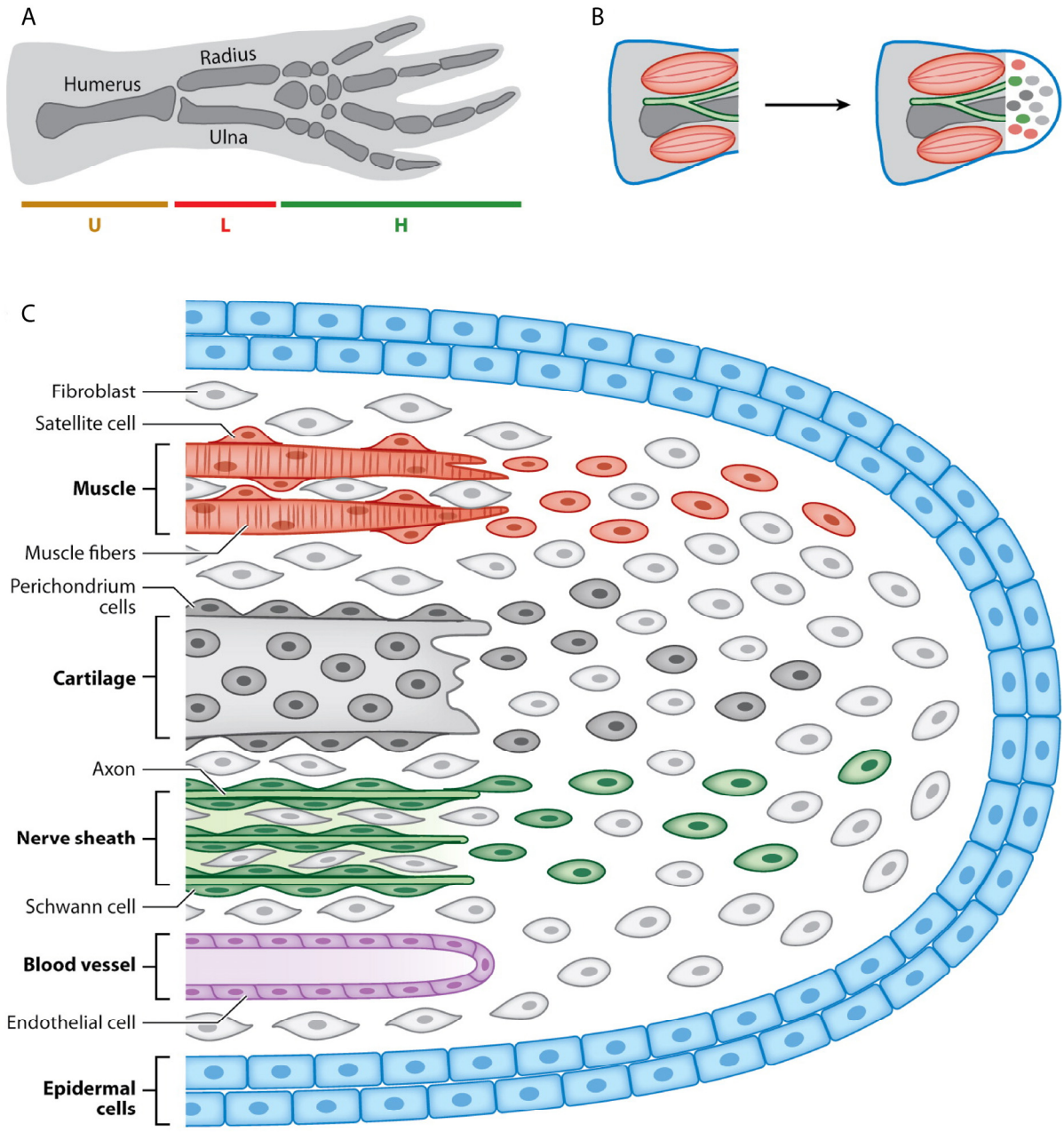


Figure 9 : Formation du blastème suite à l'amputation d'une patte d'amphibien urodèle.
(A) Organisation du squelette d'une patte. Selon l'axe proximo-distal : U : bras, L : avant bras, H : main.
(B) et (C) Formation du blastème suite à l'amputation. Le blastème est recouvert par l'épiderme de blessure (en bleu). La partie mésenchymateuse est composée d'une population de cellules indifférenciées hétérogène, issues des muscles (en rouge), des fibroblastes (en blanc), du cartilage (en gris), et de cellules de Schwann (en vert).
Tiré de Nacu & Tanaka 2011.

parfois appelé ‘Apical Epithélial Cap’ (AEC) (Stoick-Cooper *et al.* 2007; Campbell & Crews 2008). Quatre à cinq jours après amputation, des signaux de l’épithélium de blessure induisent la dédifférenciation des cellules des tissus adjacents, visible par l’histolyse des tissus, la diminution de marqueurs de différenciation et une augmentation de la division cellulaire (Odelberg 2005). Le blastème, à partir duquel le nouveau membre régénère, se forme par migration des progéniteurs puis grandit par prolifération des cellules dédifférenciées (Odelberg 2005; Stoick-Cooper *et al.* 2007; Haas & Whited 2017). Ensuite, la différenciation des cellules et la croissance du membre ont lieu, jusqu’à ce que le membre regagne sa taille originale au bout de cinq à sept semaines chez le triton.

La dédifférenciation n’est pas la seule source de cellules alimentant le blastème. Selon les espèces, les cellules musculaires du membre régénéré peuvent provenir à la fois de la dédifférenciation des fibres musculaires, et l’utilisation des cellules souches associées aux cellules musculaires squelettiques. Ces dernières sont appelées cellules souches satellites et expriment *pax7* (review : (Le Grand & Rudnicki 2007)). Au cours de la régénération de la queue de l’axolotl et des pattes du triton adulte, les fibres musculaires proches de l’épiderme de blessure se fragmentent en cellules mononucléées qui prolifèrent dans le blastème et participent à la régénération (Echeverri *et al.* 2001; Sandoval-Guzmán *et al.* 2014; Tanaka 2016). En revanche, au cours de la régénération des pattes chez l’axolotl, l’activation des cellules satellites, et non pas la dédifférenciation des cellules musculaires contribue à la formation du blastème (Sandoval-Guzmán *et al.* 2014).

Les cellules satellites contribuent aussi potentiellement à la formation du blastème et la régénération des pattes du triton. En effet, Morrison *et al.* (2006, 2010) montrent que des cellules exprimant *pax7,* associées aux muscles squelettiques, sont bien présentes dans les membres du triton. Après amputation, celles-ci se mettent à proliférer et sont présentes dans le blastème à sa formation (Morrison *et al.* 2006). L’expression de *Pax7* diminue dans le blastème et elles ne sont plus détectables après 14 jours (Morrison *et al.* 2010; Sandoval-Guzmán *et al.* 2014), ce qui a conduit à supposer leur non-implication dans la régénération (Sandoval-Guzmán *et al.* 2014). Cependant, des cellules exprimant *pax7* injectées dans le blastème contribuent bien à la régénération (Morrison *et al.* 2006, 2010). Afin de déterminer le rôle des cellules *pax7*+ dans des conditions physiologiques*,* il faudrait suivre leurs dérivés mais cela n’est pas encore possible (Wang & Simon 2016).

Les cellules du blastème sont issues de différents tissus et donnent naissance à des dérivés variés. Une des questions importantes sur la régénération des membres des vertébrés concerne donc la potentialité des cellules présentes dans le blastème. Celle-ci été tranchée par Kragl *et al.* (2009) dans les membres de l’axolotl. En greffant des portions d’embryon transgéniques exprimant la *GFP* dans des hôtes *GFP*-, ils ont pu marquer les différentes lignées cellulaires composant les membres avec la *GFP*. Ils ont ainsi constaté, suite à l’amputation des membres, que les cellules musculaires et sanguines reforment ces deux types de tissus, les cellules dermiques forment le cartilage et le tissu connectif, et les cellules nerveuses donnent naissance uniquement aux cellules nerveuses. Les progéniteurs issus de la dédifférenciation ne deviennent donc pas pluripotent mais leurs capacités de différenciation restent restreintes à leur lignée

cellulaire d'origine. Le blastème est donc composé de différentes populations de cellules ayant des dérivés différents (Kragl *et al.* 2009).

Dédifférenciation au cours de la régénération chez le poisson zèbre

La dédifférenciation de cellules adultes contribue également à la régénération de la nageoire caudale et du cœur chez le poisson zèbre.

Les nageoires du poisson zèbre sont composées de rayons osseux segmentés, séparés par du tissu épidermique (Fig.10.A-C). Chaque rayon est composé d'os recouverts par un épiderme pigmenté dans lequel sont incorporés des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et des nerfs (Akimenko *et al.* 2003; Sehring *et al.* 2016). Suite à l'amputation, la cicatrisation a lieu en 1 à 3h par migration des cellules épithéliales, puis un blastème est formé à l'extrémité de chaque rayon osseux. La division cellulaire commence après 24h. Les ostéoblastes matures se dédifférencient, redeviennent capables de proliférer et migrent pour former le blastème (Fig.10.D). La dédifférenciation donne naissance à des progéniteurs unipotents formant uniquement des ostéoblastes (Knopf *et al.* 2011). Le blastème est organisé en une zone proximale en cours de re-différenciation, une zone médiane dédifférenciée en cours de prolifération, et l'extrémité distale composée de cellules dédifférenciées et ne proliférant pas (Akimenko *et al.* 2003; Wehner & Weidinger 2015). Les autres populations de cellules composant la nageoire ont le même comportement que les ostéoblastes. Des animaux mosaïques ont été générés par transposon Tol2, exprimant la *GFP* dans les cellules de la nageoire venant d'un même progéniteur (Tu & Johnson 2011). Les différentes lignées ont ainsi pu être suivies au cours de la régénération, révélant que neuf lignées cellulaires différentes contribuent à la formation du blastème par dédifférenciation. Après redifférenciation, les types cellulaires conservent leur lignée (Tu & Johnson 2011). Comme chez l'axolotl, le blastème du poisson zèbre est formé de différentes populations de progéniteurs, issues de la dédifférenciation de cellules matures, capables de se différencier uniquement en leur type cellulaire d'origine.

Le cœur du poisson zèbre régénère en deux mois après une amputation de 20% des tissus (Poss 2002). La dédifférenciation des cardiomyocytes est la source de cellules principales de la régénération (Jopling *et al.* 2010; Kikuchi 2014). Leur comportement a été observé grâce à des lignées transgéniques ayant les cardiomyocytes marqués à la *GFP* grâce au système Cre/lox. Au cours de la régénération, les cardiomyocytes se dédifférencient partiellement, les sarcomères se désassemblent mais l'expression de la *GFP* est conservée. Ils regagnent la capacité de proliférer et remplacent ainsi les tissus manquants (Jopling *et al.* 2010).

Transdifférenciation au cours de la régénération de la lentille chez le triton

La contribution de cellules différenciées peut aussi prendre la forme de transdifférenciation. Certains amphibiens sont capables de régénérer la lentille et la rétine (Del Rio-Tsonis & Tsonis 2003; Tsonis *et al.* 2004). Chez le triton, les cellules permettant la régénération de la lentille sont les cellules différenciées de l'iris dorsal appelées cellules de l'épithélium pigmenté. Celles-ci se dédifférencient, ce qui est visible à la perte de la pigmentation, redeviennent capables de

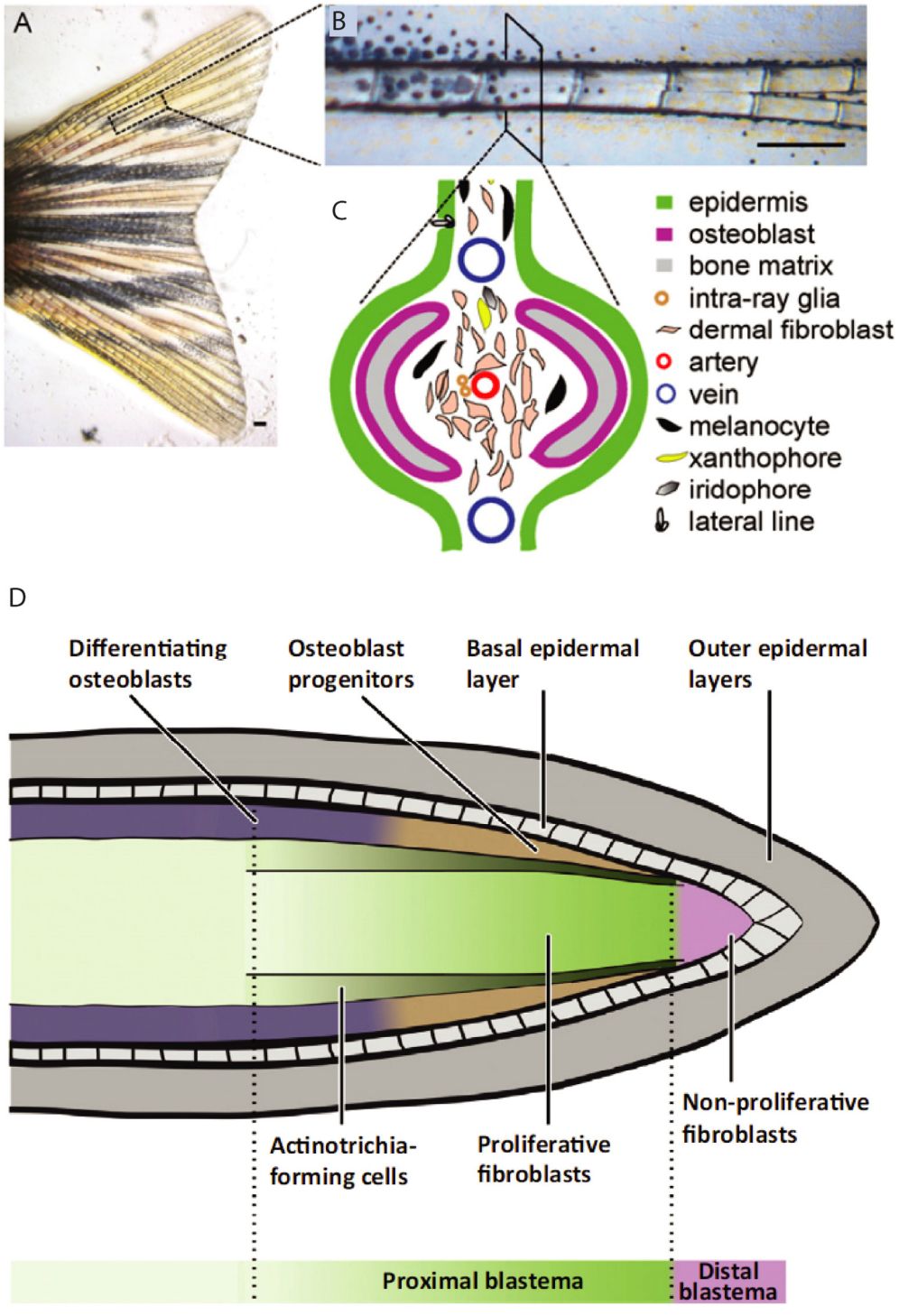


Figure 10 : Formation du blastème suite à l'amputation de la nageoire caudale du poisson zèbre.
(A) Nageoire caudale d'un poisson zèbre. Les couleurs sont dues à des cellules pigmentées : les mélanocytes, xantophores et iridophores. Les autres cellules sont transparentes.
(B) Détail d'un des 18 rayons osseux composant la nageoire caudale.
(C) Schéma d'une section transversale d'un rayon osseux illustrant l'organisation des dix types cellulaires le composant.
(D) Schéma de l'organisation d'un blastème situé sur l'extrémité distale d'un rayon osseux deux jours après amputation.
(A), (B) et (C) Tiré de Tu & Johnson (2011). (D) Tiré de Wehner & Weidinger (2015).

se diviser, puis se transdifférencient en cellules épithéliales de la lentille. Les cellules souches ne sont pas impliquées dans la régénération de la lentille (review : (Tsonis 2007)).

II.2. Intégration et patterning de la structure régénérée

Pour tout processus de morphogenèse (développement, régénération, reproduction asexuée), un système assurant le patterning est nécessaire, afin que la structure soit formée avec une organisation, une taille et des proportions correctes ; un défaut de patterning pouvant signifier une structure non fonctionnelle. Le concept de patterning implique que le comportement des cellules soit déterminé par sa position dans l'embryon ou l'organisme. La régénération est un cas particulier par rapport au développement car la structure régénérée doit s'intégrer dans un corps déjà développé et régionalisé. Le système de patterning de la structure régénérée doit donc s'intégrer dans le patterning global de l'organisme. De plus, le système de patterning doit être suffisamment flexible pour s'adapter à des conditions de départ multiples.

La problématique du patterning des tissus n'est pas nouvelle. A la fin du XVIIIème siècle, Driesch remarque qu'un embryon d'oursin se développe normalement à partir d'un seul des deux premiers blastomères, un processus appelé régulation des embryons. Il en conclue que la position des cellules est déterminée par un système de coordonnées qui dicte son comportement (Wolpert 1996). Puis Morgan, en étudiant la régénération chez l'hydrozoaire *Turbularia* remarque des différences dans le temps de régénération en fonction du niveau d'amputation (Morgan 1906). Il en déduit l'existence de gradient responsable de la polarité de l'organisme. Dans les années 1930, des systèmes de gradients ont été observés chez quelques organismes (Huxley & De Beer 1963).

Puis en 1969, Wolpert développe le concept clé pour tout processus de morphogenèse, celui de l'information de position. Il s'agit du mécanisme spécifiant la position des cellules dans l'organisme et régulant leur état de différenciation. L'identité des cellules serait déterminée par un système de coordonnées défini par des gradients entre plusieurs points du système.

Le concept de l'information de position repose sur cinq points (Wolpert 1969) :
1) La position des cellules dans un organisme est spécifiée par rapport à certains points de ce système. Ces cellules forment alors un champ de position ('positional field').
2) Suite à une étape d'interprétation par la cellule, l'information de position détermine son état de différenciation. Cette étape permet la création de patterns différents à partir d'une même information de position si celle-ci est interprétée différemment par les cellules.
3) Les cellules ont une polarité par rapport aux points de référence du système (appelés 'boundary').
4) Les mécanismes spécifiant la position peuvent agir dans des organismes différents.
5) La régénération du pattern d'origine dépend de la capacité des cellules à changer leur information de position, et à adapter leur état de différenciation à ce changement.

Wolpert illustre l'information de position par le modèle du drapeau français (Fig.11.A). Le point de départ du modèle est une ligne de cellules ayant chacune la capacité de se différencier

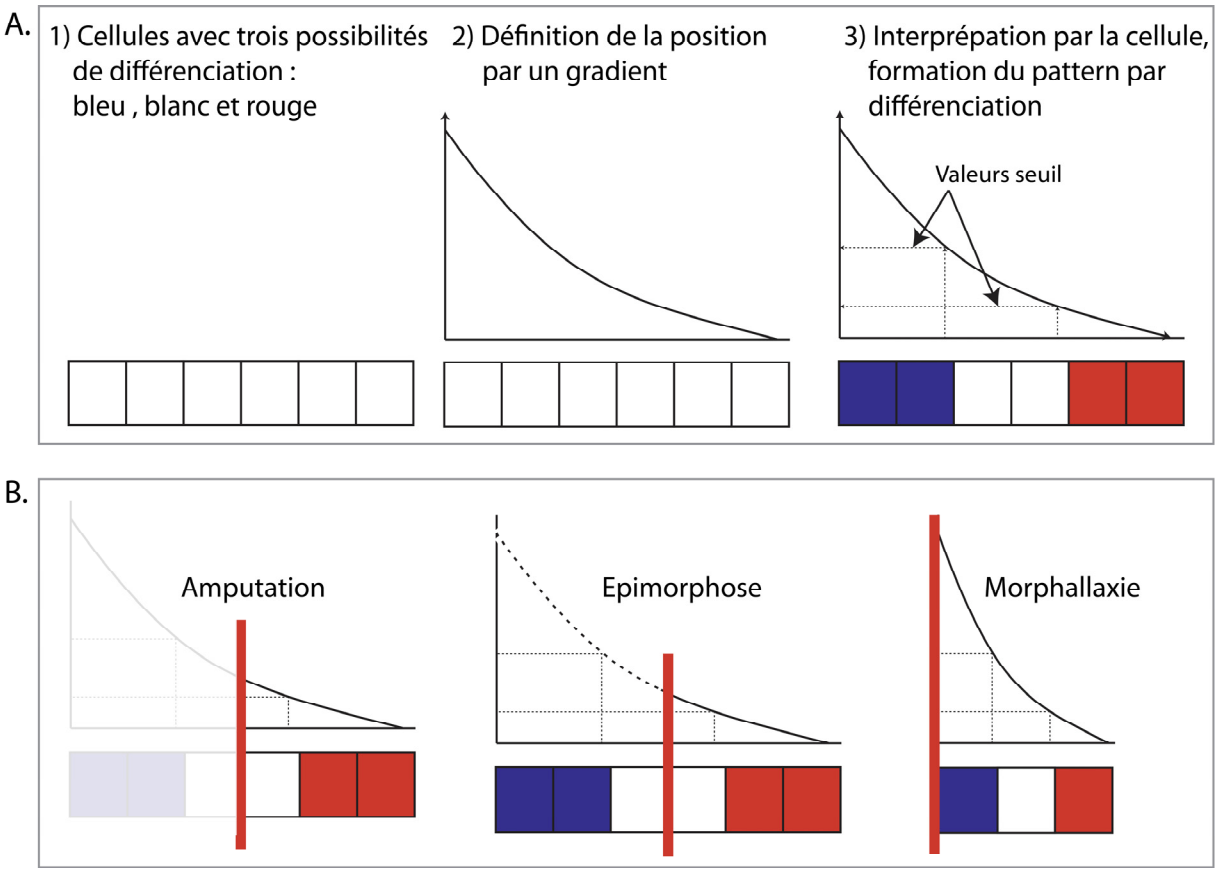


Figure 11 : Modèle du drapeau français de Wolpert
(A) Spécification de l'information de position dans un tissu par un gradient. La pente du gradient détermine la polarité, et les valeurs seuil l'état de différenciation des tissus. Les points de référence sont ici les deux extrémités.
(B) Deux modes de rétablissement de l'information de position suite à une amputation, Dans le cas de l'épimorphose, les valeurs de position manquantes sont générées par la croissance des tissus. Dans le cas de la morphallaxie, l'information de position est re-spécifiée par rapport au nouveau point de référence formé par la zone de coupure.
Inspiré de Wolpert (1996).

en une cellule bleue, blanche ou rouge. Une fois l'information de position spécifiée sous forme d'un gradient, celle-ci est interprétée par les cellules qui forment le pattern (ici du drapeau) en se différenciant. Deux éléments sont importants pour l'interprétation du gradient : la pente donnant la polarité et les valeurs seuil changeant l'état de différenciation (Wolpert 1969).

Les modes de régénération épimorphique et morphallactique peuvent être expliqués par la spécification de l'information de position. Dans le cas de la morphallaxie, la zone de coupure devient un point à partir duquel l'information de position est spécifiée ; toutes les valeurs intermédiaires sont redéfinies à partir de ce point. Dans le cas de l'épimorphose, les nouvelles informations de position sont ajoutées à partir de la zone de coupure pendant la croissance (Fig.11.B).

L'information de position est inscrite dans les tissus de différentes manières, par exemple par des gradients de morphogènes ou dans les molécules structurales. Ces deux exemples seront développés dans la suite.

II.2.1. Modèle classique : patterning par morphogènes

La vision classique du patterning est le patterning par des signaux chimiques diffusibles (morphogènes). Des gradients de morphogènes dans un tissu peuvent, par exemple, être générés selon le système de réaction-diffusion de morphogènes de Turing (1952) et/ou le modèle Gierer-Meinhardt (1972). Parmi les différents organismes utilisés comme exemple, l'hydre et ses capacités de régénération ont fortement contribué à l'établissement de ces modèles et à leur validation expérimentale (ex. (Wolpert *et al.* 1972)).

L'hydre est un cnidaire vivant en eau douce, avec un corps cylindrique polarisé le long de l'axe oral-aboral. A la base est localisé le pédoncule permettant l'attachement au substrat, à l'extrémité orale la bouche, appelée hypostome, entourée d'un anneau de tentacules (Fig.12) (Brusca 2016). Le corps est composé de deux couches de tissus : l'ectoderme à l'extérieur et l'endoderme tapissant la cavité digestive. L'hydre a de grandes capacités de régénération. Le polype peut régénérer les deux extrémités après amputation, ainsi qu'un animal entier à partir d'un fragment (Holstein *et al.* 2003; Bosch 2007). 500 cellules sont suffisantes pour régénérer un animal complet (Bode & Bode 1980), une hydre en contient en moyenne 10^5 (Bode *et al.* 1973). L'hydre est également capable de régénérer un animal à partir d'agrégat de cellules dissociées (Gierer *et al.* 1972). La morphologie de l'hydre et ses capacités de régénération seront décrites plus en détail dans la section III.2.1 de l'Introduction.

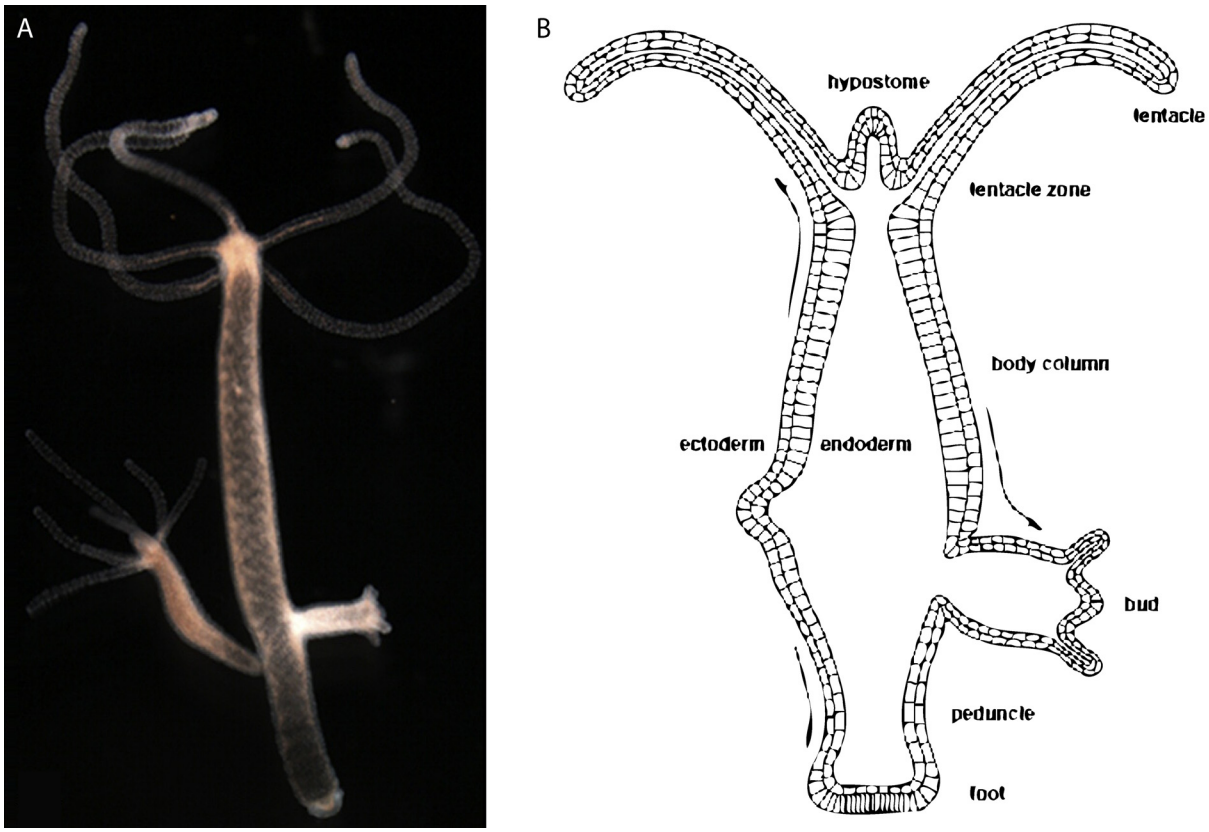


Figure 12 : Morphologie de l'hydre.
(A) Photo d'*hydra magnipapillata.*
Tiré de Glauber *et al.* (2010).
(B) Schéma d'une coupe longitudinale d'une hydre.
Tiré de Bode (1996).

Le modèle de réaction–diffusion de Turing (1952) postule que la formation de patterns dans un tissus peut être expliquée par la présence de deux substances chimiques, appelées morphogènes, interagissant entre elles, et ayant des propriétés de diffusion différentes. Les cellules présentes dans le champ d'action des morphogènes sont capables d'y répondre en changeant leur état de différenciation ou leur comportement. Turing utilise la localisation des tentacules de l'hydre comme exemple de pattern périodique le long d'un cercle (Turing 1952). Les patterns formés sont typiquement des points ou des rayures. Contrairement au modèle de Wolpert reposant sur l'information de position, chaque point ou rayure est formé de la même façon par réaction des deux morphogènes, et non pas en réponse à une information de position unique (Green & Sharpe 2015).

En 1972, Gierer et Meinhardt proposent eux aussi un modèle expliquant la formation de patterns dans un tissus (Gierer & Meinhardt 1972) de façon indépendante à Turing (Meinhardt 2012). Selon ce modèle, les patterns sont créés par l'interaction de deux morphogènes dont les concentrations changent rapidement : un activateur local autocatalytique, et un inhibiteur agissant à longue distance (Gierer & Meinhardt 1972).

Trois ans après la publication du concept d'information de position, Wolpert *et al.* (1972) démontrent de façon expérimentale, grâce aux capacités de régénération de l'hydre, que des gradients de morphogènes peuvent effectivement contrôler la différenciation des cellules et donc encoder l'information de position (Wolpert *et al.* 1972).

Wolpert et Meinhardt ont tous deux proposé un modèle expliquant la polarité et la position du pôle oral et du pied de l'hydre, basé sur la diffusion de morphogènes. Wolpert *et al.* (1974) partent du principe que l'information de position est spécifiée par rapport aux deux extrémités, l'hypostome et le disque basal, par deux morphogènes sécrétés au niveau de l'hypostome. Un premier morphogène sécrété localement a une durée de vie courte, il est utilisé pour former un deuxième gradient de position plus étendu par un deuxième morphogène, et a une action inhibitrice sur ce dernier. Après décapitation de l'hydre, le premier morphogène disparait. Le second augmente donc jusqu'à atteindre une valeur seuil à partir de laquelle les cellules secrètent à nouveau le premier morphogène qui induit la différenciation de la tête (Wolpert *et al.* 1974). Meinhardt (1993) propose un modèle plus complet expliquant également la formation de la tête, du pied, des tentacules et du bourgeonnement (Meinhardt 1993). Selon son modèle, la tête et le pied sécrètent chacun un activateur et un inhibiteur agissant de la même façon que dans le modèle de Wolpert. Les deux extrémités ne s'inhibent pas l'une l'autre mais se repoussent si elles sont trop proches.

Les concepts d'information de position et de patterning par gradients de morphogènes expliquent bien les mécanismes de patterning chez les métazoaires. Les principaux acteurs moléculaires sont les voies de signalisation Wnt/β-caténine et BMP, bien connues pour leur implication dans la morphogenèse. La voie Wnt/β-caténine joue un rôle dans la formation du pôle antérieur (pôle oral) chez les cnidaires (Hobmayer *et al.* 2000; Broun 2005; Kusserow *et al.* 2005; Lengfeld *et al.* 2009) et du pôle postérieur chez les planaires (Fig.13) (Gurley *et al.* 2008; Iglesias *et al.* 2008; Petersen & Reddien 2008). De plus, la voie de signalisation Wnt/β-caténine contrôle l'identité postérieure chez la plupart des bilatériens (review : (Petersen & Reddien 2009b)). Le rôle de la voie BMP et son inhibiteur chordin a été montré chez les bilatériens (Holley *et al.* 1995; De Robertis & Sasai 1996). Ceci a conduit Niehrs (2010) à supposer qu'un système de coordonnées cartésiennes guidant le patterning des organismes serait codé par la voie Wnt/β-caténine pour l'axe AP, et la voie BMP pour l'axe dorso-ventral chez l'ancêtre des bilatériens (Fig.14) (Niehrs 2010). L'information de position serait encodée par ces voies de signalisation.

Dans cette section, le rôle des voies de signalisation dans le patterning au cours de la régénération sera illustré par deux exemples : la régénération chez les planaires, et la régénération des membres des vertébrés.

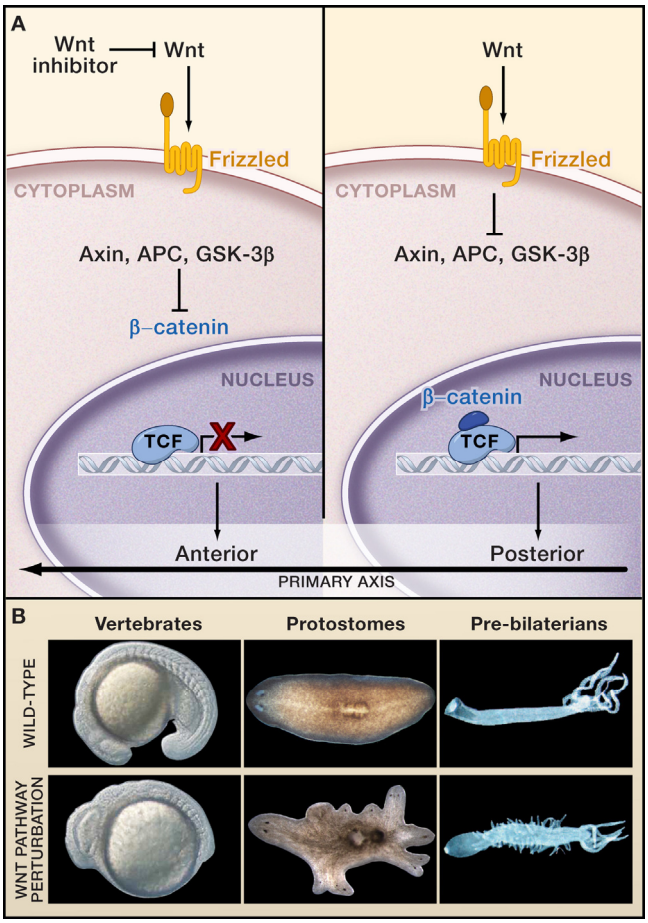


Figure 13 : Role de la voie Wnt/β-caténine dans le patterning de l'axe primaire.
(A) La voie Wnt canonique agit par l'action de la β-caténine. En l'absence de ligand Wnt, la β-caténine est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe protéique composé de la GSK-3β, APC et axin. La liaison d'un ligand Wnt au récepteurs Frizzled (Fzl) provoque la libération de la β-caténine. Elle est alors transloquée dans le noyau, se lie au FT TCF qui active la transcription des gènes cible. Des molécules extracellulaires sécrétés SFRP et Dkk peuvent agir comme inhibiteurs (review Logan & Nusse 2004).
(B) Défaut de l'axe primaire suite à la perturbation de la voie Wnt/β-caténine. A gauche : Elargissement de la tête et non développement de la queue suite à l'inhibition de Wnt3a par MO chez le poisson zèbre (Shimizu *et al.* 2005). Au milieu : Formation ectopique de la tête chez la planaire suite à la diminution de l'expression de Smed-βcat-1 par RNAi (Gurley *et al.* 2008, Iglesias *et al.* 2008, Petersen & Reddien 2008). A droite : formation de tentacules ectopiques chez l'hydre suite à la suractivation de la voie β-caténine par traitement à l'alsterpaullone (Broun *et al.* 2005).
Tiré de Petersen & Reddien (2009).

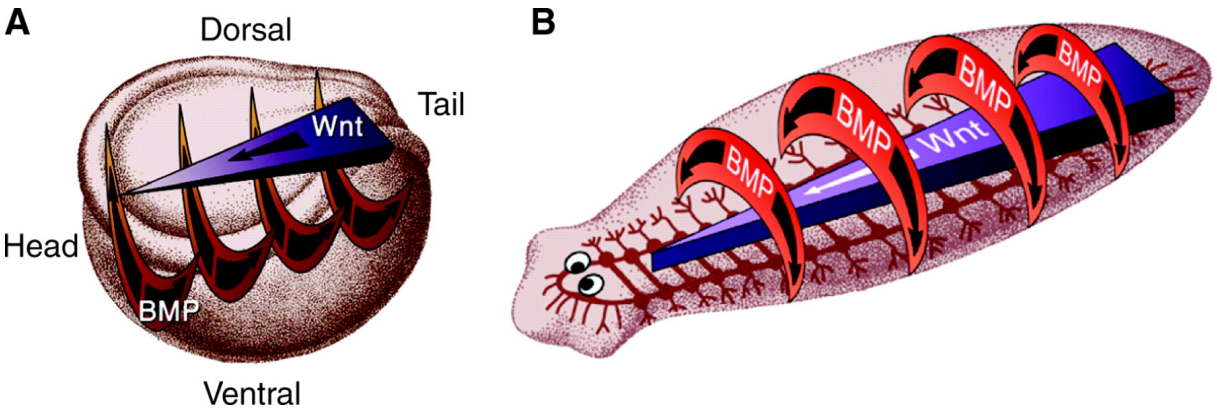


Figure 14 : Formation et maintien des axes AP et DV par les gradients Wnt et BMP.
(A) Chez un embryon de vertébrés, dessin d'un stade neurula.
(B) Chez un protostome, dessin d'une planaire.
Tiré de Niehrs (2010).

Information de position chez les planaires

Différents auteurs, dont Morgan (1901), ont proposé la présence de gradients de morphogènes chez les planaires contrôlant la polarité. L'hypothèse est inspirée de l'observation de capacités de régénérations différentes le long de l'axe AP. En effet, chez certaines espèces, le taux de régénération des photorécepteurs est plus faible si l'amputation est réalisée vers le côté postérieur (Reddien & Alvarado 2004). D'autres arguments sont en faveur de la présence de gradients chez les planaires. En effet, sur des fragments courts selon l'axe AP, le taux de vers régénérant une tête à chaque extrémité est plus élevé que sur des fragments plus longs. Ceci indique qu'une distance minimale le long de l'axe AP est nécessaire pour restaurer la polarité, ce qui correspond bien aux propriétés d'un gradient (Morgan 1898).

Le patterning des planaires le long des axes AP et DV est connu pour être contrôlé par les voies de signalisation Wnt/β-caténine et BMP (Fig.14, Fig.15). Des perturbations de ces voies entrainent des défauts de régénération. En effet, l'incubation de planaires avec RNAi *β-caténine* (Gurley *et al.* 2008; Iglesias *et al.* 2008; Petersen & Reddien 2008) ou *Wnt1* (Petersen & Reddien 2009a) avant décapitation entraine la régénération d'une tête sur les moitiés antérieures régénérant la queue en l'absence de traitement. Au contraire, la diminution de l'expression d'*APC* ou *notum* par RNAi cause la régénération d'une queue sur les moitiés postérieures régénérant la tête en l'absence de perturbation de la voie Wnt/β-caténine (Gurley *et al.* 2008; Petersen & Reddien 2011). *Notum* est exprimé au niveau des blessures face au côté antérieur, et permet la régénération de la tête en inhibant la voie Wnt/β-caténine (Petersen & Reddien 2011). Concernant la voie BMP, l'incubation de planaires dans RNAi *bmp4*, *smad1*, *smad4* (Molina *et al.* 2007; Orii & Watanabe 2007; Reddien *et al.* 2007) ou l'antagoniste *noggin* (Molina *et al.* 2011)entraine respectivement la ventralisation ou la dorsalisation des blastèmes.

Un candidat pour le rôle de morphogène le long de l'axe AP est la β-caténine. Adell *et al.* (2010) proposent l'existence d'un gradient de β-caténine avec un maximum en région postérieure,

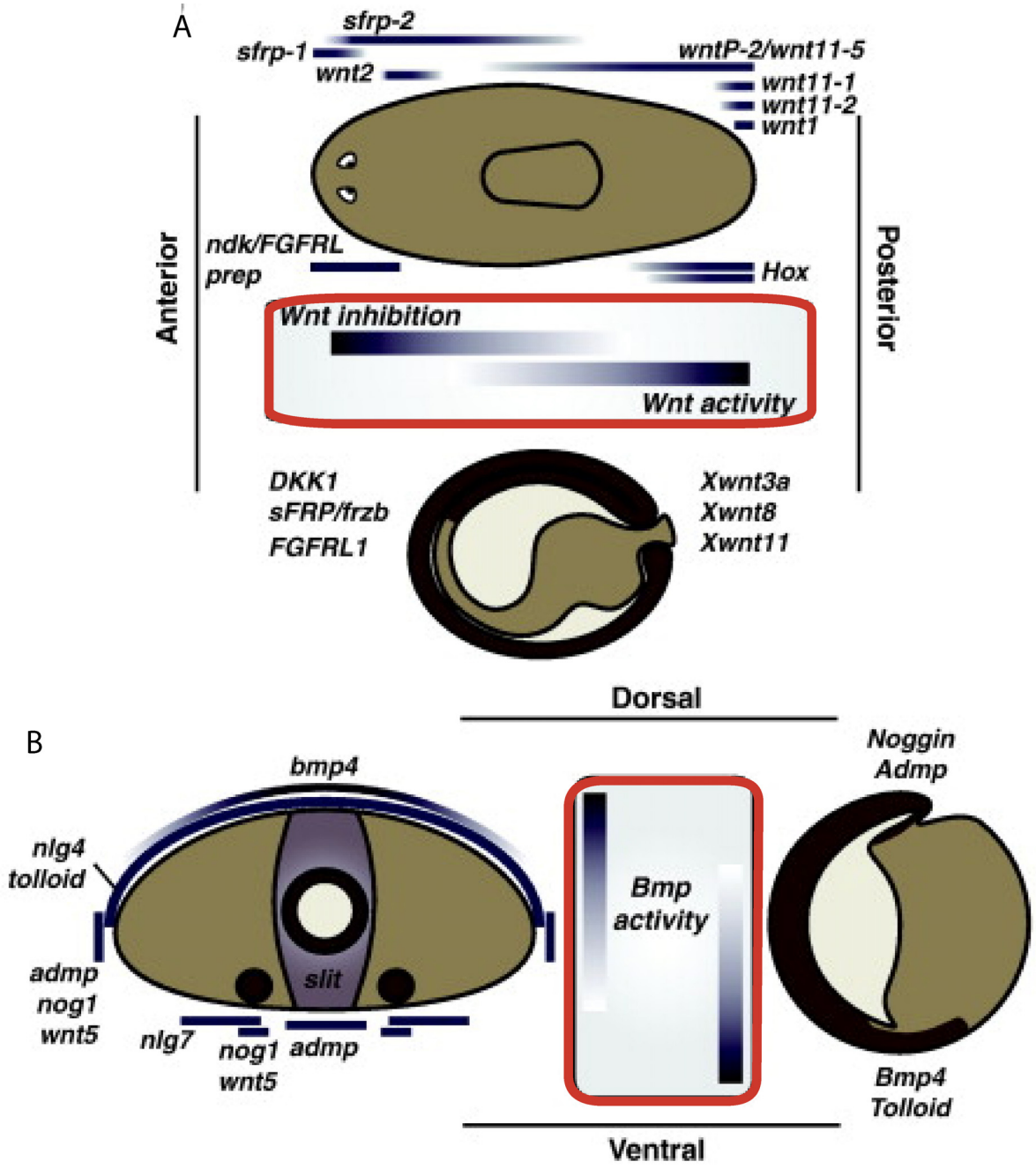


Figure 15 : Domaines d'expression de composants de la voie Wnt et BMP chez la planaire adulte et l'embryon de xénope.
(A) Planaire et vue dorsal, embryon de xénope en vue sagittale.
(B) Section transverse de la planaire et section sagittale de l'embryon de xénope.
Adapté de Reddien (2011).

contrôlé par les ligands *Wnt* exprimés au pôle postérieur (*Smed-wntP-1, Smed-wntP-2, Smed-wnt11-1,* et *Smed-wnt11-2*) (Petersen & Reddien 2008; Adell *et al.* 2009, 2010). D'après Owlarn (2016) la régénération de la tête des planaires serait de type intercalaire. Après amputation de la tête, l'expression de *Notum* au niveau du blastème forme une zone où la signalisation Wnt/β-caténine est réduite, accolée à une zone postérieure où la signalisation Wnt/β-caténine est plus forte, créant une interruption dans le continuum et donnant ainsi le signal de régénérer les parties manquantes aux néoblastes (Owlarn & Bartscherer 2016). Selon le modèle de Wolpert, ce cas de régénération correspond bien à la régénération morphallactique. L'intercalation a lieu même après élimination des néoblastes par irradiation ce qui indique que l'information de position est présente dans les tissus différenciés (Kato *et al.* 2001).

Umesono *et al.* (2013) proposent la présence d'un deuxième gradient de morphogène opposé à celui de la β-caténine. La décision de la polarité AP chez la planaire après amputation serait médiée par un gradient de signaling ERK plus fort au côté antérieur, et un gradient de β-caténine plus fort au côté postérieur (Umesono *et al.* 2013).

Chez les planaires adultes, les gènes impliqués dans le patterning sont exprimés de façon constitutive et régionalisée (Reddien 2011). L'information de position est donc active en permanence. De nombreux gènes ont une expression régionalisée le long d'un des axes du corps. Ceux codant pour des protéines régulant des voies de signalisation importantes pour le patterning ou dont la perturbation de l'expression par RNAi entraine un défaut de patterning sont définis comme les 'Position Control Genes' (PCG) (Witchley *et al.* 2013). *Wnt1* exprimé à la queue (Petersen & Reddien 2009a), *notum* au pôle antérieur (Petersen & Reddien 2011) et *bmp4* au côté dorsal (Orii & Watanabe 2007) font partie des PCG. Les PCG formeraient un système de coordonnées le long des axes des planaires. Leur expression est dynamique après amputation, par exemple les déterminants de polarité *notum* (Petersen & Reddien 2011) et *Wnt1* (Petersen & Reddien 2009a) sont réexprimés respectivement aux extrémités antérieures et postérieures après amputation. L'expression des PCG est ajustée après amputation pour correspondre à la nouvelle position (Witchley *et al.* 2013; Reuter *et al.* 2015). L'ajustement de l'expression des PCG se produit même dans les animaux irradiés, elle est donc indépendante des néoblastes (Witchley *et al.* 2013). Suite à une blessure, l'ajustement de l'expression des PCG à leur nouvelle position dans les cellules différenciées et l'expression de nouveaux PCG au niveau de la blessure pourrait influencer les types cellulaires produits par les néoblastes (Witchley *et al.* 2013). L'expression de certains PCG forme un gradient AP et leur expression dépend de la Wnt/β-caténine (Owen *et al.* 2015; Reuter *et al.* 2015).

Information de position chez les vertébrés

Parmi les vertébrés, les amphibiens et les poissons téléostéens sont capables de régénérer les membres ou les nageoires (review : (Akimenko *et al.* 2003; Brockes & Kumar 2003)). De nombreux points communs entre la régulation de la régénération et du développement ont été mis en évidence, notamment l'implication des voies de signalisation shh, Wnt et FGF (Brockes & Kumar 2003; Stoick-Cooper *et al.* 2007; Lin & Slack 2008; Singh *et al.* 2012; Delgado & Torres 2017). La régénération des membres des urodèles est médiée par les voies de

signalisation FGF, Wnt, HH et l'acide rétinoïque (Scadding & Maden 1994; Mullen *et al.* 1996; Endo *et al.* 1997; Han *et al.* 2001; Ghosh *et al.* 2008; Nacu & Tanaka 2011; Singh *et al.* 2012).

Différents modèles théoriques ont été élaborés pour expliquer le patterning des membres des vertébrés, entre autre celui de French (1976), et deux modèles élaborés par Meinhardt (1983, 1983).

Le modèle de French (1976) se focalise sur la détermination de l'information de position. Il propose que celle-ci soit donnée par un système de coordonnées polaires (French *et al.* 1976). Selon son modèle, les cellules soumises à l'information de position adopteraient deux types de comportements: l'intercalation et la distalisation. **L'intercalation** suppose la présence de marqueurs de position localisés le long des axes du corps et utilisés comme coordonnées. La juxtaposition de deux tissus avec des marqueurs de position normalement éloignés entraine la régénération entre les deux tissus de ceux correspondant aux coordonnées manquantes. La régénération intercalaire a lieu chez les vertébrés en cas de greffe d'extrémité distale d'un membre (Roensch *et al.* 2013). **La distalisation** consiste en la production de cellules ayant des valeurs plus distale que le marqueur. En l'absence de greffe, la régénération des membres des vertébrés se fait par distalisation (Roensch *et al.* 2013).

Meinhardt (1983, 1983) a proposé deux modèles expliquant le développement et la régénération des membres chez les urodèles, basés sur la sécrétion de morphogènes. Le '**boundary model**' explique l'initiation et la maintenance du développement : la juxtaposition de cellules mésenchymateuses antérieures, postérieures, dorsales et ventrales induirait la production d'un morphogène soluble par l'épiderme, qui adopterait une identité distale (Meinhardt 1983a). Le **modèle bootstrap** postule que les cellules à l'extrémité distale favorisent la production du morphogène distalisant (Meinhardt 1983b).

La présence de gradients de morphogène n'a pas été formellement prouvée chez les vertébrés. Certaines voies de signalisation comme l'acide rétinoïque, FGF et HH pourraient jouer le rôle de morphogènes. Chez l'axolotl, l'acide rétinoïque forme un gradient dans le blastème, avec une concentration plus forte dans la partie postérieure que dans la partie antérieure (Scadding & Maden 1994) et est impliqué dans le contrôle de l'information de position dans le blastème (Crawford & Stocum 1988). De plus, il est connu pour influencer l'expression des gènes *Hox* au cours de la régénération (Gardiner *et al.* 1995). Cependant, Kragl *et al.* (2009) ont montré que seule une partie des cellules contient l'information de position. En effet, les cellules dérivées du cartilage expriment des marqueurs associés à l'identité proximo-distale (localisation nucleaire de MEIS 1+2, et ARNm *HoxA*), et conservent l'information de position même après greffe sur un autre blastème. Ce n'est cependant pas le cas des cellules de schwann (Kragl *et al.* 2009).

Au cours de la régénération, la croissance de la nageoire caudale du poisson zèbre est régulée de telle sorte que la nageoire régénérée ait la même taille que l'originale (Akimenko *et al.* 2003). Lee *et al.* (2005) ont observé que le taux de prolifération dans le blastème, le taux de croissance de la nageoire, ainsi que le niveau de signalisation FGF sont dépendants du niveau proximo-

distal du plan d'amputation. De plus, ils ont déterminé que l'atténuation de la signalisation FGF diminue la prolifération dans le blastème et donc la croissance de la nageoire. Chez le poisson zèbre, la signalisation FGF contrôle le taux de croissance dépendant de la position (Lee 2005).

Chez l'axolotl, le modèle du membre accessoire ('accessory limb model') consiste en l'induction de la régénération à partir d'une blessure au niveau d'un membre, qui ne déclenche normalement pas de réponse régénérative. Suite à la blessure, la déviation des nerfs vers la blessure déclenche la formation du blastème, puis la greffe de tissus venant du côté opposé du membre induit la régénération ectopique d'un membre (Satoh *et al.* 2007, 2015). Il permet de tester directement l'effet inductif de signaux sur la régénération. La stimulation de la voie de signalisation HH par traitement avec un agoniste de smoothened permet le développement du membre accessoire sans greffe de tissus (Nacu *et al.* 2016).

II.2.2. Rôle des éléments structuraux

Le rôle des voies de signalisation dans le patterning au cours de la morphogenèse est bien établi. Les éléments structuraux fournissent également des informations de position nécessaires, soit au développement du bon pattern, soit à l'intégration de la structure en régénération dans les tissus encore présents (Witchley *et al.* 2013; Livshits *et al.* 2017; Oderberg *et al.* 2017). Ils peuvent être source de molécules diffusibles ou exercer des contraintes mécaniques sur les tissus en développement. Le rôle de forces mécaniques pendant le développement commence à être caractérisé chez quelques organismes (Beloussov 2008; Howard *et al.* 2011; Urdy 2012; Guillot & Lecuit 2013; Heisenberg & Bellaïche 2013). Par exemple, les forces mécaniques générées par le cytosquelette d'actomyosine (Munjal & Lecuit 2014; Munjal *et al.* 2015) ou encore le changement de volume des cellules (Saias *et al.* 2015) jouent un rôle sur la forme de l'embryon. La déformation des tissus induit une information mécanique activant des voies de signalisation (Pouille *et al.* 2009; Hirata *et al.* 2015), induisant l'expression de gènes (Desprat *et al.* 2008) ou dirigeant la différenciation cellulaire (Miller & Davidson 2013).

Deux exemples illustrant le rôle des éléments structuraux dans l'information de position seront développés dans cette section : le cas de l'information de position fournie localement au niveau de la blessure, et celui du codage de l'information de position dans des structures couvrant tout l'organisme, les muscles.

Information au niveau de la blessure

Chez les planaires, la polarité AP est contrôlée par les ligands *Wnt* à l'extrémité postérieure, et l'inhibiteur de la voie Wnt/β-caténine *notum* à l'extrémité antérieure (Petersen & Reddien 2011). *Notum* est exprimé dans un cluster de cellules localisé à l'extrémité du blastème antérieur, appelé le 'pôle antérieur'. Les cellules exprimant *notum* coexpriment le TF *Zic-1* et sont issues de néoblastes exprimant *foxD*. Ces deux gènes sont nécessaires à la formation du pôle antérieur (Vásquez-Doorman & Petersen 2014). La diminution de leur expression par RNAi entraine des défauts de régénération comme une fusion des lobes du cerveau ou des yeux (Scimone *et al.* 2014b; Vásquez-Doorman & Petersen 2014; Vogg *et al.* 2014) indiquant que le pôle antérieur est nécessaire au patterning AP et médio-latéral du blastème. De plus, les cellules

du pôle antérieur contiennent seules l'information de polarité et ont bien un rôle dans le patterning oral, puisque sa transplantation sur la partie postérieure génère la formation d'une excroissance polarisée.

Le pôle antérieur est une structure importante pour le patterning pendant la régénération. La façon dont les cellules du pôle antérieur sont spécifiées n'est en revanche pas connue. Oderberg *et al.* (2017) ont montré que le pôle oral se forme systématiquement sur des blessures face au côté antérieur, au niveau de la midline, une structure connue pour guider la croissance des axones chez les vertébrés et formant la ligne de séparation bilatérale du CNS, et de la frontière DV (Fig.16) (Oderberg *et al.* 2017). Les progéniteurs formant le pôle antérieur sont spécialisés au niveau du plan médian de la midline puis s'accumulent au niveau de la frontière DV une fois devenus des progéniteurs post-mitotiques (Fig.16) (Oderberg *et al.* 2017). La spécification des progéniteurs du pôle antérieur au niveau de la midline, et non pas sur le plan médian de la blessure est cohérente avec le fait que le blastème est formé au niveau de l'ancienne extrémité antérieure, et non pas au milieu de la blessure (Oderberg *et al.* 2017). Ces observations indiquent que chez les planaires, l'information de position permettant la formation du pôle antérieur, contrôlant le patterning du blastème, est localisée sur le plan de la blessure. Ce système permet l'intégration des tissus régénérés dans les anciens.

Information donnée par les fibres musculaires

Parmi les éléments structuraux, les fibres musculaires peuvent être une source d'information de position. En effet, chez les planaires les PCG sont exprimés dans les cellules musculaires (Witchley *et al.* 2013). Les PCG ont également été décrits chez les acoeles (*Hofstenia miamia* Raz 2017). Il s'agit de vers plats aquatiques à symétrie bilatérale (Brusca 2016). Leur morphologie très similaire à celle des planaires a conduit à les considérer comme appartenant aux plathelminthes (Egger *et al.* 2009; Bely & Sikes 2010). Les phylogénies récentes placent les acoeles dans les xenacoelomorphes, le groupe de bilatériens le plus primitif, groupe frère des néphrozoa regroupant protostomiens et deutérostomiens (Halanych 2004; Philippe *et al.* 2007; Egger *et al.* 2009; Hejnol *et al.* 2009; Edgecombe *et al.* 2011; Dunn *et al.* 2014). Comme les planaires, les acoeles sont capables de régénérer le corps en entier à partir de fragments (Bely & Sikes 2010; Srivastava *et al.* 2014). La régénération est assurée par les néoblastes qui sont les seules cellules en prolifération et expriment *Piwi* (De Mulder *et al.* 2009) et la polarité AP et DV est contrôlée par les voies de signalisation Wnt/β-caténine et BMP (Srivastava *et al.* 2014). Les acoeles possèdent des muscles circulaires et longitudinaux (Brusca 2016). Les PCG des acoeles, comme ceux des planaires, sont exprimés dans les muscles en condition d'homéostasie et de régénération, et présentent des domaines d'expression dynamiques suite à une blessure (Raz 2017). Les muscles renferment donc l'information de position dans ces deux groupes. Leur position phylogénétique a conduit Raz *et al*. (2017) à formuler l'hypothèse que les muscles ne seraient à l'origine pas uniquement un tissu contractile, mais serviraient de carte physique de position contrôlant le patterning de l'animal (Fig.17) (Raz *et al.* 2017).

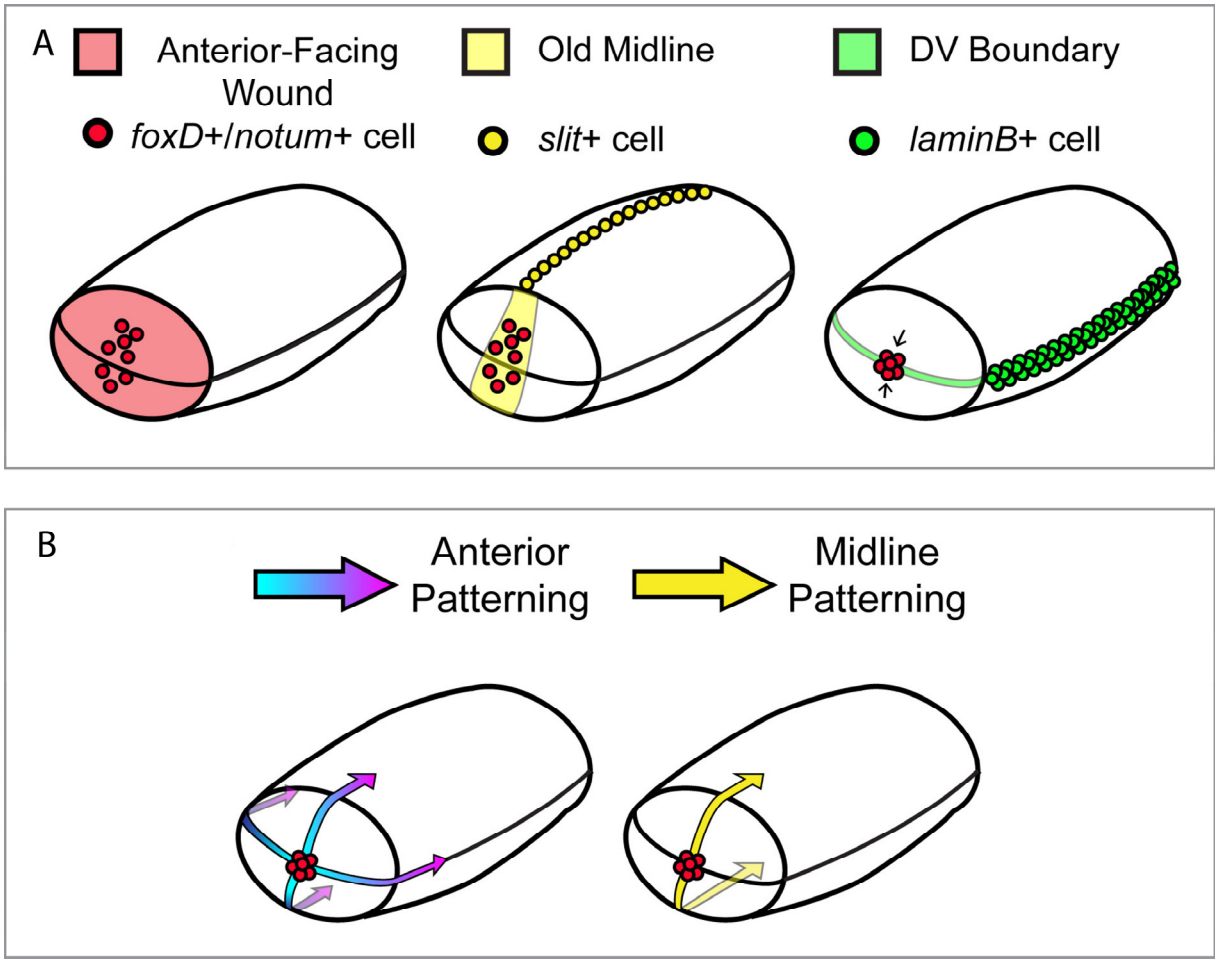


Figure 16 : Modèle pour la formation du pôle antérieur.
(A) Les progéniteurs du pôle antérieur sont spécifiés sur une blessure antérieure au niveau de la midline. Ils sont ensuite concentrés à la frontière dorso-ventrale.
(B) Le pôle antérieur permet le patterning correct des axes AP et ML de la tête.
Tiré de Oderberg *et al.* (2017).

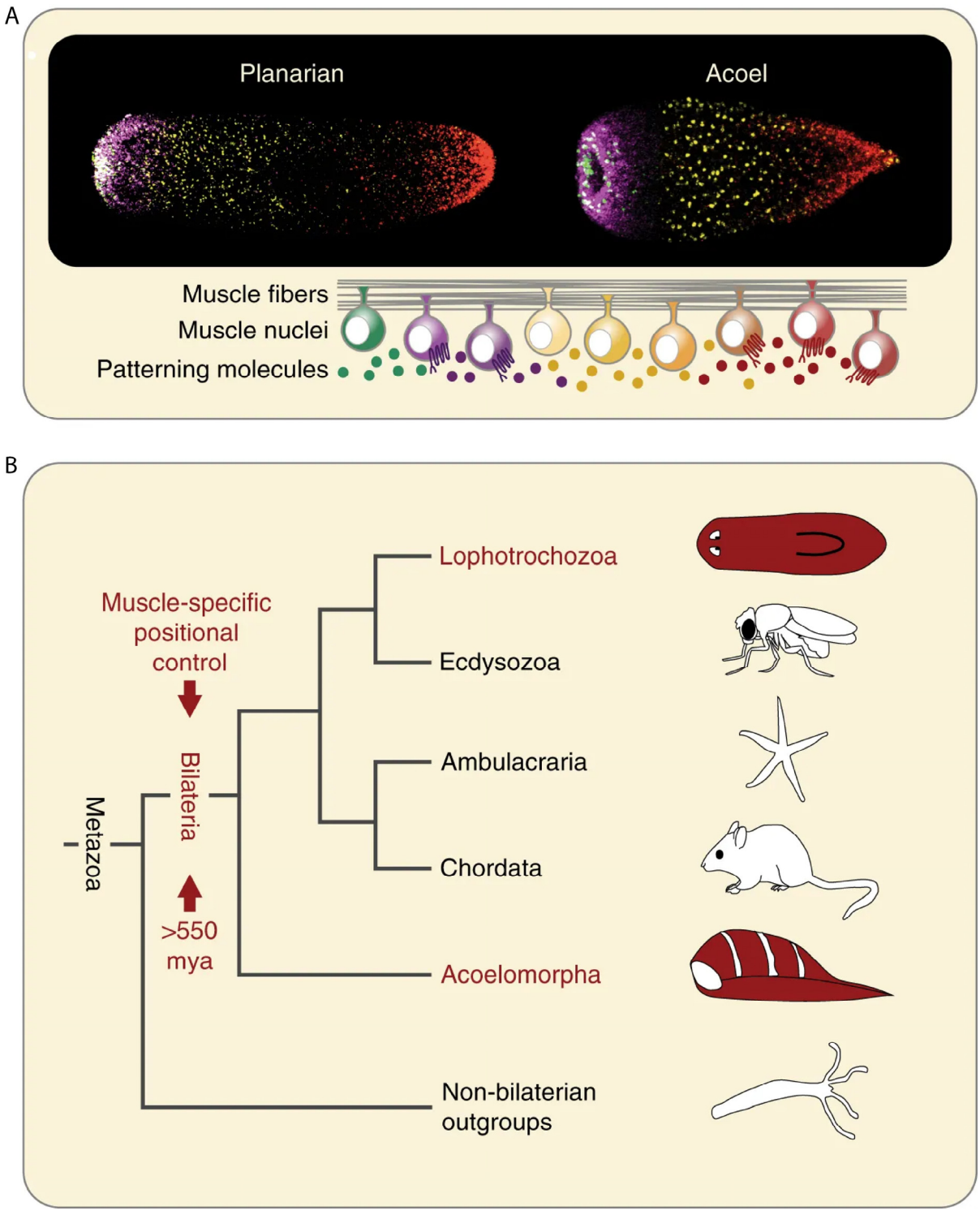


Figure 17 : Information de position fournie par les fibres musculaires.
(A) Expression des PCG dans les muscles chez les planaires et l'acoele *Hofstenia miamia*.
(B) Leur position phylogénétique distante suggère que les muscles seraient responsables de l'information de position chez l'ancêtre des bilatériens.
Tiré de Raz *et al.* (2017).

Chez les planaires *Dungesia japonica* et *Schmidtea mediterranea*, les muscles sont répartis en couches avec différentes orientations. De l'extérieur vers l'intérieur, on trouve sous la membrane sub-épidermale : des muscles circulaires, une couche de muscles orientés en diagonale, une couche longitudinale fine puis épaisse (Fig.18.A) (Scimone *et al.* 2017). Scimone *et al.* (2017) montrent que les différents types musculaires jouent des rôles distincts pendant la régénération (Fig.18.B). Les fibres musculaires longitudinales sont spécifiées par le FT *myoD* (FT bHLH avec un rôle conservé dans la myogenèse (Buckingham & Rigby 2014)) et expriment de nombreux PCG (Scimone *et al.* 2017). La diminution de l'expression de *MyoD* par RNAi entraine la disparition de ces fibres musculaires et un échec de la régénération orale et aborale. La cicatrisation a bien lieu, mais *Notum* et *Wnt1,* nécessaires à la formation des blastèmes antérieur et postérieur ne sont pas réexprimés. De plus, les domaines d'expression des PCG ne sont pas rétablis après amputation. En revanche, la différenciation des néoblastes n'est pas affectée puisque la régénération de l'œil a toujours lieu. Les fibres longitudinales sont donc nécessaires pour l'initiation de la régénération (Fig.18.B). Ce rôle est spécifique aux muscles longitudinaux. L'incubation des planaires dans du RNAi *nkx1-1* (un FT à homéodomaine) entraine la perte des fibres musculaires circulaires. Après décapitation, le blastème se forme. Cependant, les têtes régénérées sont anormales, présentant des yeux ectopiques, des branches de l'intestin surnuméraires, une midline bifurquée, et même un double axe (deux têtes fusionnées sur un même blastème). Les fibres circulaires sont donc impliquées dans le patterning médio-latéral du blastème (Fig.18.B) (Scimone *et al.* 2017) et peuvent traduire des informations structurales en information de position.

Chez les planaires, l'action des muscles est médiée par les PCG et relève des voies de signalisation (Witchley *et al.* 2013; Scimone *et al.* 2017). En revanche chez l'hydre, il a été montré que les fibres musculaires jouent un rôle mécanique sur le contrôle de l'axe oral-aboral pendant la régénération à partir d'un fragment (Livshits *et al.* 2017). Les couches épithéliales ectodermiques et endodermiques sont composées en majorité de cellules myoépithéliales (aussi appelées cellules épithélio-musculaires, voir section III.1.3 de l'Introduction) formant ensemble un réseau supra-cellulaire de fibres d'actine (Kass-Simon 1976; West 1978; Seybold *et al.* 2016). Les fibres sont orientées de façon longitudinale dans l'ectoderme, et circulaire dans l'endoderme. L'hydre est surtout étudiée pour le rôle des voies de signalisation comme la voie Wnt/β-caténine (Hobmayer *et al.* 2000; Lengfeld *et al.* 2009; Bode 2012), ce qui en fait un modèle particulièrement intéressant pour étudier l'intégration des informations du cytosquelette avec les voies de signalisation.

L'hydre est capable de régénérer un animal entier à partir d'un fragment (Holstein *et al.* 2003; Bosch 2007). Après dissection du fragment, celui-ci se replie tout d'abord en un spéroïde vide (Krahe *et al.* 2013), avant la régénération de l'animal entier avec une tête et un pédoncule. Au cours de la formation du sphéroïde, le pliage des tissus rapproche des tissus qui étaient distants dans l'hydre entière, et donc déforme les gradients de morphogènes initialement présents. La polarité chimique par rapport au parent est perdue (Livshits *et al.* 2017). Livshit *et al.* (2017) ont montré que les fibres d'actine du sphéroïde sont orientées préférentiellement selon une direction (Fig.19). Cette orientation est héritée du fragment isolé et détermine l'axe du polype régénéré. L'orientation de l'axe primaire est donc conservée entre le polype d'origine et le

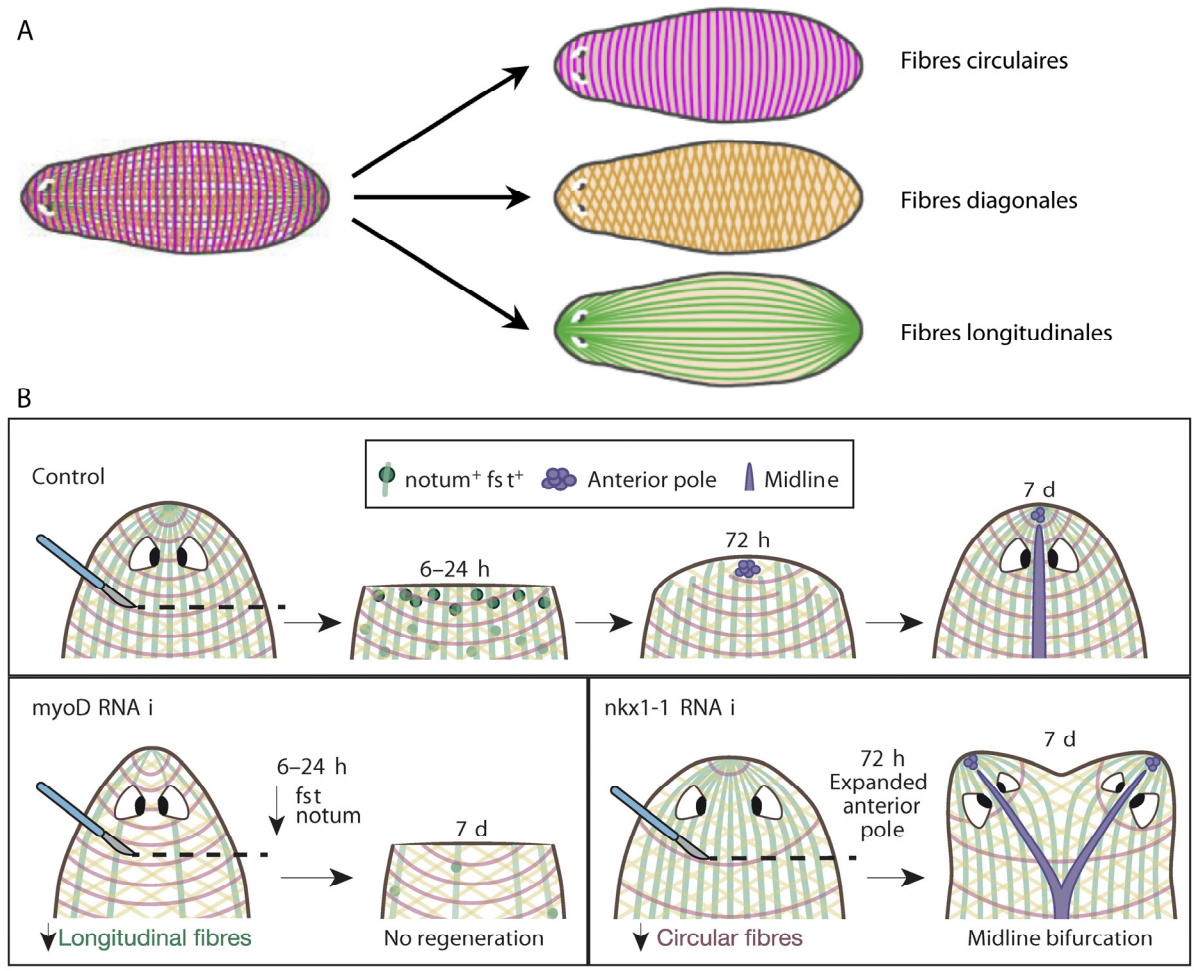


Figure 18 : Rôle des différents types musculaires de la planaire pendant la régénération.
(A) Schéma des différents types musculaires de la planaire.
Adapté de Cutie *et al.* (2017).
(B) Défaut d'initiation de la régénération suite au RNAi *myoD* entrainant la perte d'une partie des fibres longitudinale. Défaut de patterning ML suite au RNAi *nkx1-1* entrainant la perte d'une partie des fibres circulaires.
Adapté de Scimone *et al.* (2017).

polype régénéré, grâce au cytosquelette d'actine. La régénération est influencée directement par la forme du fragment de départ. En effet, un fragment en forme d'anneau ouvert se referme en formant un sphéroïde contenant deux orientations distinctes de fibres d'actine, qui donne naissance à une hydre à deux têtes (Fig.20.A-C). La formation de l'axe peut être influencée par une contrainte mécanique : l'insertion d'un filament de platine dans les fragments en forme d'anneau ouvert diminue le nombre de doubles axes formés (Fig.20.A et D) (Livshits *et al.* 2017). Le sphéroïde formé a tout d'abord les fibres d'actine orientées suivant deux orientations distinctes. Celles-ci se réorganisent ensuite selon une seule orientation, ce qui indique que l'information mécanique donnée par le filament joue un rôle dans la définition et la stabilisation de l'axe du corps via l'organisation du cytosquelette (Fig.20.D). Dans les fibroblastes, la déformation des cellules modifie l'alignement des fibres d'actine (Sears 2016). Chez l'hydre, la réorganisation active du cytosquelette d'actine suite à une contrainte mécanique pourrait renforcer l'alignement des fibres dans la cellule et entre les cellules, et ainsi permettre la formation du réseau de fibres musculaires à l'échelle de l'animal (Livshits *et al.* 2017).

Au cours de la régénération chez la méduse *Clytia*, j'ai pu observer un rôle similaire des fibres musculaires dans le patterning de la méduse en régénération (voir Chapitre 1).

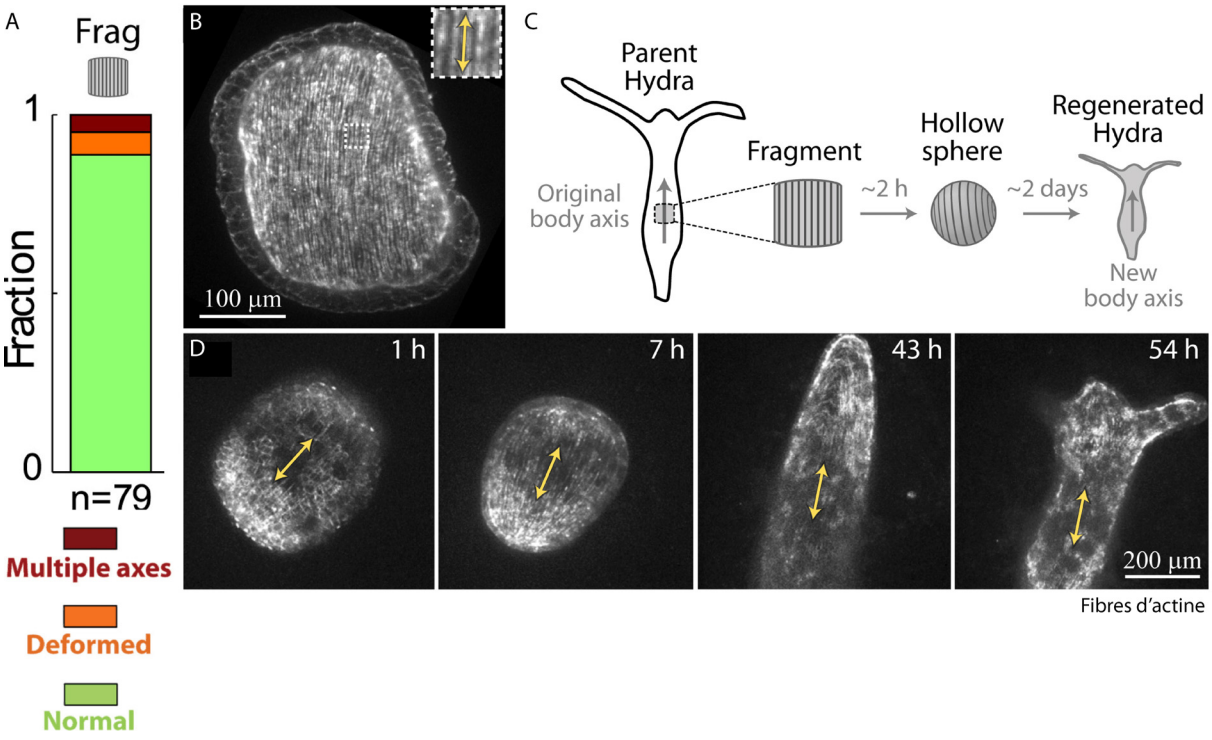


Figure 19 : Organisation du cytosquelette d'actine pendant la régénération à partir d'un fragment chez l'hydre.
(A) Diagramme montrant les proportions d'hydre régénérées normales (un seul axe), déformées ou présentant des axes multiples.
(B) Cytosquelette d'actine visualisé par Phalloïdine-AlexaFluor546 juste après excision du fragment.
(C) Schéma de l'expérience.
(D) Régénération d'une hydre à partir d'un fragment. Cytosquelette d'actine suivi sur une hydre transgénique exprimant *GFP-lifeact* dans l'ectoderme.
Les flèches jaunes indiquent l'alignement des fibres d'actine.
Adapté de Livshits *et al.* (2017).

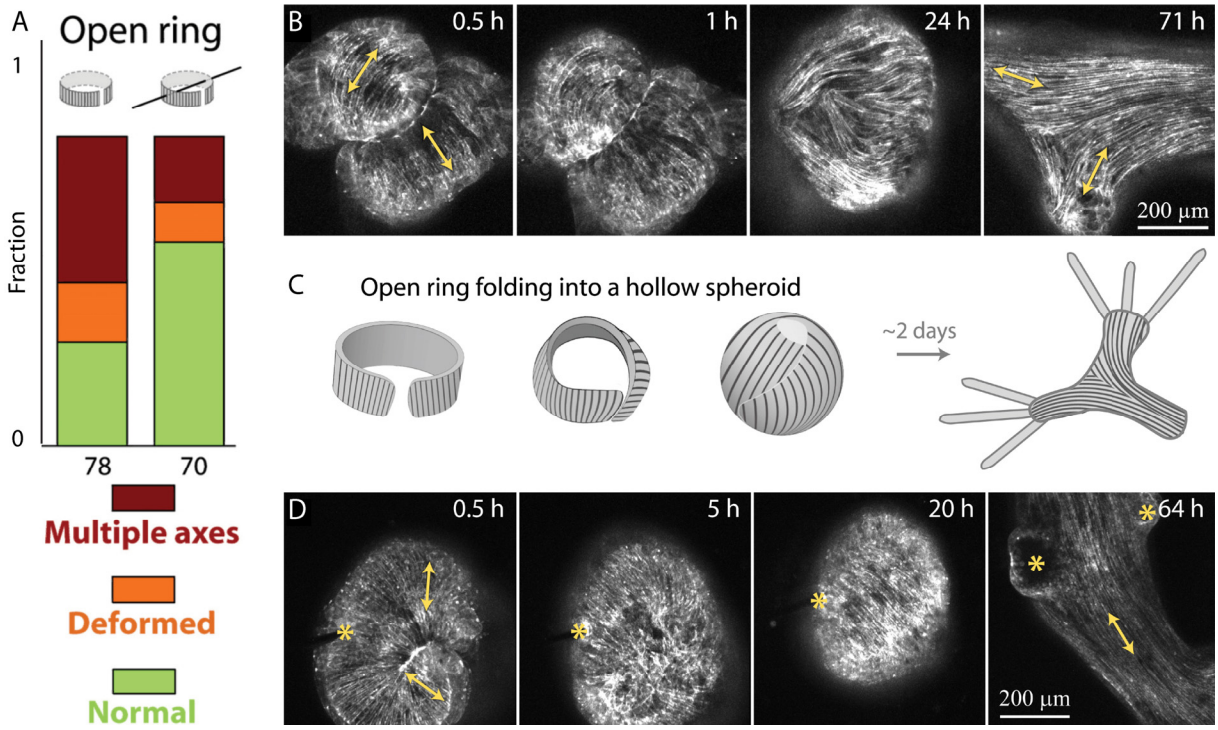


Figure 20 : Manipulation de l'axe primaire de l'hydre régénérée par la forme du fragment et l'ajout d'une contrainte mécanique.
(A) Diagramme montrant les proportions d'hydre régénérées normales (un seul axe), déformées ou présentant des axes multiples sur un fragment 'open ring' ancré par un filament de platine ou non.
(B) Régénération d'un fragment 'open ring'. Les deux orientations des fibres sont visibles et 0,5h après dissection et entrainent la formation d'un double axe.
(C) Schéma de la régénération d'un fragment 'open ring'.
(D) Régénération d'un fragment 'open ring' stabilisé par un filament de platine. Après dissection, les fibres sont orientées selon deux directions. Elles se réorganisent au cours de la régénération, ce qui permet la régénération d'une hydre avec une seule tête.
(B) et (D) Cytosquelette d'actine suivi sur une hydre transgénique exprimant GFP-*lifeact* dans l'ectoderme. Les flèches jaunes indiquent l'alignement des fibres d'actine, les astérisques l'emplacement du filament de platine.
Adapté de Livshits *et al.* (2017).

III. Capacités de régénération des cnidaires

En tant que groupe frère des bilatériens, les cnidaires occupent une position phylogénétique clé pour comprendre l'évolution de ces derniers (Dunn *et al.* 2014). De plus, leurs grandes capacités de régénération, alliées à leur relative simplicité morphologique en font des modèles de choix pour l'étude de la régénération. L'utilisation de différents cnidaires comme modèle d'étude a été accompagnée par la disponibilité croissante de données moléculaires. Le premier génome de cnidaire publié est celui de l'anthozoaire *Nematostella vectensis* (Putnam *et al.* 2007). Depuis 2007, 13 autres génomes de cnidaires de représentants des cinq classes principales (anthozoaires, staurozoaires, hydrozoaires, scyphozoaires et cubozoaires) ont été publiés (Fig.21.A) (*Hydra magnipapillata* (Chapman *et al.* 2010), *Acropora digitifera* (Shinzato *et al.* 2011), *Aipsasia* (Baumgarten *et al.* 2015), *Aurelia Aurita* pacifique (Gold *et al.* 2019), *Clytia hemisphaerica* (Leclère *et al.* 2019), *Aurelia Aurita* atlantique et *Morbaka virulenta* (Khalturin *et al.* 2019), *Nemopilema nomurai* (Kim *et al.* 2018), *Dendronephthya gigantea* (Jeon *et al.* 2019), *Calvadosia cruxmelitensis*, *Alatina alata* et *Cassiopea xamachana* (Ohdera *et al.* 2019) et *Montipora capitata* (Helmkampf *et al.* 2019)) (Fig.21.A) ainsi que trois génomes de cnidaires parasites (Chang *et al.* 2015), et de nombreux transcriptomes ont été générés. Ces données moléculaires montrent que malgré leur apparente simplicité anatomique, les cnidaires possèdent une diversification des facteurs de transcription et des voies de signalisation aussi étendue que les bilatériens (review : (Technau & Schwaiger 2015; Schnitzler 2019)), permettant une comparaison directe de la régénération entre les cnidaires et les bilatériens au niveau moléculaire.

Cette section présente tout d'abord des informations générales sur la classification, les cycles de vie et quelques types cellulaires des cnidaires. Ensuite les capacités de régénération des trois principaux polypes modèles de régénération et celles des méduses seront détaillées.

III.1. Généralités sur les cnidaires

III.1.1. Cycle de vie et classification

Les cnidaires regroupent des invertébrés principalement marins tels que les méduses, les anémones, les coraux mous et durs ainsi que les hydroïdes. 11000 espèces sont actuellement décrites (Appeltans *et al.* 2012). Elles sont extrêmement variées en termes de morphologie, de niche écologique, de développement et de cycle de vie. Leur caractéristique commune est la présence de cnidocystes, les cellules urticantes servant à la prédation et à la défense. Les cnidaires sont diploblastiques, composés de deux feuillets embryonnaires uniquement, l'ectoderme et l'endoderme séparés par la mésoglée, une matrice acellulaire composée de glycoprotéines. Les feuillets sont composés principalement de cellules myoépithéliales, des cellules épithéliales spécialisées avec des extensions basales contractiles (voir section III.1.3 de l'Introduction).

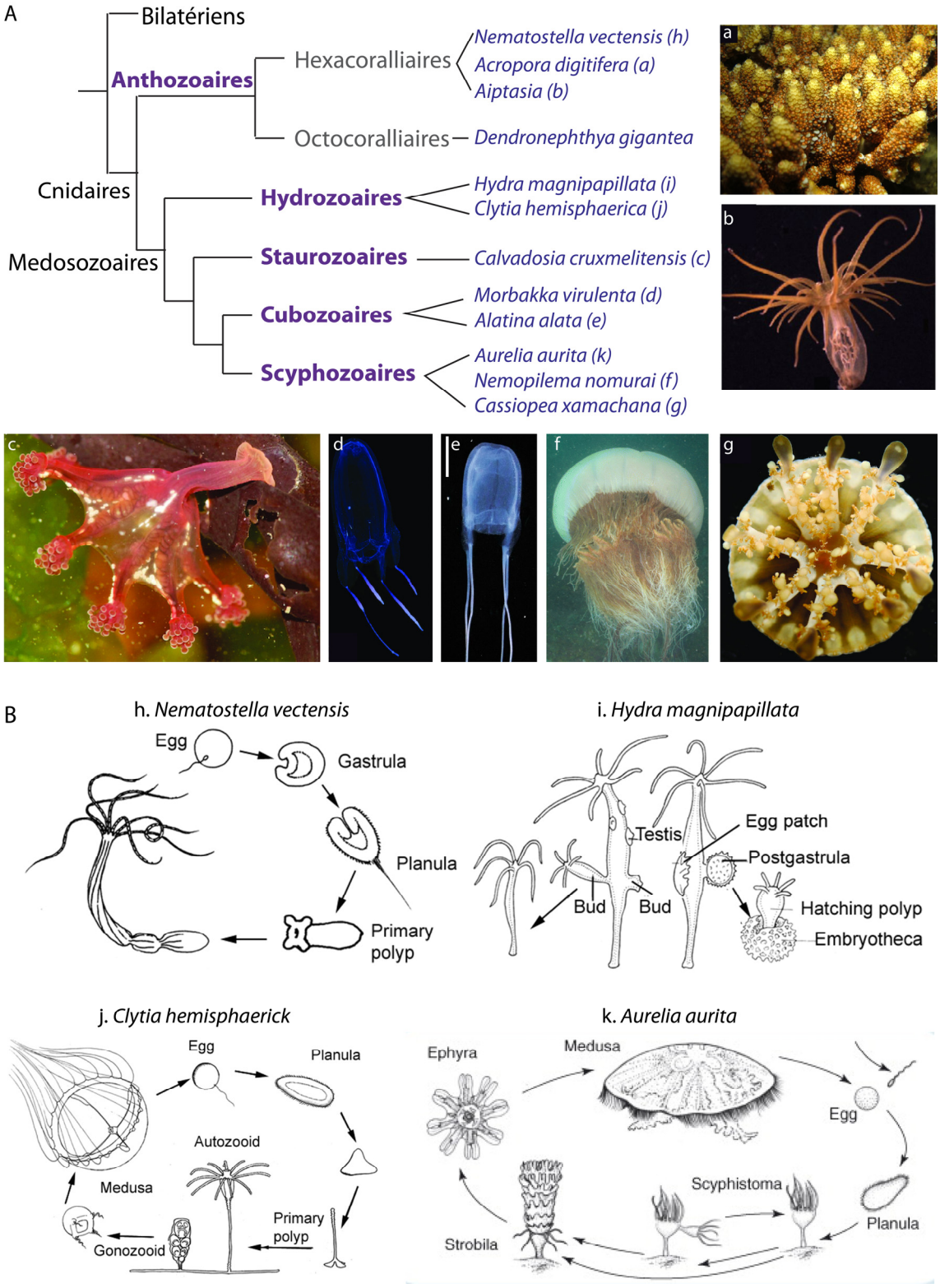


Figure 21 : Phylogénie et cycles de vie de quelques espèces de cnidaires.
(A) Arbre phylogénétique des principales familles de cnidaires. A droite les noms des espèces dont le génome est séquencé, voir le texte pour les références.
Photos tirées de : (a) Rosenberg *et al.* (2017), (b) Baumgarten *et al.* (2015), (e) Khalturin *et al.* (2019), (f) Kim *et al.* (2018), (c), (d) et (g) Ohdera *et al.* (2019).
(B) Cycles de vie de quelques cnidaires. Tiré de : (h), (i) et (j) Technau & Steele (2012), (k) Miller & Ball (2008).

Les cnidaires ont un cycle de vie complexe, alternant chez la plupart des espèces entre une phase larvaire ciliée appelée planula et une ou deux formes adultes : le polype benthique colonial ou solitaire, et la méduse pélagique caractérisée par sa forme en cloche permettant la nage (Fig.21.B). Il existe beaucoup de variations dans les cycles de vies, certaines phases pouvant être absentes ou des caractéristiques des différentes phases pouvant être combinées dans un même stade. En tant que groupe frère des bilatériens, les cnidaires sont considérés comme ayant une symétrie radiaire, ce qui est bien le cas pour la plupart des méduses. Cependant certains polypes anthozoaires ainsi que certains hydrozoaires ont une symétrie bilatérale (Manuel 2009).

Les cnidaires sont subdivisés en deux groupes : les anthozoaires, possédant uniquement les phases polype et planula ; et les médusozoaires caractérisés par la présence dans leur cycle de vie de la méduse comme forme de dispersion des gamètes. Les médusozoaires sont divisés en quatre classes, les hydrozoaires, les scyphozoaires, les cubozoaires et les staurozoaires (Fig.21.A). Les principaux groupes de cnidaires étaient déjà présents pendant le cambrien, indiquant une divergence très ancienne de ces derniers. Cartwright *et al.* (2007) reporte la découverte de fossiles de méduses datant du milieu du cambrien (500 Ma) dans la formation de Marjum à Utah. Leur bon état de conservation permet de les identifier comme des représentants des classes hydrozoaire, scyphozoaire et cubozoaire. Le plus vieux fossile cnidaire date de 570 Ma (Xiao *et al.* 2002).

Les anthozoaires et médusozoaires sont des groupes frères (Zapata *et al.* 2015; Kayal *et al.* 2018). Ceci est supporté par des analyses phylogénétiques de données moléculaires (Bridge *et al.* 1995; Collins *et al.* 2006; Kayal *et al.* 2013) et morphologiques (Bridge *et al.* 1995; Marques & Collins 2005). Au sein des médusozoaires, les staurozoaires-cubozoaires-scyphozoaires forment un clade (Zapata *et al.* 2015; Kayal *et al.* 2018). La méduse a, pendant un temps, été considérée comme le stade ancestral des cnidaires, qui aurait été perdu chez les anthozoaires (ex (Hyman 1940)), ce qui suppose une acquisition plus tardive du stade polype, et donc une évolution des anthozoaires à partir des hydrozoaires. Cette hypothèse est infirmée par les données récentes de phylogénie. D'après Kayal *et al.* (2018), le cnidaire ancestral est un polype solitaire sans méduse ni endosymbionte photosynthetique.

Les anthozoaires regroupent 7500 espèces (Daly *et al.* 2007). Leur cycle de vie alterne entre la larve planula et le polype assurant à la fois la reproduction sexuée et asexuée (Fig.21.B). Les polypes peuvent vivre isolés ou en colonies clonales. Les synapomorphies des anthozoaires sont l'actinopharynx (un tube recouvert d'ectoderme allant de la bouche jusqu'à la cavité gastrique), le siphonoglyph (une région glandulaire cillié de l'actinopharynx), et les mésentères (des structures digestives et reproductrices du pharynx cloisonnant la cavité gastrodermique) (Daly *et al.* 2007).
Ils sont regroupés en deux groupes principaux:

- Les hexacoralliaires : divisés en six ordres dont les actinaires (anémones) et les sclératinaires (les coraux durs). La morphologie des polypes ainsi que leur organisation en colonies ou non est très diverse. Le groupe regroupe des espèces coloniales ou

solitaires avec une symétrie principalement radiaire d'ordre six. Les cellules urticantes des hexacoralliaires sont les spirocycts (Mariscal *et al.* 1976).

- Les octocoralliaires : composés d'une grande majorité d'espèces coloniales. Leur symétrie est considérée comme radiaire d'ordre huit, visible au nombre de tentacules et de mésentères. Deux structures sont bilatérales : le pharynx aplati avec un unique sillon cilié, ainsi que les huit mésentères qui sont disposés par paires ayant des fonctions identiques selon une symétrie bilatérale et leurs muscles rétracteurs ont une disposition bilatérale (Manuel 2009).

Les médusozoaires regroupent des espèces ayant des cycles de vie très variés, caractérisés par la présence des deux phases adultes polype et méduse. Cependant certaines espèces ont perdu au cours de l'évolution le stade polype, méduse et/ou planula (Collins 2002; Collins *et al.* 2006). Par exemple l'hydre d'eau douce a perdu les stades méduse et planula. Ils sont caractérisés par un génome mitochondrial linéaire (Bridge *et al.* 1992), et la présence d'un opercule à l'apex des nématocytes (Reft & Daly 2012). Des transcriptomes réalisés chez plusieurs espèces à différents stades du cycle de vie révèlent que l'apparition du stade méduse chez les médusozoaires n'est pas associée à la présence de nouveaux gènes spécifiques des cnidaires. La transition du stade polype au stade méduse est assurée par l'utilisation de gènes conservés et nouveaux ((*Aurelia aurita* pacifique (Gold *et al.* 2019), *Aurelia aurita* atlantique et *Morbaka virulenta* (Khalturin *et al.* 2019), *Clytia hemisphaerica* (Leclère *et al.* 2019)).

Les médusozoaires sont composés de 3700 espèces. Ils sont divisés en quatre classes :

- Les hydrozoaires (hydroïdes, hydroméduses et siphonophores, 3500 espèces (Appeltans *et al.* 2012)) : ayant pour cycle de vie typique une alternance des phases planula, polype et méduse (Fig.21.B). Ce cycle de vie triphasique est modifié chez de nombreuses espèces avec la perte de la phase méduse par exemple, ou chez les siphonophores la formation de colonies nageant grâce aux nectophores (médosoïdes ayant perdu la bouche, les tentacules et les organes des sens (Brusca 2016)). Les polypes sont souvent coloniaux et polymorphiques. La méduse, si présente, est formée par bourgeonnement latéral du polype.

- Les scyphozoaires (vraies méduses, 200 espèces (Appeltans *et al.* 2012)) : regroupant des espèces exclusivement marines. Les polypes sont individuels et appelés scyphostomes. Le cycle de vie est triphasique (Fig.21.B), la méduse est produite par strobilation polydisque ou monodisque (ex : *Cassiopea*) du polype. Chez *Aurelia aurita*, le scyphostome est segmenté en une pile de disques sur toute sa longueur à partir de l'extrémité orale. Chaque disque forme une éphyrule (méduse juvénile) avec huit bras, chacun portant un organe des sens, la rhopalie, et une bouche orientée vers l'extrémité orale du polype. L'éphyrule commence à se contracter avant détachement du polype (Kraus *et al.* 2015).

- Les cubozoaires (méduses boite, 37 espèces (Appeltans *et al.* 2012)) : caractérisées par leur polype simplifié et des organes sensoriels complexes, dont des yeux camérulaires, regroupés dans quatre rhopalies. Comme chez les scyphozoaires et les hydrozoaires, le

cycle de vie est triphasique, la méduse est produite dans la plupart des cas par métamorphose complète du polype en une seule méduse (Brusca 2016). Chez *Carybdea marsupialis*, la méduse peut être produite par deux types de métamorphose : soit la métamorphose complète du polype solitaire en méduse, soit plus rarement la métamorphose uniquement de la partie apicale du polype. Dans ce cas, le fragment basal du polype régénère le polype en entier, ce qui est similaire à la strobilation monodisque des scyphozoaires (Straehler-Pohl & Jarms 2005).

- Les staurozoaires (48 espèces (Appeltans *et al.* 2012)) : regroupant des méduses benthiques attachées au substrat par une ventouse. Les méduses ont huit 'bras' portant les tentacules. Le cycle de vie ne présente pas l'alternance polype-méduse. La larve planula n'est pas ciliée, contrairement aux autres cnidaires, et se déplace en rampant.

III.1.2. Cellules souches des cnidaires

Les cellules souches de cnidaires sont encore mal connues. A l'heure actuelle, seules les cellules souches interstitielles (i-cells), qui sont les cellules souches multipotentes des hydrozoaires ont été bien caractérisées. Elles ont été observées pour la première fois chez *Hydractinia echinata* et *Coryne pusilla* par Auguste Weismann (Weismann 1883), un biologiste allemand fondateur de la théorie de la continuité du plasma germinal, postulant la transmission des caractères héréditaires entre les générations (Weismann 1892). Elles ont ensuite été particulièrement bien décrites chez l'Hydre (review : (Bode 1996; Watanabe *et al.* 2009; Bosch *et al.* 2010)).

I-cells des hydrozoaires

Les i-cells sont des petites cellules rondes, ayant un gros rapport nucléo-cytoplasmique, localisées dans les espaces entre les cellules épithéliales. Celles-ci sont multipotentes (Bosch & David 1987), capables de donner naissance à la fois à la lignée germinale (Nishimiya-Fujisawa & Kobayashi 2012) ainsi qu'à des dérivés somatiques (Fig.22) : les neurones (Davis 1974), les nématocytes (Slautterback & Fawcett 1959) et les cellules glandulaires (Bode *et al.* 1987). Les cellules nerveuses et nématocytes représentent 70% des dérivés des i-cells chez l'hydre (David & Gierer 1974). Chez l'hydre, les i-cells indifférenciées se situent dans l'ectoderme de la région gastrique, qui est la région en prolifération (David & Plotnick 1980; Khalturin *et al.* 2007), tandis que les dérivés sont surtout localisés aux extrémités. Les i-cells indifférenciées représentent 4% du nombre total de cellules chez l'hydre (Watanabe *et al.* 2009). Les marqueurs de lignée germinale *Nanos1*, *Piwi*, *Vasa* et *PL10* sont exprimés dans les i-cells et les cellules germinales, permettant de les localiser par ISH. Les i-cells ont été décrites chez d'autres hydrozoaires : *Pennaria tiarella* (Martin & Thomas 1981), *Clytia hemisphaerica* (Denker *et al.* 2008; Houliston *et al.* 2010; Leclère *et al.* 2012), *Hydractinia echinata* et *symbiolongicarpus* (Müller *et al.* 2004; Künzel *et al.* 2010) et *Podocoryne carnea* (Seipel *et al.* 2004a; Torras *et al.* 2004).

Il a été montré par élimination des i-cells et de leurs dérivés par un traitement à la colchicine que ces dernières ne sont pas indispensables à la survie, à la croissance, au renouvellement des tissus ectodermiques et endodermiques, ou à la reproduction par bourgeonnement de l'hydre

(Marcum & Campbell 1978). Ceci peut être expliqué par le fait que les cellules épithéliales ectodermiques et endodermiques jouent aussi le rôle de cellules souches (Bosch *et al.* 2010; Hobmayer *et al.* 2012). Ces dernières sont des cellules myoépithéliales contenant une vacuole et une extension basale composée de fibres contractiles. Le cycle cellulaire des cellules épithéliales est de trois à quatre jours (David & Campbell 1972). Comme les i-cells, elles se divisent dans la région gastrique du polype et se différencient au niveau de l'hypostome, des tentacules et du pied (David & Plotnick 1980; Hobmayer *et al.* 2012). Comme les cellules souches ectodermiques et endodermiques sont des cellules épithéliales en division, tous les auteurs ne sont pas d'accord sur leur identité de cellules souches :

> 'The epithelial lineages do not have a true stem cell population, but they are mitotic along the entire length of the body column and these progenitor/stem cells are responsible for maintaining the lineage.' (Juliano *et al.* 2014)

Les trois lignées de cellules issues des cellules souches épithéliales et des i-cells sont indépendantes. Ceci a été confirmé par les données récentes de séquençage de cellule unique (Siebert *et al.* 2018). En revanche, chez le polype colonial *Hydractinia*, les i-cells donnent aussi naissance aux cellules épithéliales qui, contrairement à celles de l'hydre, prolifèrent très peu (Müller *et al.* 2004; Gahan *et al.* 2016). Chez *Hydractinia*, 95% des cellules en prolifération sont des i-cells (Bradshaw *et al.* 2015).

Autres systèmes de cellules souches

Les cellules souches des autres ordres de cnidaires ne sont pas connues. Les deux cnidaires non hydrozoaires les plus étudiés, *Nematostella* et *Aurelia*, n'ont pas d'i-cells (Steinberg 1963; Nakanishi *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2008; Marlow *et al.* 2009). Des cellules ayant la morphologie d'i-cells ont été observées chez quelques non-hydrozoaires comme la larve du scyphozoaire *Cassiopeia* (Martin & Chia 1982), et les anthozoaires *Metridium* (Westfall 1966), *Aiptasia* (Singer 1971), *Acropora millepora* (Reyes-Bermudez & Miller 2009), mais leur potentiel de différentiation n'a pas été étudié.

Chez les anthozoaires, le rôle de cellules souches est potentiellement assuré par les amœbocytes, qui sont des cellules indifférenciées ayant un rôle connu dans l'inflammation et l'immunité. Les amœbocytes peuvent adopter différentes morphologies, présentant parfois des filopodes, et souvent des granules. Les amœbocytes sont présents dans les épithéliums et la mésoglée à tous les stades de vie (*Nematostella vectensis* (Tucker *et al.* 2011)). Ils sont visibles dans les tissus en cas de blessure, de régénération, de stress ou de présence de pathogène ((Gold & Jacobs 2013), *Montastraea* (Vargas-Ángel *et al.* 2007), *Gorgonia* (Mydlarz *et al.* 2008)) et peuvent réaliser de la phagocytose (*Swiftia* (Olano & Bigger 2000), *Anthopleura* (Patterson & Landolt 1979)). Il n'y a pour l'instant aucune preuve que les amœbocytes puissent donner naissance à des types cellulaires différenciés.

Les amœbocytes ont également été décrits chez *Aurelia aurita* à la marge de l'ombrelle (Chapman 1999) et dans le contexte de la régénération du polype à partir d'un fragment de l'ectoderme de la larve (Steinberg 1963). Dans ce dernier cas, une population de cellules ayant

les caractéristiques des amœbocytes est formée à partir des cellules ectodermiques, et donne naissance aux cellules endodermiques. Chez les méduses scyphozoaires, une population de cellules indifférenciées, potentiellement impliquées dans turnover et régénération, a été décrite dans les rhopalies (*Tripedalia* (Skogh *et al.* 2006), *Tripedalia Alatina*, (Gurska & Garm 2014)).

En l'absence d'i-cells chez les anthozoaires et les scyphozoaires, les cellules nerveuses se différencient à partir de cellules épithéliales. Chez *Aurelia aurita*, le système nerveux est issu de l'ectoderme (Nakanishi *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2008), chez *Nematostella*, les cellules nerveuses sont dérivées de progéniteurs épithéliaux ectodermiques et endodermiques (Nakanishi *et al.* 2012; Rentzsch *et al.* 2017). Chez *Nematostella*, les cellules nerveuses et les nématocytes dérivent d'un même précurseur exprimant *SoxB(2)* (Richards & Rentzsch 2014), un orthologue du FT *SoxB*, régulateur de la neurogenèse chez les bilatériens (Kiefer 2007). Chez certains hydrozoaires aussi, des cellules sensorielles ectodermiques sont issues de l'ectoderme et non pas des i-cells (*Pennaria tiarella* et *Phialidium geagarium* (Martin & Thomas 1981; Thomas *et al.* 1987). En revanche chez l'hydre les i-cells forment bien tous les neurones (Davis 1974).

III.1.3 Deux types de cellules caractéristiques des cnidaires : les nématocytes et les cellules myoépithéliales

Les nématocytes

Les nématocytes sont les cellules urticantes des cnidaires servant principalement à la capture des proies et à la défense. Elles contiennent un nématocyste, un organite composé d'un harpon relié par un tubule à une capsule remplie de venin. Ce dernier est maintenu replié sous pression dans la capsule, composée de molécules de collagènes reliées par des ponts disulfure (appelées mini-collagènes) (Kurz *et al.* 1991) et d'une matrice de poly-ɣ-glutamate. L'expulsion du harpon est déclenchée par le contact d'une proie avec le cnidocil. Ce mouvement est l'un des plus rapides du monde animal (Holstein & Tardent 1984). Les nématocytes sont principalement localisés sur les tentacules, mais peuvent également être présent sur le manubrium de la méduse ou la bouche du polype.

.

La nématogenèse a été décrite chez l'hydre. Tout d'abord, les précurseurs, appelés nématoblastes, se divisent de façon synchrone dans la zone centrale du polype, donnant naissance à des clusters de 4 à 32 cellules (David & Gierer 1974). Ensuite, la différenciation commence par la formation de la capsule dérivée de l'appareil de golgi (Slautterback & Fawcett 1959). Celle-ci est d'abord de petite taille puis grandit jusqu'à remplir presque entièrement la cellule (Fig.23). Le tubule se forme alors par extension de la paroi de la capsule et s'invagine dans la capsule (Holstein 1981). Pendant la maturation de la capsule, le tubule se différencie en un harpon et le cnidocil se forme. La maturation est finie après la synthèse de poly-ɣ-glutamate dans la cavité interne de la capsule, générant la pression interne nécessaire à la décharge des nématocystes (Szczepanek *et al.* 2002). Une fois la capsule mature, les cellules du cluster se dispersent et migrent vers les tentacules (Campbell 1974).

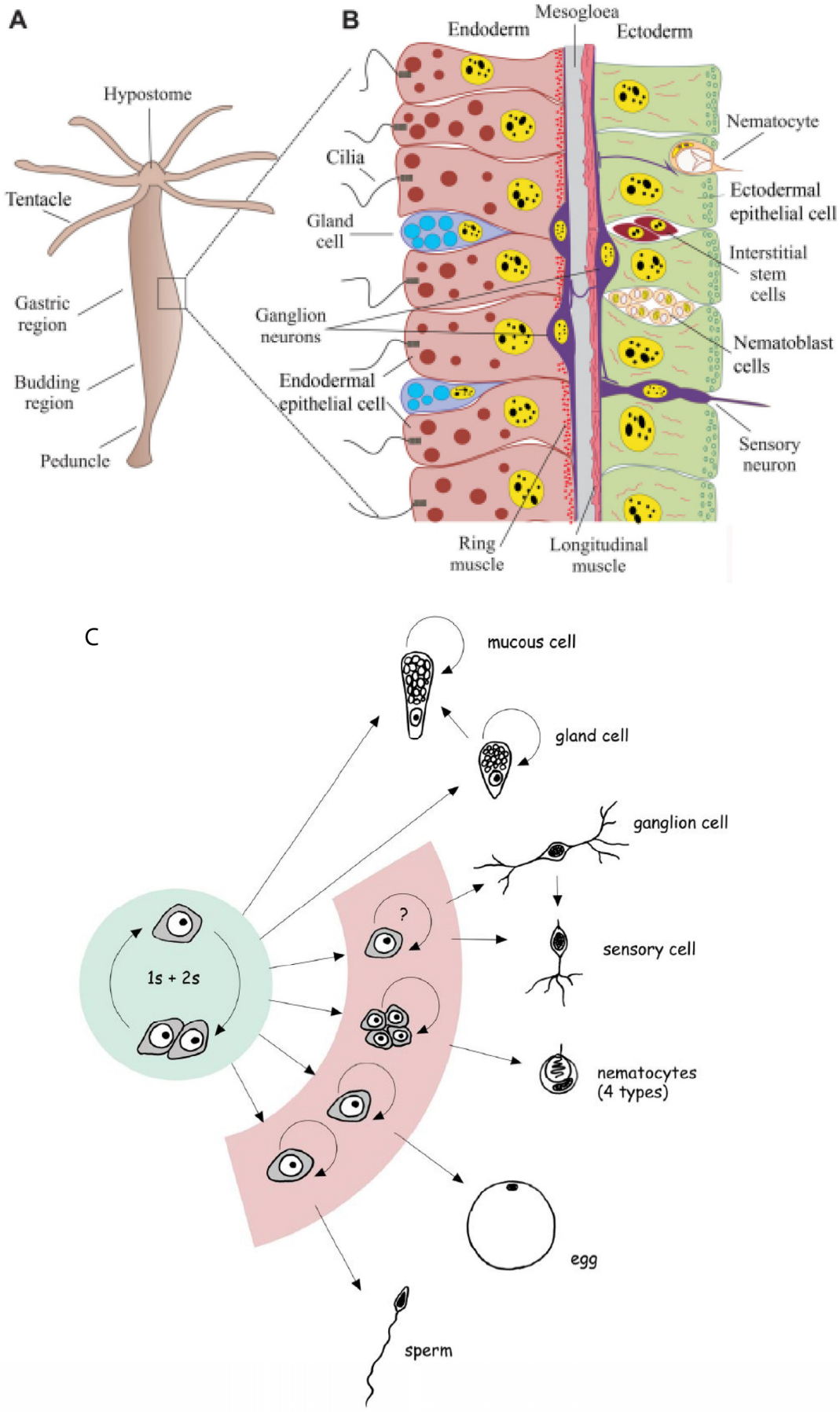


Figure 22 : Cellules souches interstitielles chez l'hydre.

Figure 22 : Cellules souches interstitielles chez l'hydre (légende).
(A) Morphologie de l'hydre.
(B) Détail des deux épithéliums séparés par la mésoglée. Les cellules ectodermiques sont en vert, les cellules endodermiques en rouge. Les autres cellules sont les dérivés des i-cells.
Tiré de Technau & Steele (2012).
(C) Prolifération et différenciation des i-cells. Les i-cells sont en vert, les progéniteurs intermédiaires et rouge.
Tiré de Hobmayer *et al.* (2012).

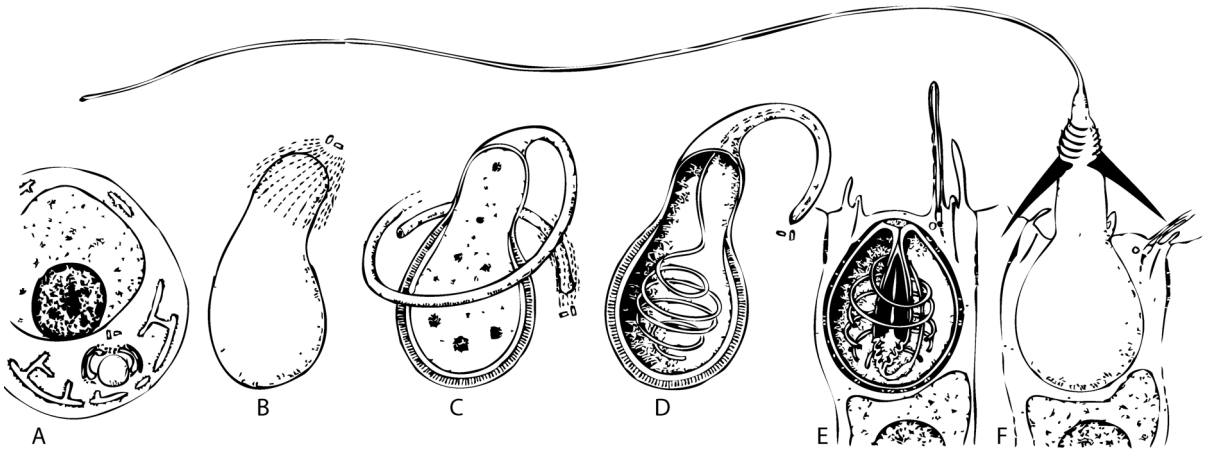


Figure 23 : Etapes de la nématogenèse chez l'hydre.
(A) Nématoblaste précoce.
(B) et (C) Formation du tubule du nématocyste.
(D) Invagination du tubule dans la capsule du nématocyste
(E) Nématocyte mature avant décharge.
(F) Nématocyte mature après décharge.
Représentation du nématocyste entouré des composants cellulaires (A), (E), et (F).
Adapté de Holstein (1981).

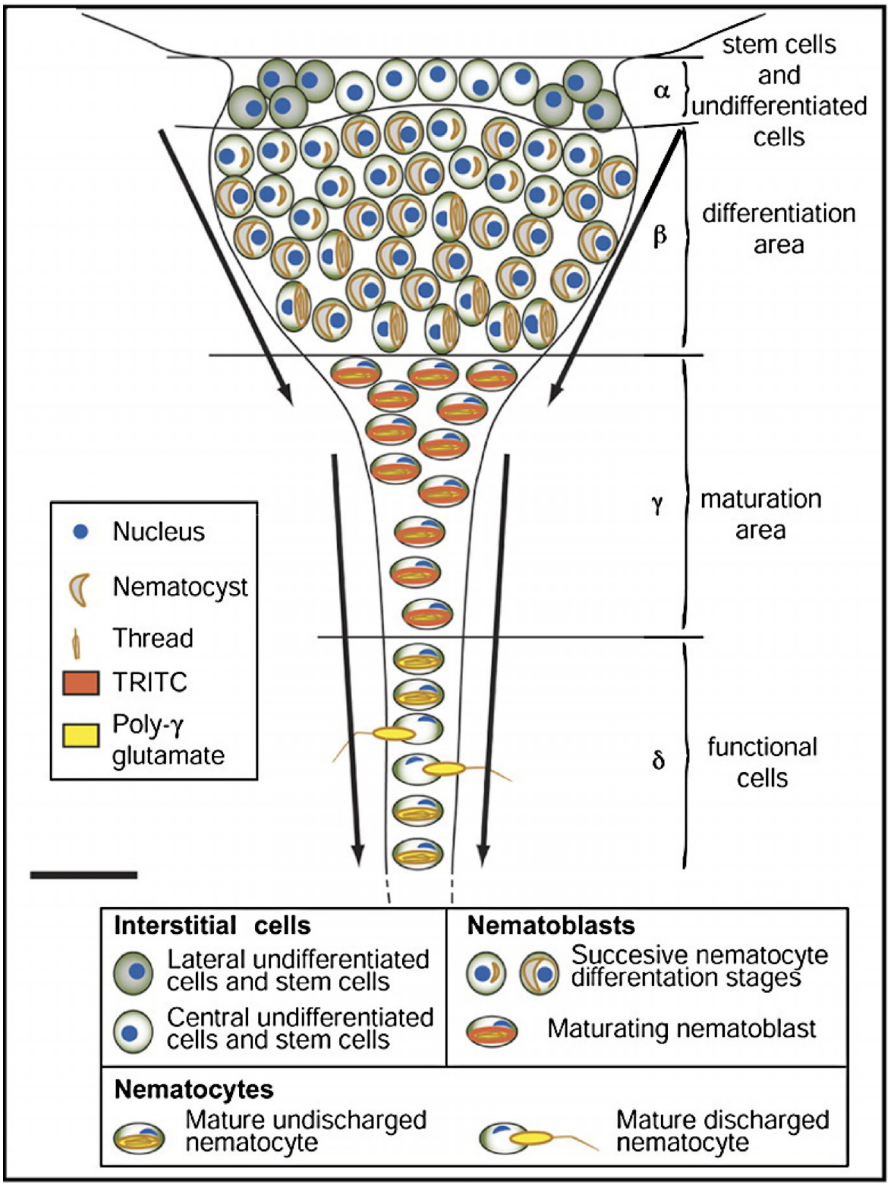


Figure 24 : Nematogénèse dans les bulbes tentaculaires de *Clytia hemisphaerica.*
Tiré de Denker *et al.* (2008)

Chez la méduse *Clytia*, la nématogenèse a été caractérisée dans les bulbes tentaculaires (Denker *et al.* 2008). Elle a lieu dans l'ectoderme nématogénique qui est polarisé. En effet, au cours de la différenciation, les nématoblastes sont déplacés de la zone proximale du bulbe vers le tentacule. Le bulbe et le tentacule ont été divisés en quatre zones correspondant aux stades successifs de la nématogenèse : la zone proximale α contenant les cellules souches et indifférenciées, la zone β avec les cellules en cours de différenciation, la zone ɣ comprenant la partie distale du bulbe et le début du tentacule étant la zone de maturation, et la zone δ avec des cellules fonctionnelles (Fig.24) (Denker *et al.* 2008). Les nématocytes sont principalement localisés dans les tentacules. Des capsules de nématocystes sont également visibles sur la surface du manubrium, surtout concentrées à l'extrémité orale.

Cellules myoépithéliales :

Le type cellulaire principal composant l'épithélium ectodermique et endodermique des cnidaires sont les cellules myoépithéliales (West 1978). Il s'agit de cellules épithéliales spécialisées contenant des myofilaments à l'extrémité basale (Fig.25). Elles ont été étudiées chez l'hydre. L'ectoderme de l'extrémité basale contient deux prolongements appelés myonèmes, orientés le long de l'axe oral aboral (David 1973). Ceux-ci sont en contact avec les prolongements des cellules voisines formant un réseau supracellulaire de fibres musculaires lisses à travers tout le corps (Kass-Simon 1976; West 1978; Seybold *et al.* 2016). Elles sont connectées par des jonctions intercellulaires gap et 'septate' (West 1978).

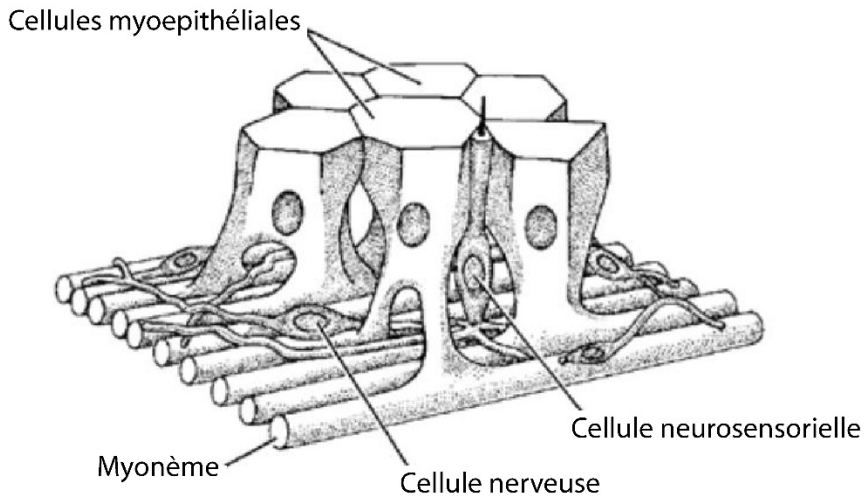


Figure 25 : Cellules épithéliomusculaires.
Adapté de Brusca (2016).

Les muscles lisses ont différentes fonctions chez les polypes comme la contraction ou l'extension des tentacules, les mouvements péristaltiques permettant la circulation des fluides dans le corps et la locomotion (ex. actinaires qui rampent ou s'enfouissent) (review : (Leclère & Röttinger 2017)). Chez les méduses les cellules épitheliomusculaires formant les muscles lisses sont présentes dans l'ectoderme des tentacules, l'ectoderme des organes, la couche externe du vélum, et dans la sous-ombrelle. Leur fonction est, entre autres, la capture des proies.

Les cellules myoépithéliales composent aussi les muscles striés des méduses permettant les contractions de l'ombrelle pour la nage et donc la propulsion dans la colonne d'eau. Le myofilament strié est localisé à la base de la cellule. Chez les hydrozoaires, les cellules musculaires striées sont reliées entre elles par des jonctions gap, assurant leur couplage électrique et la continuité du muscle strié (Satterlie 2008).

Les cellules myoépithéliales sont multifonctionnelles, ce qui serait une de leurs caractéristiques ancestrales (Arendt 2008). Par exemple chez l'hydre, les cellules endodermiques de la cavité gastrique participent à l'absorption des nutriments (Buzgariu *et al.* 2015), tandis que celles de l'ectoderme du pied produisent des vésicules responsables de l'attachement au substrat. Les cellules épithéliales expriment même des gènes spécifiques de la neurotransmission et la neurogenèse dans les souches d'hydre dépourvues de cellules nerveuses (Wenger *et al.* 2016). Chez les anthozoaires, les cellules endodermiques contiennent les symbiontes dinoflagellés et assurent la digestion intracellulaire (Hyman 1940).

III.2. Capacités de régénération des polypes

La plupart des connaissances sur la régénération chez les cnidaires sont issues d'études sur la régénération de la partie orale chez trois polypes : *Hydra vulgaris, Hydractinia echinata* et *Nematostella vectensi*s. La section suivante résume l'état actuel des connaissances sur ces trois modèles.

Les polypes des cnidaires ont une morphologie similaire. Ils ont un corps cylindrique diploblastique (Fig.12). Les deux couches de cellules épithéliales, ectodermiques et gastrodermiques, composées en grande partie de cellules myoepithéliales forment respectivement l'épiderme et le gastroderme, et sont séparées par une fine couche de matrice extracellulaire appelée mésoglée. Le polype est polarisé selon l'axe primaire oral-aboral. A l'extrémité orale se trouve la bouche entourée par une couronne de tentacule. L'extrémité aborale est utilisée pour se fixer au substrat, ou est reliée au reste de la colonie selon le mode de vie solitaire ou colonial (Brusca 2016). Des muscles lisses présents tout le long du corps permettent les mouvements. Le système nerveux est diffus, avec une condensation des neurones autour de l'hypostome, par exemple de l'hydre (Koizumi *et al.* 1992) ayant pour rôle le mouvement simultané des tentacules (Koizumi 2007).

III.2.1. L'Hydre : le tout premier modèle de biologie expérimentale

Hydra vulgaris est un hydrozoaire atypique. Il s'agit d'un polype d'eau douce avec un cycle de vie très simplifié, ayant perdu à la fois la phase méduse et la phase planula. L'embryon se développe directement en un adulte solitaire, sans passage par le stade larvaire (Martin *et al.* 1997). Après fécondation et une série de clivages, la gastrulation a lieu par ingression. Elle est finie 8 à 12h après fécondation, la gastrula est alors composée d'une couche ectodermique épithéliale et de cellules sphériques désorganisées dans le blastocœle (Martin *et al.* 1997). L'ectoderme de la gastrula sécrète une cuticule, dans lequel l'embryon peut rester plusieurs semaines. Avant éclosion, les cellules du blastocœle s'organisent en une couche endodermique,

les cellules interstitielles se différencient, la tête et le pied se forment (Martin *et al.* 1997). L'hydre adulte se propage principalement de façon asexuée, par bourgeonnement. Au niveau du tiers inférieur de l'hydre, appelé zone de bourgeonnement, l'épithélium s'évagine puis un bourgeon grandit perpendiculairement à l'axe de l'hydre parent, en recrutant des cellules de celui-ci, et par division cellulaire dans le bourgeon. Une fois la tête et le pied formé, la nouvelle hydre se détache et grandit (Otto & Campbell 1977a).

L'hydre a un corps cylindrique, avec au côté oral l'hypostome portant la bouche, entourée de tentacules, et au côté aboral un disque basal permettant l'attachement au substrat (Brusca 2016). L'hydre est composée de trois populations de cellules, indépendantes les unes des autres : les cellules épithéliales ectodermiques et endodermiques, et les i-cells et leurs dérivés (voir section III.1.2 de l'Introduction). Malgré la séparation des cellules en trois lignées distinctes, les cellules épithéliales sont très plastiques et peuvent adopter des caractéristiques neurales suite à l'élimination des i-cells par traitement pharmacologique. En effet, l'élimination des i-cells entraine également la disparition des cellules nerveuses, qui ne peuvent plus être renouvelées. Les animaux ne sont plus capables d'attraper des proies mais survivent et se reproduisent. Les cellules épithéliales se mettent alors à exprimer des gènes impliqués dans la neurogenèse et la neurotransmission, qu'elles n'expriment pas si les i-cells sont présentes (Wenger *et al.* 2016). Pour chacune des trois populations, les cellules souches sont en prolifération dans la zone centrale du corps (David & Plotnick 1980) et sont ensuite déplacées vers les extrémités apicale et basale où elles se différencient (Campbell 1974). Ceci implique que les cellules épithéliales reçoivent constamment différentes informations de position, et sont capables d'adapter leur morphologie en fonction de leur position. Au niveau du disque basal et des tentacules, les cellules ectodermiques se différencient respectivement en cellules à mucus et cellules supportant la différenciation des nématocytes appelées 'battery cells' (Shostak & Globus 1966; Campbell 1967). Ce changement n'est pas associé à la division cellulaire (Gold & Jacobs 2013). Les cellules endodermiques se différentient également pendant leur déplacement en cellules digestives, cellules épithéliales de la tête, du pédoncule et du disque basal (Bode *et al.* 1987).

Les cellules souches épithéliales ont un cycle cellulaire de trois à quatre jours (David & Campbell 1972), les i-cells entre 16 et 30h (David & Campbell 1974). La région centrale de l'hydre est composée majoritairement de cellules en division, et les extrémités de cellules différenciées. Les cellules en excès sont expulsées aux extrémités, ce qui permet à l'hydre de conserver une taille constante (Campbell 1967; Bosch *et al.* 2010). Comme les cellules sont remplacées en continu, les polypes d'hydre sont considérés comme immortels. Des polypes observés pendant quatre ans au laboratoire montrent peu de signes de sénescence, peu de mortalité et aucun déclin du taux de reproduction (Martínez 1998).

L'hydre est actuellement très utilisée comme modèle cnidaire de biologie cellulaire, pour étudier des problématiques diverses telles que la régénération (Bode 2003), l'induction par un organisateur (review : (Bode 2012)), les cellules souches multipotentes (review : (Bosch *et al.* 2010)), l'apoptose (review : (Reiter *et al.* 2012)), les nématocytes (Balasubramanian *et al.* 2012), la symbiose (review : (Bosch 2012)), le vieillissement (Bellantuono *et al.* 2015), la structure de la mésoglée (review : (Sarras 2012)), le système immunitaire (review : (Bosch

2014)) ainsi que le système nerveux (Miljkovic-Licina *et al.* 2004). Les avantages de l'hydre comme modèle d'étude sont entre autres sa structure simple, sa petite taille et sa transparence. L'hydre a peu de types cellulaires, qui sont maintenant bien caractérisés. Le génome est disponible (Chapman *et al.* 2010), et des données de séquençage de cellule unique ont été publiées récemment (Siebert *et al.* 2018). De nombreuses lignées mutantes sont disponibles, permettant des études fonctionnelles et le suivi de certains composants in vivo (expression *d'eGFP* dans les cellules souches (Wittlieb *et al.* 2006), *GFP* exprimée sous le contrôle du promoteur de la β-caténine (Iachetta *et al.* 2018), souche sf-1 permettant l'élimination des i-cells par un choc thermique (Terada *et al.* 1988)).

L'hydre a des capacités de régénération énormes, connues depuis 275 ans. Elle a d'ailleurs été nommée en référence à l'Hydre de l'Erne de la mythologie grecque. En 1744, la première étude de ses capacités de régénération par Trembley avait pour but de déterminer s'il s'agit d'une plante ou d'un animal, la régénération étant associée au règne végétal. Le doute venait de sa couleur verte causée par la symbiose avec des algues, de sa forme et de son apparente absence de mouvements. Après avoir coupé un polype en deux parties, Trembley a pu constater que chaque partie régénère une hydre en entier. Cependant il remarque également les mouvements autonomes de l'hydre, notamment dans la capture des proies, et en conclut qu'il s'agit bien d'un animal, ayant des capacités de régénération. En plus de la régénération de ses moitiés orale et aborale après décapitation, l'hydre peut régénérer un polype entier à partir d'un fragment (Holstein *et al.* 2003; Bosch 2007). L'hydre peut même régénérer un polype à partir d'un agrégat de cellules dissociées (Gierer *et al.* 1972).

L'hydre est connue pour sa capacité à régénérer la partie orale même en l'absence de cellules souches (Hicklin & Wolpert 1973; Marcum & Campbell 1978), ou quand la prolifération est bloquée par des traitements pharmacologiques (Clarkson 1969; Cummings & Bode 1984). La régénération de la bouche et des tentacules correspond donc bien à un processus de morphallaxie, tel que l'a décrit Morgan (1901) et a lieu par une réorganisation des tissus restants ((Morgan 1901a), review : (Bosch 2007)). Les cellules changent leur état de différenciation en fonction de leur nouvelle position, les cellules de la colonne gastrique devenant des cellules de la tête. L'état différencié de certaines cellules est modifié. Par exemple, les neurones changent d'identité (Koizumi & Bode 1991; Bode 1996) et des cellules glandulaires zymogènes localisées dans la cavité gastrique avant amputation deviennent des cellules glandulaires à mucus (Siebert *et al.* 2008).

En revanche la régénération est retardée par rapport à des hydres régénérant en conditions physiologiques et les animaux régénérés sont incomplets. Chez les mutants sf-1 pour lesquels les i-cells ont été éliminées et chez les hydres traitées à l'hydroxyurée (HU), bloquant la prolifération, pendant plusieurs jours avant amputation, la tête régénérée a souvent un nombre de tentacules inférieur à l'hydre avant amputation, et les tentacules sont plus courtes, ce qui n'est pas observé dans les hydres contrôle (Cummings & Bode 1984; Miljkovic-Licina *et al.* 2007; Wenger *et al.* 2016; Buzgariu *et al.* 2018). De plus, comme les i-cells ont été éliminées, le système nerveux est nécessairement absent de la tête régénérée (Marcum & Campbell 1978). La régénération incomplète des tentacules est également observée après inhibition de la

neurogenèse par diminution de l'expression de *cnox-2* par RNAi (Miljkovic-Licina *et al.* 2007), ce qui montre que la neurogenèse n'est pas nécessaire pour le patterning de la tête de novo, mais est indispensable pour régénérer une tête fonctionnelle. L'hydre est capable de ré-établir le pôle oral en l'absence de prolifération, cependant la prolifération joue probablement un rôle dans la régénération, puisqu'au cours de la régénération de la tête, une augmentation de la prolifération est observée chez la souche mutante sf-1 n'ayant pas i-cells (Holstein *et al.* 1991) et chez la souche sauvage (Colasanti *et al.* 2009). De plus, l'augmentation de la prolifération par l'augmentation artificielle du monoxyde d'azote par traitement au NOC-18, entraine une accélération de la régénération (Colasanti *et al.* 2009).

L'axe primaire de l'hydre est maintenu par deux centres organisateurs situés aux deux extrémités du corps : le centre organisateur de la tête, et le centre organisateur du pied. Le centre organisateur est une structure décrite pour la première fois chez le Xenope par Spemann et Mangold (Spemann & Mangold 1924). Il s'agit d'un groupe de cellules situées au niveau de la lèvre dorsale du blastopore capable d'induire la formation d'un deuxième embryon sur les tissus hôtes. Des centres organisateurs ont ensuite été identifiés chez d'autres organismes (Niehrs 2004; Gilbert & Barresi 2018). Comme ceux des vertébrés, l'organisateur de l'hydre induit la formation d'un axe secondaire après greffe sur une hydre hôte (Browne 1909). Cependant, contrairement à l'organisateur formé pendant la gastrulation chez les vertébrés, qui est une structure transitoire servant juste pour le développement (Gilbert & Barresi 2018), celui de l'hydre est actif en continu dans les tissus adultes. Comme les cellules de l'hydre sont en constante prolifération et déplacement, un mécanisme de patterning actif chez l'adulte est nécessaire, afin de fournir aux cellules leur nouvelle information de position. Pendant la régénération et le bourgeonnement, les deux organisateurs sont formés de novo à partir de tissus somatiques et déterminent la polarité de l'hydre en formation.

La présence d'un centre organisateur chez l'hydre a été découverte par Ethel Browne en 1909, 15 ans avant Spemann (1924). Elle n'a pas utilisé les mots 'organisateur' et 'induction' mais ses découvertes illustrent ces deux concepts. En effet, la greffe de l'hypostome, de la partie orale du polype en régénération, ou l'extrémité d'un bourgeon, induit la formation d'un deuxième axe à n'importe quel niveau du corps. Pour déterminer l'origine du deuxième axe, Browne tire parti d'*Hydra viridissima*, dont les cellules endodermiques contiennent des algues vertes en symbiose. En transplantant des cellules pigmentées sur une hydre dépigmentée artificiellement, elle montre que le deuxième axe se forme à partir des cellules de l'hôte (Fig.26). Il s'agit donc bien d'un cas d'induction (Browne 1909). 17 ans plus tard, Rand (1926) poursuit les expériences de greffes sur *Hydra oligactis*. En comparant l'efficacité de greffes apicales dans l'induction d'un axe secondaire sur des hôtes intacts et décapités, il met en évidence les deux actions opposées de l'organisateur de la tête : un composant activateur favorisant la différenciation apicale, et un composant inhibiteur empêchant la formation de têtes ectopiques (Rand *et al.* 1926).

L'induction par l'hypostome n'a lieu que dans le cas de transplantation d'un petit fragment de tissus. Après transplantation d'un grand fragment (1/8 de l'hydre), celui-ci forme bien un

deuxième axe (MacWilliams 1983a), mais ne recrute pas les cellules de l'hôte (Broun & Bode 2002). L'organisation du deuxième axe dépend de l'activité auto-organisatrice du tissu greffé.

D'après le modèle Gierer-Meinhardt (1993), l'organisateur de la tête sécrète deux morphogènes : l'activateur de la tête agissant à courte distance et favorisant la structure le sécrétant, et l'inhibiteur de la tête agissant à longue distance pour empêcher la formation de têtes ectopiques (Fig.27) (voir section II.2.1 de l'Introduction). De nombreuses études ont eu lieu afin de les identifier. McWilliams (1983 a, b) a caractérisé, grâce à une approche de greffes de polypes, les propriétés de l'activateur et l'inhibiteur de la tête. Concernant l'activateur, il détermine que ce dernier apparait 10 à 12h après amputation au milieu du corps, au niveau des deux zones en régénération (orale et aborale), et que son expression est retreinte à l'extrémité régénérant la tête dans les premières 24h. L'activateur de la tête reste présent pendant la formation de la tête et une fois celle-ci formée (MacWilliams 1983a). Concernant l'inhibiteur de la tête, celui-ci est dégradé rapidement après amputation. En effet, l'inhibiteur a une demi-vie de 2 à 3h, ce qui permet la formation d'un nouvel organisateur après décapitation. Celui-ci peut se former uniquement dans les tissus ayant un fort ratio activateur/inhibiteur. L'activité de l'inhibiteur de la tête revient lentement, au bout de 24h (MacWilliams 1983b). Le pied a également un centre organisateur sécrétant un activateur et un inhibiteur (Fig.27).

Le rôle de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans la régénération de la tête de l'hydre est connu (Hobmayer *et al.* 2000; Technau *et al.* 2000; Broun 2005; Chera *et al.* 2009; Lengfeld *et al.* 2009), faisant de ses composants des candidats potentiels dans la mise en place de l'organisateur de la tête. En effet, de nombreux composants de la voie Wnt canonique, comme différents ligands *Wnt*, le facteur de transcription *Tcf*, et la protéine β-caténine, sont localisés à l'hypostome et présentent une expression dynamique au cours de la régénération au niveau du pôle oral en reformation (Hobmayer *et al.* 2000; Lengfeld *et al.* 2009). La *β-caténine* est exprimée dans les cellules épithéliales de tout l'animal, mais localisée dans le noyau uniquement au niveau de l'hypostome (Broun 2005). La suractivation de la voie Wnt canonique par inhibition de la GSK-3β par traitement à l'alsterpaullone ou l'azakenpaullone entraine la translocation de la *β-caténine* dans les noyaux tout le long du corps et la formation de têtes ectopiques (Broun 2005; Iachetta *et al.* 2018). Le traitement induit également l'expression de gènes associés à l'extrémité orale comme *HyBra1*, *HyWnt* et *HyTcf* tout le long du corps, et confère à n'importe quelle partie du corps la capacité d'induire un axe secondaire (Broun 2005). Dans les cas de régénération à partir d'agrégats de cellules, des clusters de cellules exprimant *Wnt3* se forment avant l'apparition des axes des polypes régénérés (Technau *et al.* 2000).

Le ligand Wnt3 a été identifié comme étant un bon candidat pour le rôle d'activateur de la tête (Hobmayer *et al.* 2000; Lengfeld *et al.* 2009; Nakamura *et al.* 2011). En effet, il remplit les critères de l'activateur définis par Gierer et Meinhartd. *Wnt3* bien est exprimé à l'extrémité orale dans l'hydre intacte et rapidement ré-exprimé dans l'extrémité régénérant la partie orale après amputation. Un traitement avec la protéine recombinante Wnt3 permet d'augmenter la capacité de régénération de la lignée reg-16 d'*Hydra magnipapillata* (lignée avec capacités de régénération réduite (Achermann & Sugiyama 1985), et n'exprimant pas *Wnt3* à l'extrémité orale en régénération (Hobmayer *et al.* 2000)). De plus, l'expression de *Wnt3* s'autoamplifie

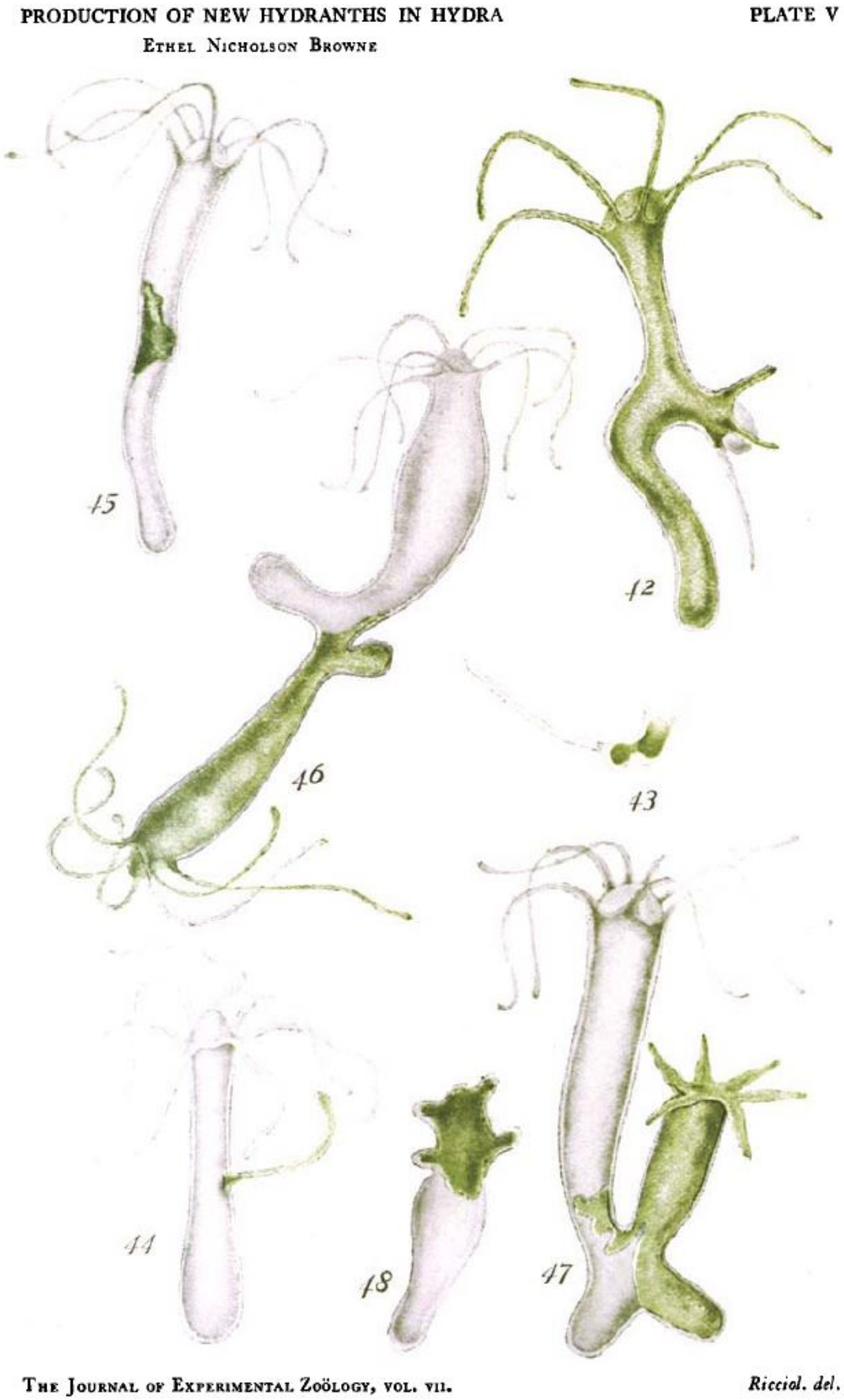


Figure 26 : Greffes d'*hydra viridissima* verte et blanche réalisées par Ethel Browne (1909).

Figure 26 : Greffes d'*hydra viridissima* verte et blanche réalisées par Ethel Browne (1909) (légende).
Hydra viridissima vie en symbiose avec des algues vertes. Il est possible de la dépigmenter en provoquant l'expulsion des symbiontes.
(42) Greffe d'un tentacule blanc avec péristome (hypostome) au milieu d'une hydre verte.
(43) Greffe d'un tentacule blanc avec péristome au niveau du pied d'une hydre verte.
(44) Greffe d'un tentacule vert sans péristome sur d'une hydre verte.
(45) Greffe d'un tissu vert sans péristome sur une hydre verte.
(46) Greffe d'une hydre verte sur une hydre verte.
(47) Greffe d'un pied vert sur une hydre blanche.
(48) Greffe d'un tissu vert avec polarité inversée sur une hydre blanche.
Tiré de Browne (1909).

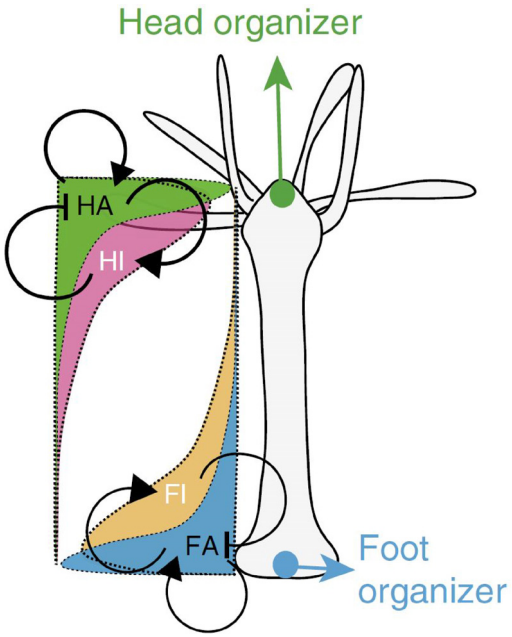


Figure 27 : Le patterning de l'axe primaire de l'hydre dépend de deux centres organisateurs.
Le centre organisateur de la tête sécrète l'activateur de la tête (HA) et l'inhibiteur de la tête (HI). Le centre organisateur du pied sécrète l'activateur du pied (FA) et l'inhibiteur du pied (FI). Les activateurs amplifient leur propre expression et celle de leur inhibiteur.
Tiré de Vogg *et al.* (2019)

grâce à une boucle de rétrocontrole autocatalytique (Nakamura *et al.* 2011). Un élément cis-régulateur du promoteur de *Wnt3*, sur lequel TCF se fixe (Nakamura *et al.* 2011) permet l'augmentation de l'expression de *Wnt3* quand la voie Wnt/*β-caténine* est activée : Wnt3 est bien exprimé de façon ectopique suite à un traitement à l'alsterpaullone (Broun 2005).

D'autres signaux jouent un rôle dans la mise en place de l'organisateur. Il a été montré que diverses protéines kinases (STK, PI3K, MEK, ERK) sont nécessaires pour le développement de l'organisateur de la tête (Arvizu *et al.* 2006) et que la voie TGF-β joue un rôle dans la mise en place de l'axe (Reinhardt *et al.* 2004; Rentzsch *et al.* 2007). En revanche, les i-cells ne sont pas nécessaires à la formation de l'organisateur (Marcum & Campbell 1978). En effet, une hydre sans i-cells régénère la tête avec la bonne polarité AP et l'hypostome conserve la capacité d'induction. De plus les gènes impliqués dans la formation de l'organisateur sont toujours exprimés dans la tête, même si la prolifération est bloquée (Buzgariu *et al.* 2018).

Après une coupe transversale au milieu de la cavité gastrique, l'organisateur est mis en place uniquement au pôle oral. La voie MAPK/CREB est activée du côté antérieur, ce qui induit l'apoptose de ce côté dans la zone proche de la zone de coupure (Kaloulis *et al.* 2004; Chera *et al.* 2009). L'apoptose est indispensable et suffisante pour déclencher la régénération de la tête, mais pas celle du pied (Chera *et al.* 2009). L'induction par choc thermique de l'apoptose sur la moitié orale régénérant le pied entraine la formation de l'organisateur de la tête et donc la régénération de la tête (Chera *et al.* 2009). Les cellules en apoptose sont des i-cells. Elles relâchent des signaux dans les tissus, dont Wnt3 entrainant la translocation nucléaire de la β-caténine dans les cellules voisines en phase S. L'activation de la voie Wnt/β-caténine dans ces cellules déclenche un phénomène de prolifération compensatoire en réponse à l'apoptose dans la zone adjacente à la zone de coupure, et la formation de l'organisateur de la tête (Chera *et al.* 2009). Après décapitation, la situation est différente, Wnt3 est sécrété directement par les cellules épithéliales.

L'inhibiteur de la tête est le deuxième composant important du centre organisateur. Sa présence a été révélée par le fait que le taux de succès d'induction de l'axe secondaire est proportionnel à la distance entre l'hypostome greffé et la tête. De plus, la fréquence d'induction du deuxième axe augmente quand le polype hôte est décapité (Webster 1971; MacWilliams 1983b). Un inhibiteur de la tête a été identifié récemment, le FT *sp5* (Vogg *et al.* 2019). *Sp5* a bien certaines des caractéristiques de l'inhibiteur définies par Gierer et Meinhardt. En effet, il est régulé de façon positive par l'activateur Wnt3, et fortement exprimé au niveau de la tête (Vogg *et al.* 2019). Son expression au pôle régénérant la tête augmente dès le premier jour de régénération, mais après *Wnt3*, ce qui est nécessaire à la reformation du centre organisateur (Vogg *et al.* 2019). Chez l'hydre, *sp5* antagonise l'activateur en réprimant directement le promoteur de *Wnt3* (Vogg *et al.* 2019), un rôle qui a également été observé chez les cellules souches embryonnaires humaines (Huggins *et al.* 2017), indiquant une conservation de l'interaction Wnt3-Sp5. *Sp5* empêche la formation de la tête et son inhibition par RNAi conduit à la formation d'axes ectopiques dans les hydres non disséquées et après bissection (Vogg 2019). Il y a cependant quelques différences avec les caractéristiques de l'inhibiteur supposées par Gierer et Meinhardt. En effet, s*p5* est absent de la partie la plus apicale de l'hypostome, où l'activité de *Wnt3* est

maximale. De plus, s*p5* est un FT, donc ne diffuse probablement pas, ou très peu (Vogg *et al.* 2019). *Sp5* pourrait en revanche activer des gènes codant pour des peptides capables de diffuser dans les tissus et d'inhiber la formation de la tête (Vogg *et al.* 2019). Dans ce cas-là, l'inhibiteur de la tête serait formé par le couple *sp5* - peptide.

III.2.2. *Hydractinia :* un modèle hydrozoaire colonial

Le genre *Hydractinia* rassemble une trentaine d'espèces d'hydrozoaires marins de la famille des Hydractiniidae se retrouvant sous forme polype au stade adulte. Deux espèces ont été développées comme organisme modèle : l'espèce européenne *Hydractinia echinata* et l'espèce américaine *Hydractinia symbiolongicarpu*s (Frank *et al.* 2001). Toutes deux vivent fixées sur des coquilles de bernard-l'hermite. A la différence du polype d'hydre, *Hydractinia* vie en colonies. Les individus (zoïdes) sont connectés par des stolons leur permettant de partager la cavité gastrovasculaire, distribuant la nourriture à travers toute la colonie, ainsi que le système nerveux et les cellules souches (Gahan *et al.* 2016). Cette communication permet la spécialisation des polypes. Il en existe quatre types : les polypes nourriciers, appelés gastrozoïdes, sont les seuls à posséder une bouche et des tentacules ; les polypes reproducteurs appelés gonozoïdes, portent les gonophores ; les deux types de polypes défensifs sont appelés dactylozoïdes et tentaculozoïdes (Fig.28.A) (Sanders *et al.* 2014). Bien que morphologiquement différents, les zoïdes, issus de reproduction asexuée, sont génétiquement identiques.

Comme l'hydre, *Hydractinia* est un hydrozoaire ayant perdu la phase méduse. Les gamètes sont produits par les gonophores des colonies mâle et femelle (Fig.28.B). La ponte est induite par la lumière (Frank *et al.* 2001). Trois jours après fécondation, la larve planula peut se fixer à un substrat et se métamorphoser (Frank *et al.* 2001). La métamorphose est déclenchée par les bactéries présentes sur la coquille des gastropodes ou le chlorure de césium au laboratoire (Frank *et al.* 2001). Elle donne naissance à un polype primaire, produisant tout d'abord un stolon sur lequel vont bourgeonner de nouveaux polypes. La colonie est en expansion constante, sans aucun signe de vieillissement visible (Gahan *et al.* 2016). Elle est mature au bout de plusieurs mois.

Les polypes sont petits, transparents et peuvent grandir fixés sur une lame de microscope, ce qui rend possible le suivi de populations de cellules par imagerie in vivo. Un autre avantage du polype d'*Hydractinia* comme modèle de biologie du développement est la présence d'outils de perturbation de l'expression des gènes. Il est possible de réaliser des pertes de fonction par RNAi (Duffy *et al.* 2010; Millane *et al.* 2011), morpholinos (MO) (Kanska & Frank 2013), mutagenèse par CRISPR/Cas9 (Gahan *et al.* 2017); et des surexpressions par transgenèse ou injection d'ARNm (Gahan *et al.* 2016; Sanders *et al.* 2018). *Hydractinia echinata*, et maintenant principalement l'espèce américaine *Hydractinia symbiolongicarpus*, ont été étudié entre autres pour leurs mécanismes d'alloreconnaissance. Les colonies d'*Hydractinia* s'étendent par croissance des stolons sur le substrat jusqu'à occuper tout l'espace disponible. Suite à un contact entre deux colonies, deux types de réponses ont lieu: la fusion si les colonies sont histocompatibles qui se traduit par la formation d'une cavité gastrovasculaire continue

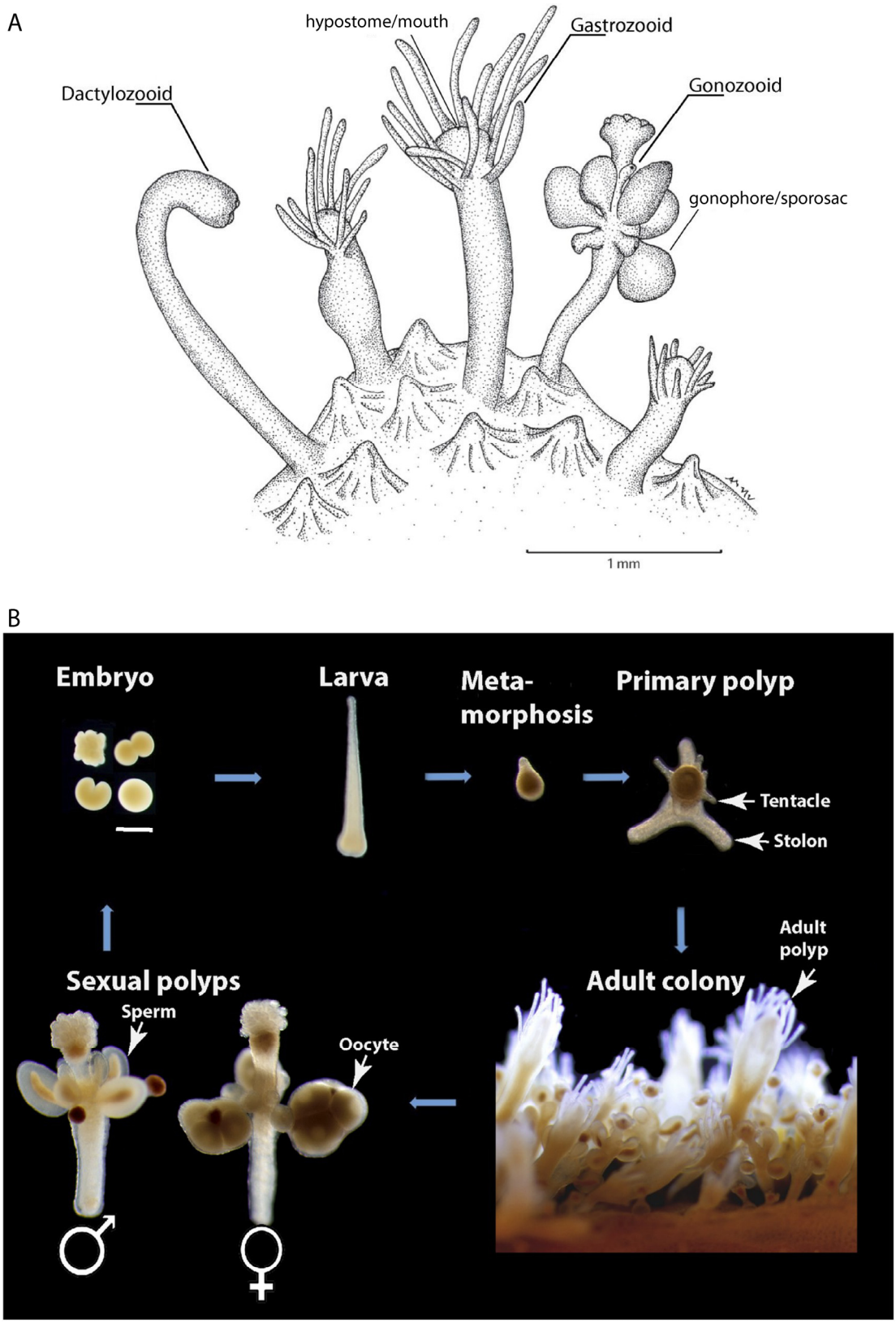


Figure 28 : Le polype colonial *Hydractinia.*
(A) Dessin illustrant le polymorphisme de la colonie *Hydractinia symbiolongicarpus*
Tiré de Sanders *et al.* (2014).
(B) Cycle de vie d'*Hydractinia echinata*
Tiré de Bradshaw *et al.* (2015).

entre les deux colonies, ou le rejet consistant à recruter et décharger des nématocytes à la zone de contact (review : (Rosengarten & Nicotra 2011)). Les deux gènes contrôlant l'alloreconnaissance ont été identifiés : *alr1* et *alr2* codant pour des protéines transmembranaires. Les colonies partageant un même allèle sur les deux loci fusionnent, tandis que des allèles différents entrainent une réaction de rejet. D'autres mécanismes entrent probablement en jeu car des colonies partageant les mêmes allèles se rejettent parfois (review : (Rosengarten & Nicotra 2011)).

Hydractinia possède les cellules souches multipotentes caractéristiques des hydrozoaires, les i-cells. Ces dernières sont situées dans les espaces entre les cellules épithéliales. Dans les gastrozoïdes et les gonozoïdes, elles sont localisées en une bande dans l'ectoderme de la moitié inférieure, tandis que dans les stolons, elles sont distribuées de façon ubiquitaire (Rebscher *et al.* 2008; Bradshaw *et al.* 2015). A la différence de l'hydre, les i-cells d'*Hydractinia* donnent aussi naissance aux cellules épithéliales, (Müller *et al.* 2004; Künzel *et al.* 2010). Künzel *et al.* (2010) ont tiré parti des capacités de fusion entre deux colonies et de la possibilité de créer des lignées transgéniques pour identifier les dérivés des i-cells. Une lignée transgénique exprimant la *GFP* dans les cellules épithéliales a été mise en contact avec une lignée non marquée histocompatible. Dans la lignée 'donneur', les cellules *GFP+* sont stationnaires. La présence de cellules épithéliales *GFP+* dans les stolons de la colonie hôte indique une migration d'i-cells n'exprimant pas la *GFP* entre les deux colonies, qui s'intègrent dans l'épithélium et se différencient en cellules épithéliales *GFP+* (Künzel *et al.* 2010).

Les capacités de régénération d'*Hydractinia* sont connues depuis plus d'un siècle. En 1900, Peebles publie ses observations sur la capacité des gastrozoïdes et gonozoïdes à régénérer leur tête après ablation (Peebles 1900). Un polype complet peut aussi régénérer à partir d'un agrégat de cellules de polype (Müller *et al.* 1986). Les étapes de régénération de la tête d'un gastrozoïde après décapitation ont été décrites en détails par Bradshaw *et al.* (2015). Le polype est isolé de la colonie par une coupe au niveau du pied avant décapitation, il est donc blessé aux deux extrémités (Fig.29). La première étape est la cicatrisation des deux extrémités dans les six premières heures. Les blessures sont refermées par extension des cellules épithéliales, sans prolifération. Au bout de 24h, un blastème est formé à l'extrémité orale uniquement par prolifération et migration des i-cells, qui commence à former après 48h la bouche et les tentacules. Au bout de 96h, les gastrozoïdes peuvent de nouveau attraper les proies. Les neurones et nématocytes qui étaient absents de l'extrémité orale après décapitation sont régénérés de novo pendant la différenciation des structures de la tête (Fig.29). La régénération et la formation du blastème sont bloquées par l'élimination des i-cells (mitomycine C ou irradiation des polypes), indiquant que ces dernières sont indispensables à la régénération (Müller *et al.* 2004; Bradshaw *et al.* 2015).

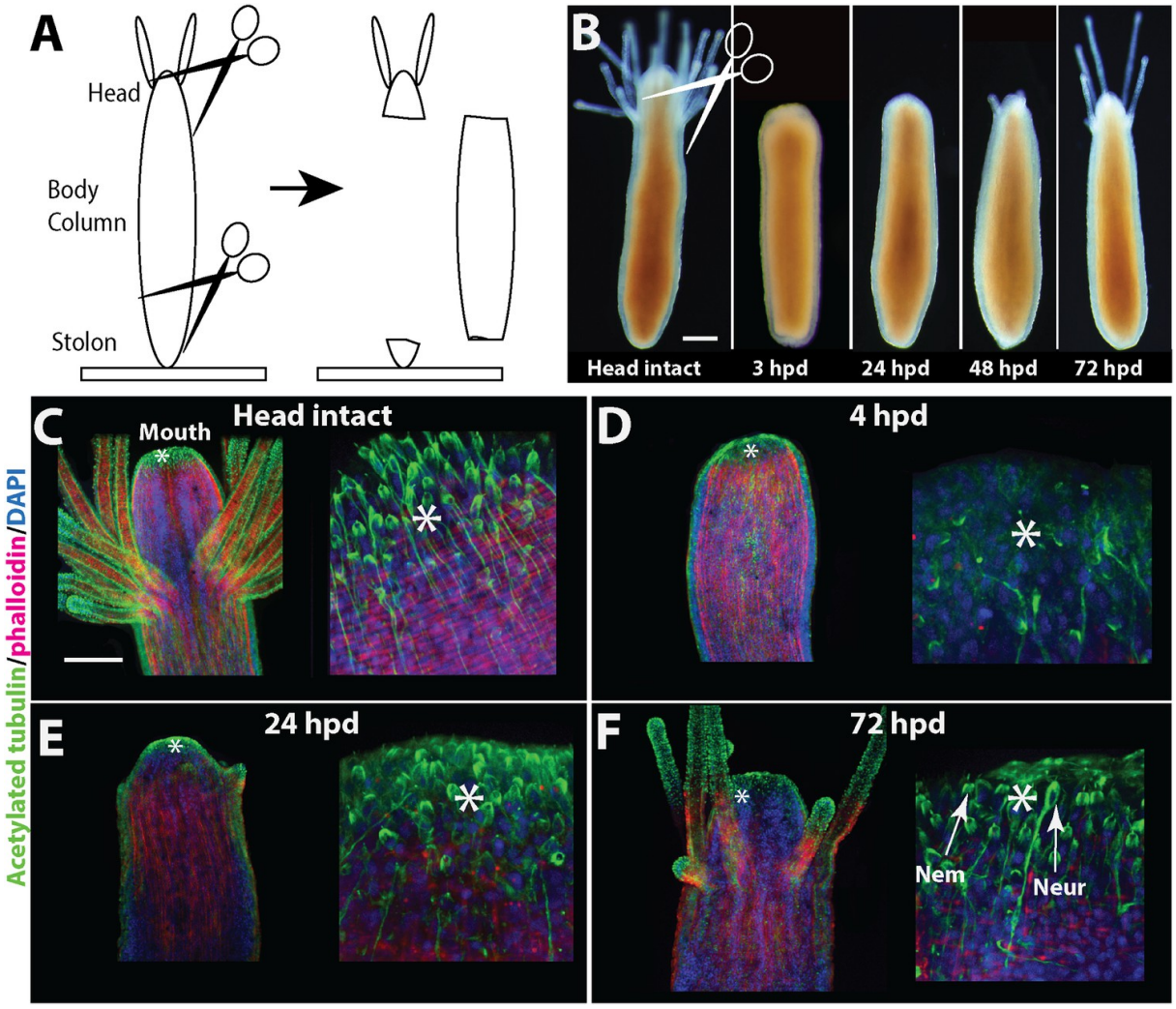


Figure 29 : Régénération de la partie orale chez *Hydractinia echinata.*
(A) Schéma de la dissection réalisée. Le gastrozoïde est isolé du stolon puis décapité.
(B) Etapes de la régénération sur polype vivant.
(C) – (F) Immunohistologie de polypes en régénération, tubuline acetylée en vert, phalloïdine en rouge, dapi en bleu. Abréviations : Nem : nématocyte, Neur : neurone.
Tiré de Bradshaw *et al.* (2015).

Malgré la présence de blessures aux deux extrémités du polype, le blastème se forme uniquement du côté oral. Il existe donc un mécanisme maintenant la polarité du polype. La voie Wnt/β-caténine contrôle la formation de l'axe oral-aboral chez *Hydractinia* au cours du développement, et détermine la position du pôle oral du polype pendant la métamorphose (Plickert *et al.* 2006). Cette voie Wnt 'canonique' joue également un rôle pendant la régénération. Après amputation d'un polype au milieu du corps, *Wnt3*, *Tcf*, *Fzl* sont tout d'abord exprimés à la zone de coupure sur les deux moitiés. Leur expression du côté du pied est transitoire, elle disparait au bout de 6h, tandis que l'expression de *Wnt3*, *Tcf*, *Fzl* du côté oral est maintenue (Müller *et al.* 2007). L'expression de *Wnt3* du côté oral précède la différenciation des structures de la tête (Duffy *et al.* 2010). La sur-activation de la voie Wnt/β-caténine pendant la régénération, par inhibition de GSK-3β par traitement au LiCl ou à l'azakenpaullone, entraine la régénération d'une deuxième tête du côté aboral, suivie par le remplacement total des structures aborales par des tentacules (Müller *et al.* 2007; Duffy *et al.* 2010). Au contraire l'inhibition de la voie Wnt canonique par diminution de l'expression par RNAi de *Wnt3* ou *Tcf* inhibe la régénération de la tête (Duffy *et al.* 2010).

Le stolon est également régénéré selon un processus différent de celui permettant la régénération de la tête du polype (Fig.30) (Bradshaw *et al.* 2015). Après cicatrisation de la blessure au pôle aboral du polype, les structures de la tête régressent jusqu'à disparaitre totalement, puis le corps s'allonge et se ramifie. De nouveaux polypes apparaissent sur le stolon régénéré. Deux arguments permettent d'affirmer qu'il s'agit bien d'un stolon : la sécrétion de chitine, spécifique du stolon (Lange & Müller 1991) et la distribution des i-cells, réparties partout dans l'épiderme, correspondant bien à celle d'un stolon. Seuls les jeunes polypes sont capables de régénérer le stolon directement à partir de l'extrémité aborale (Müller *et al.* 1986). Chez les polypes plus âgés, des bourgeons de stolon à l'extrémité aborale ont été observés seulement chez des polypes incubés dans le RNAi *Wnt3*, n'ayant pas régénéré la tête (Duffy *et al.* 2010), ce qui indique un rôle potentiel de *Wnt3* dans l'inhibition de la formation du stolon. Ceci est cohérent avec l'expression de *Wnt3* au cours de la régénération du stolon, qui diminue en parallèle de la régression des structures de la tête, et est exprimé de nouveau à l'extrémité orale des nouveaux polypes en bourgeonnement (Bradshaw *et al.* 2015).

III.2.3. *Nematostella* : un modèle anthozoaire

L'anémone de mer *Nematostella vectensis* appartient aux anthozoaires. Leur position phylogénétique comme groupe frère des médusozoaires est particulièrement informative pour comprendre l'évolution des cnidaires, les anthozoaires ayant conservé plus de caractéristiques ancestrales que les hydrozoaires. *Nematostella* est un polype solitaire vivant dans les estuaires du nord de l'Amérique (côte Atlantique et Pacifique) et de l'Angleterre (Hand & Uhlinger 1994).

Le système digestif de *Nematostella* est plus complexe que celui des polypes hydrozoaires (Fig.31). La bouche, située au pôle oral et entourée par les tentacules, débouche sur le pharynx, qui s'ouvre sur la cavité gastrique. Celle-ci est compartimentée par huit mésentères formant des replis dans la paroi. Ces derniers portent les cellules digestives, glandulaires et les gonades

(Fig.31). Chez les juvéniles, les huit sont déjà présents mais deux uniquement portent les gonades (Leclère & Rentzsch 2014). Chez les adultes, les huit mésentères produisent les cellules germinales. La cavité gastrique contient également des nématosomes, des agrégats de cnidocytes circulant librement (Williams 1979). Au niveau du pied, le physa est utilisé comme organe fouisseur, permettant au polype de s'enterrer dans les sédiments. Un axe secondaire perpendiculaire au premier est visible par la présence du siphonoglyphe localisé d'un seul côté du pharynx et la position des muscles rétracteurs des mésentères. Certains gènes impliqués dans le patterning DV des bilatériens ont une expression asymétrique le long de l'axe directif dans le pharynx (ex. *dpp* (membre de TGF-β) dans le pharynx, (Finnerty *et al.* 2004)).

Nematostella se reproduit par reproduction sexuée et asexuée. Les individus mâle et femelle peuvent pondre une fois par semaine. Dans des conditions favorables de nourriture, cycle jour-nuit et température, une femelle peut pondre entre 100-600 œufs par semaine (Fritzenwanker & Technau 2002). Après fécondation, la gastrulation a lieu par invagination, commençant au pôle animal au bout de 12 à 15h, formant une larve planula ciliée nageuse après 36 à 48h. Celle-ci s'allonge, forme le pharynx, les premiers mésentères et quatre bourgeons de tentacules avant métamorphose. La métamorphose a lieu au bout de sept jours. Contrairement à d'autres espèces de cnidaires, elle n'est pas déclenchée par le substrat (Müller & Leitz 2002). Les juvéniles ont quatre tentacules uniquement, les autres (12 supplémentaires au maximum) apparaissent pendant la croissance (Hand & Uhlinger 1992; Reitzel *et al.* 2007; Layden *et al.* 2016). Les individus sont matures après trois mois (Hand & Uhlinger 1992). La forme adulte peut également être issue de reproduction asexuée. La forme la plus fréquente est la fission transverse (Hand & Uhlinger 1995; Reitzel *et al.* 2007)) : la séparation en deux parties d'un animal adulte à partir d'une constriction dans la région aborale, et régénération des parties manquantes. La reproduction asexuée peut aussi prendre la forme de l'inversion de polarité (Reitzel *et al.* 2007) : le développement d'une tête au niveau du physum existant, puis séparation des deux individus par fission transverse.

Nematostella a surtout été étudié pour le développement embryonnaire et larvaire (ex. (Rentzsch *et al.* 2006, 2008; Röttinger *et al.* 2012; Leclère & Rentzsch 2014)). De nombreux outils moléculaires sont maintenant disponibles : le génome est séquencé (Putnam *et al.* 2007), des transcriptomes de différents stades du développement sont disponibles (Helm *et al.* 2013; Tulin *et al.* 2013; Fischer *et al.* 2014), ainsi que des données issues de séquençage de cellule unique (Sebé-Pedrós *et al.* 2018). Il est également possible de suivre la localisation in vivo de différentes molécules, grâce à l'injection d'ARNm (ex. β-caténine couplée à la GFP (Wikramanayake *et al.* 2003)) et l'établissement de lignées transgéniques (ex. mCherry sous le contrôle du promoteur Myosin Heavy Chain type II, transgenèse par méganuclease (Renfer *et al.* 2010)). Des pertes et gains de fonction peuvent aussi être réalisés par CRISPR et TALEN (Ikmi *et al.* 2014).

Figure 30 : Régénération du stolon chez *Hydractinia echinata.*
Photos de polype vivant isolés de la colonie se transformant en stolon puis régénérant des gastrozoïdes.
Tiré de Bradshaw *et al.* (2015).

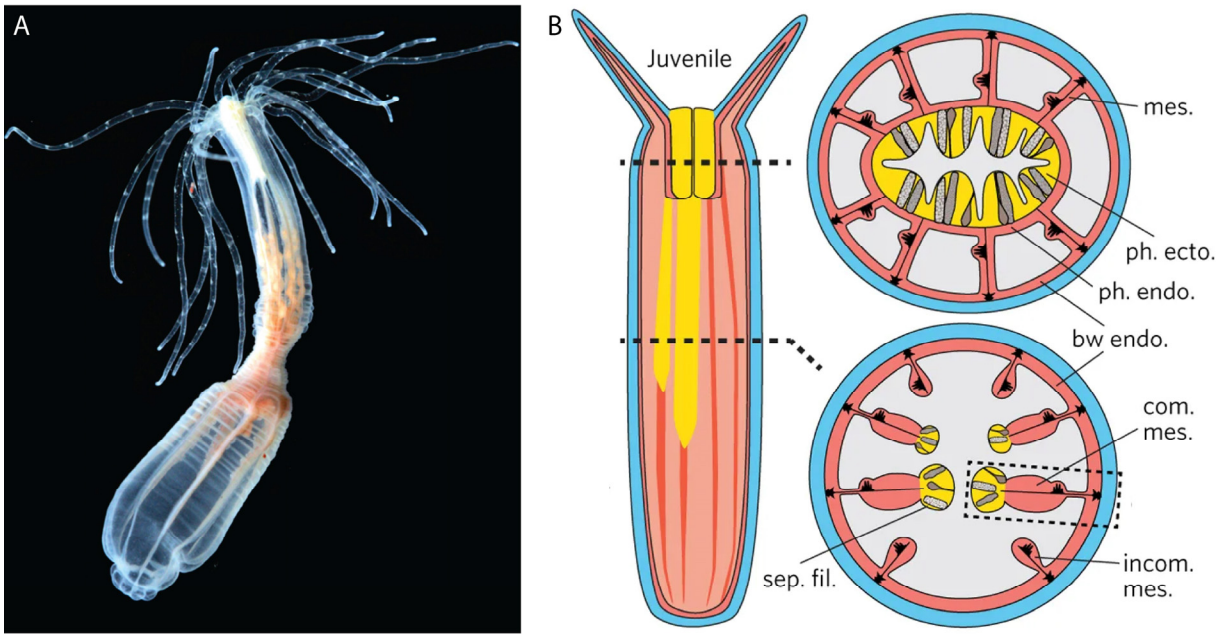


Figure 31 : Morphologie de *Nematostella vectensis.*
(A) Photo de *Nematostella* adulte.
Tiré de Layden *et al.* (2016).
(B) Organisation de la cavité digestive d'un juvénile de *Nematostella.* Schéma en coupe longitudinale et coupe transversale au niveau du pharynx et de la cavité gastrique. En bleu les dérivés de l'ectoderme, en rouge les dérivés de l'endoderme, en jaune le pharynx et les filaments septés issus de l'ectoderme. Abréviations : bw : paroi du corps, com. mes. : mésentère complet, incom. mes. : mésentère incomplet, mes : mésentère, ph.ecto : ectoderme du pharynx, ph. endo : endoderme du pharynx, sep. fil. : filament scepté.
Tiré de Steinmetz *et al.* (2017).

Nematostella est capable de régénérer la partie orale après amputation de la tête sous la région du pharynx (Fig.32) (Passamaneck & Martindale 2012; Bossert *et al.* 2013; Amiel *et al.* 2015). Les étapes de la régénération et le timing ne varient pas en fonction de l'âge des animaux, mais la régénération est plus rapide à une température plus élevée (Bossert *et al.* 2013; Amiel *et al.* 2015). Les temps sont ceux donnés par Amiel *et al.* (2015), pour une régénération chez des juvéniles à 22°C. Tout d'abord, la cicatrisation a lieu dans les six premières heures. Puis les mésentères entrent en contact avec le site d'amputation à 12hpd, accompagné par une augmentation de la prolifération à la zone de coupure, et une activation de la transcription dans le gastroderme et la région orale des mésentères (Amiel *et al.* 2015). A 48hpd, un espace se forme entre les mésentères et la zone de coupure. La prolifération et la transcription augmentent massivement dans l'ectoderme, le gastroderme, et la région orale des mésentères utilisée pour reformer le pharynx (Amiel *et al.* 2015; Passamaneck & Martindale 2012). A partir de 60h, la régénération du pharynx commence, ce qui est marqué par une augmentation de l'autofluorescence à 488nm (utilisé comme marqueur de la réapparition du pharynx par Amiel *et al.* (2015)). La partie basale est formée après 72h, quand les bourgeons de tentacules se forment. Jusqu'à 144hpd, le pharynx finit de régénérer, les tentacules ainsi que le polype s'allongent (Fig.32). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la transcription (Actimomycin D) et de la prolifération (HU) bloquent la régénération respectivement juste après la cicatrisation (6hpd) et juste avant la régénération du pharynx (48hpd) (Passamaneck & Martindale 2012; Amiel *et al.* 2015).

Figure 32 : Régénération de la tête chez *Nematostella.*
Juvénile en haut, adulte en bas. Les flèches indiquent les bourgeons de tentacules, les astérisques les tentacules régénérées.
Tiré de Amiel *et al.* (2015).

Le signal de transition entre la cicatrisation et la régénération, ayant pour conséquence le déclenchement de la vague massive de prolifération nécessaire à la régénération, est donné par le processus de cicatrisation (Passamaneck & Martindale 2012). En effet, un pulse de nocodazole, perturbant la polymérisation et dépolymérisation des microtubules en se liant à la

β-tubuline, entre 18 et 42h, bloque totalement la régénération. Même après lavage de l'inhibiteur, la prolifération ne redémarre pas. Une deuxième blessure permet cependant de relancer la prolifération et la réponse régénérative. La voie ERK/MAPK est également nécessaire à la régénération et à la cicatrisation chez *Nematostella* (DuBuc *et al.* 2014). L'UO126 bloque la signalisation MAPK en inhibant la phosphorylation de la kinase ERK par MEK (Favata *et al.* 1998). Un traitement à l'UO126 chez *Nematostella* après amputation empêche de façon réversible la cicatrisation et la régénération, et modifie l'expression de gènes exprimés au niveau de la blessure, comme le FT *SoxE1* et un inhibiteur de matrix metalloproteinases (MMP). Grâce à une approche de microarrays pendant la phase de cicatrisation, DuBuc *et al.* (2014) ont observé une augmentation de l'expression de gènes modérateurs de la voie MAPK comme intégrine alpha et les protéines G, et aussi de gènes à activité peptidase, de facteurs de croissance et de gènes impliqués dans la réorganisation de l'ECM (MMP, et inhibiteurs de MMP (TIMP)).

Comme chez les deux modèles polypes hydrozoaires, la voie Wnt/β-caténine est impliquée dans la régénération du pôle oral chez *Nematostella* (Trevino *et al.* 2011). L'incubation de moitiés orales régénérant le physum dans l'alsterpaullone entraine la stabilisation de la β-caténine au pôle aboral et la régénération de la bouche et du pharynx au lieu du physum (Trevino *et al.* 2011). Dans les animaux traités régénérant la bouche à la place du physum, le marqueur aboral *anthox1* est réprimé. Une comparaison de transcriptomes des zones orales et aborales en régénération révèle une expression dynamique des ligands Wnt au côté oral au cours de la régénération indiquant un rôle potentiel de la voie Wnt/β-caténine dans la spécification des différentes structures orales (Schaffer *et al.* 2016).

La bonne connaissance du développement embryonnaire de *Nematostella* permet une comparaison directe de l'utilisation des gènes entre le développement et la régénération. Des marqueurs exprimés au pôle oral et aboral pendant le développement sont exprimés au même pôle pendant la régénération (Burton & Finnerty 2009). *Nv-OtxC* est exprimé dans les précurseurs des cellules endodermiques pendant la gastrulation, puis majoritairement dans l'endoderme au pôle aboral pendant la suite du développement (Mazza *et al.* 2007). Au cours de la régénération, *Nv-OtxC* est exprimé dans le physum (Burton & Finnerty 2009). *Nv-foxA* (Martindale 2004) et *Anthox-6* (Finnerty *et al.* 2004), exprimés dans les structures orales en développement, le sont aussi pendant la régénération et la fission transverse (Burton & Finnerty 2009). Certains gènes sont redéployés de façon différente pendant la régénération et le développement. Les gènes *Anthox1a*, *Anthox7* et *Anthox8* sont exprimés de façon asymétrique le long de l'axe secondaire pendant le développement (Finnerty *et al.* 2004), tandis qu'ils sont exprimés sur tout l'endoderme pendant la régénération (Burton & Finnerty 2009). La base de données NvERTx (Warner *et al.* 2018, 2019), combine des données transcriptomiques de différents stades de régénération et des données transcriptomiques pendant le développement embryonnaire de *Nematostella* (Helm *et al.* 2013; Fischer *et al.* 2014). Le regroupement de ces données révèle qu'une partie des gènes utilisés pour le développement est réutilisée pour la régénération ; mais que l'amputation entraine aussi l'activation de certains gènes spécifiques à la régénération (Warner *et al.* 2019).

III.3. Capacités de régénération des méduses

Comparé aux capacités de régénération des polypes, étudiées depuis le XVIIIème siècle, celles des méduses sont pour l'instant encore mal connues. A cause de leur plus grande complexité anatomique, les méduses ont longtemps été considérées comme ayant des capacités de régénération assez faibles. Il existe à l'heure actuelle peu de données sur les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la régénération des structures complexes présentes chez les méduses. Cette section synthétise les connaissances actuelles sur la réponse à la blessure chez les méduses, ayant servie de base pour mon travail de thèse.

III.3.1. Morphologie de la méduse

La particularité de la méduse par rapport au polype est son mode de vie pélagique, nécessitant un système locomoteur plus développé que celui du polype. La nage est assurée par l'ombrelle en forme de cloche plus ou moins aplatie selon les espèces. Celle-ci est composée de plusieurs couches de cellules : l'exombrelle du côté convexe et la sous-ombrelle du côté concave. L'exombrelle et la sous-ombrelle sont séparées par la mésoglée, une couche épaisse acellulaire composée principalement de glycoproteines. Au centre de l'ombrelle se situe l'organe digestif regroupant la bouche et l'estomac, appelé 'manubrium'. Les nutriments sont distribués dans l'ombrelle par un système de canaux reliant les organes principaux (manubrium, gonades et bulbes tentaculaires) entre eux : des canaux radiaires et un canal circulaire situé à la marge de l'ombrelle.

Les muscles permettant la contraction de l'ombrelle se situent dans la sous-ombrelle, il s'agit de muscles striés disposés de façon circulaire. Leur contraction permet de diminuer le volume de la cavité de la sous-ombrelle, ce qui va expulser l'eau et générer la force permettant une accélération. Le retour à la forme de départ est assuré par le relâchement des muscles et l'élasticité de la mésoglée. La coordination des mouvements est assurée par le système nerveux, composé d'un réseau répandu dans l'ombrelle, ainsi que d'une condensation à la marge de l'ombrelle où sont situés les organes sensoriels, statocystes, ocelles ou rhopalies. Les contractions rythmiques sont déclenchées par des neurones pacemaker (Satterlie & Nolen 2001; Mackie 2004). La communication entre neurones, ainsi que la transmission du signal entre les neurones et les muscles sont assurées par des synapses chimiques (Westfall *et al.* 1971; Westfall 1973) utilisant des peptides RF-amide et RW-amide.

L'ombrelle des méduses hydrozoaires et scyphozoaires-cubozoaires est assez différente, ainsi que le système générant les contractions (dichotomie observée par Romanes (1885)).

Caractéristiques des méduses d'hydrozoaires

Chez les méduses hydrozoaires, les muscles striés de la sous-ombrelle (Fig.33.A) responsables des contractions rythmiques de l'ombrelle viennent de l'entocodon, une structure issue du bourgeon de l'ectoderme (Seipel & Schmid 2006; Kraus *et al.* 2015), localisée au début du

développement de la méduse entre l'ectoderme et l'endoderme du polype. Le problème de l'homologie entre l'entocodon et le mésoderme des bilatériens n'est pas résolu (homologie : (Boero *et al.* 1998; Seipel & Schmid 2006), non homologie : (Martindale 2004)). Les fibres musculaires sont connectées entre cellules adjacentes par des jonctions gap ce qui assure un couplage électrique entre les cellules et ainsi des contractions simultanées (Satterlie 2002, 2008). Le vélum, un épithélium musculaire situé à la marge de l'ombrelle, augmente l'efficacité de la propulsion en réduisant la taille de l'ouverture de l'ombrelle (Collins *et al.* 2006).
Chez les méduses hydrozoaires, les neurones sont condensés en deux anneaux nerveux localisés à la marge de l'ombrelle (Fig.33.A) : l'anneau nerveux interne moteur, et l'anneau nerveux externe sensoriel (Koizumi *et al.* 2015). Dans l'anneau moteur, les neurones sont connectés par des jonctions gap, ce qui permet le passage du potentiel d'action dans tout l'anneau (*Polyorchis*, (Spencer & Satterlie 1980)). Une petite portion de la marge de l'ombrelle est suffisante pour générer les contractions.

Caractéristiques des méduses scyphozoaires et cubozoaires
Chez les scyphozoaires et les cubozoaires, les muscles striés sont issus de l'ectoderme de la sous-ombrelle. Chez *Chrysaora*, les muscles striés de l'éphyrules sont produits de novo indépendamment de ceux du polype (Helm *et al.* 2015). Le muscle strié circulaire est appelé muscle coronal (Fig.33.B) (Satterlie *et al.* 2005; Helm *et al.* 2015). Les cubozoaires possèdent un vélarium jouant un rôle similaire au vélum des hydrozoaires. La contraction des muscles est initiée par des pacemakers situés dans les organes sensoriels, les rhopalies, localisés à la marge de l'ombrelle (Fig.33.B). Les cubozoaires en ont quatre, les scyphozoaires un multiple de quatre. Celles des cubozoaires sont les plus complexes : elles contiennent chacune six yeux (deux yeux camérulaires, deux yeux de type fente ('slit eye') et deux de type puits ('pit eye') (Nilsson *et al.* 2005)) et un statocyste assurant l'orientation constante de la rhopalie. Elles sont également le siège du système nerveux rhopalial (Parkefelt *et al.* 2005; Skogh *et al.* 2006; Parkefelt & Ekström 2009) impliqué dans l'intégration des informations visuelles et la génération du signal pacemaker qui initie les contractions de l'ombrelle (Satterlie 1979, 2002). L'ablation des rhopalies est suffisante pour stopper les contractions (Romanes 1885). Chez certaines cuboméduses, le pacemaker est contrôlé par les signaux venant des photorécepteurs (Garm & Bielecki 2008; Garm & Mori 2009; Stöckl *et al.* 2011). L'intégration des signaux visuels permet des comportements complexes tels que l'évitement des obstacles (Garm *et al.* 2007) et l'utilisation d'indices visuels terrestres pour la navigation à travers les mangroves (Garm *et al.* 2011).

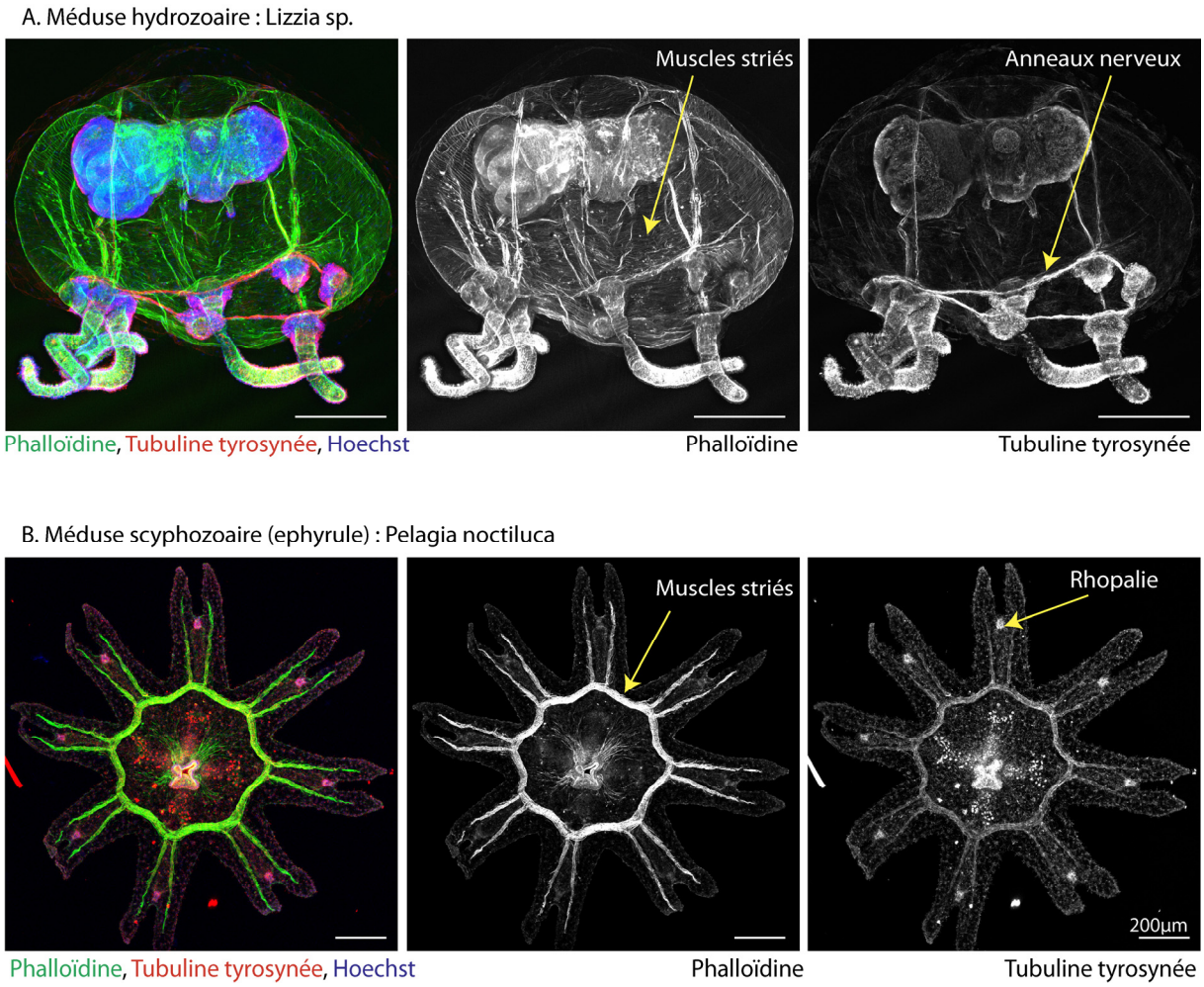


Figure 33 : Morphologie de méduses hydrozoaires et scyphozoaires.
(A) Méduse hydrozoaire *Lizzia sp*. collectée dans le Gullmarsfjord à partir du Sven Lovén Centre for Marine Sciences (Kristineberg, Suède). Marquage immunohistologique tubuline tyrosylée en rouge, marquage à la phalloïdine en vert et au hoechst en bleu.
(B) Ephyrule de *Pelagia noctyluca*. Marquage immunohistologique tubuline tyrosylée en rouge, marquage à la phalloïdine en vert et au hoechst en bleu.

III.3.2. Régénération et transdifférentiation

Les méduses contiennent deux systèmes d'organes qu'elles sont capables de régénérer : le système nerveux localisé principalement à la marge, et le système digestif parfois associé au système reproducteur.

Régénération du système nerveux sensoriel et moteur

Chez les méduses hydrozoaires, des portions de marge, incluant canal circulaire, vélum et tentacules, régénèrent (*Gonionemus vertens* (Hargitt 1897), *Clytia hemisphaerica* (ancien nom : *Campanularia jonstoni*) (Schmid & Tardent 1971)). Chez *Gonionemus vertens*, des résultats contradictoires ont été obtenus sur la régénération de la marge après ablation totale : une régénération de la marge complète avec formation de nouveaux tentacules a pu être observée par Hargitt (1902), mais pas par Morgan (1899). Les variations peuvent être expliquées par le fait que les méduses utilisées sont péchées et non cultivées en laboratoire. Les méduses scyphozoaires sont également capables de régénérer la marge ainsi que les organes sensoriels, en partie (*Rhizostoma pulmo* (Hargitt 1904)), ou en totalité (*Cassiopea xamachana* (Zeleny 1907; Stockard 1908)). En revanche, l'éphyrule de la méduse scyphozoaire *Mastogias papua*, n'est pas capable de régénérer en totalité les parties enlevées : pour quatre bras ôtés, au plus deux sont régénérés (Okada 1927).

Certains organes sensoriels, localisés à la marge de l'ombrelle sont bien régénérés. Chez l'hydrozoaire *Cladonema radiatum*, les yeux ectodermiques présents sur les bulbes tentaculaires sont régénérés après ablation complète en 10 à 15 jours (Weber 1981). Ces yeux ont une structure assez complexe, ils sont composés d'une lentille comprenant trois types cellulaires différents (des cellules basales, des cellules pigmentées et des cellules photoréceptrices) enveloppée par une rétine et une cornée. La régénération suit des étapes similaires au développement. Une fois la blessure refermée et la mésoglée réparée, les cellules servant à la régénération forment un primordium organisé de façon concentrique (Fig.34). L'origine de ces cellules n'est pas connue. Il peut s'agir, soit de cellules interstitielles, soit de cellules de l'ectoderme des bulbes dédifférenciées. Au bout de 24h, les cellules épithéliales acquièrent une vacuole et reforment la cornée. Des cellules sensorielles présomptives sont déjà visibles, venant des cellules formant le primordium. Elles se différentient au bout de trois à six jours, en même temps que les cellules pigmentées contenant la mélanine (Fig.34) (Weber 1981).

Les scyphozoaires (*Rhizostoma pulmo* (Hargitt 1904)) et cubozoaires (*Tripedalia cyctophora* (Stamatis *et al.* 2018)) régénèrent les rhopalies après ablation. Chez *Tripedalia,* l'ablation d'une rhopalie est suivie d'une augmentation de la prolifération au bout de 48h, précédant un changement de morphologie après quatre jours. La densité de cellules augmente et la cavité gastrovasculaire se forme. Les premiers pigments et neurones différenciés, synthétisant les peptides RF-amide et FMRF-amide, apparaissent alors. Deux jours plus tard, le cristal est séparé de l'épiderme et du gastroderme par la mésoglée. Les photorecepteurs apparaissent, ainsi que le signal pacemaker. Au bout de huit jours, les six yeux sont présents, les deux yeux camérulaires ayant déjà une lentille. L'apparition des neurones géants synthétisant le peptide FMRF-LIR est corrélée avec une augmentation de la fréquence du signal pacemaker. Au bout

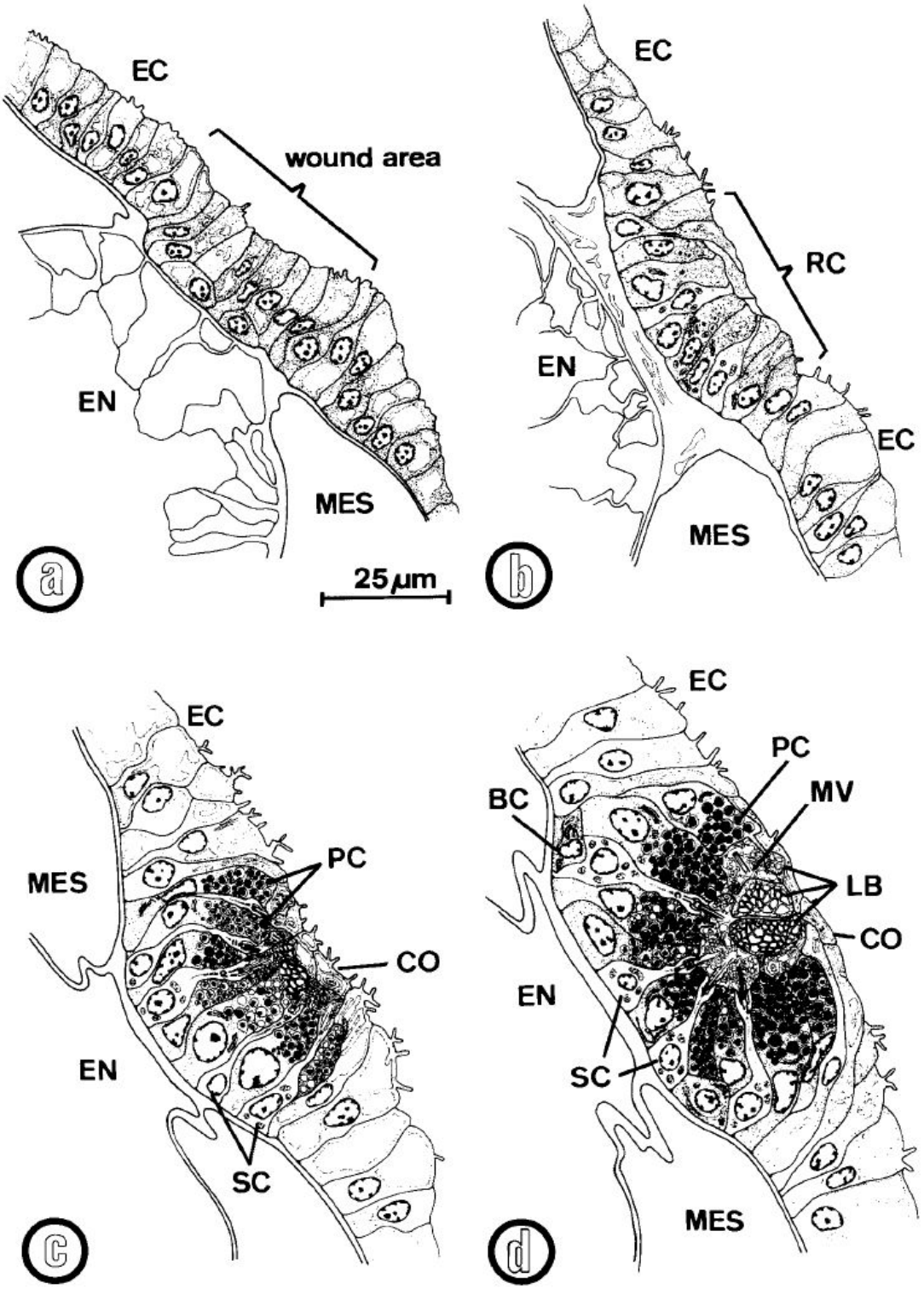


Figure 34 : Régénération des ocelles chez Cladonema radiatum.
Représentation schématique des étapes de la régénération des ocelles, reconstruction à partir de sections semi-fines et de microscopie électronique à travers l'ocelle. Quatre stades sont représentés : (a) 6hpd, (b) 24hpd, (c) 3-4 jours, (d) 10-15 jours après ablation de l'ocelle.
Abréviations : BC : cellule basale, CO : cornée EC : cellules épithéliales, LB : corps de la lentille, MES : mésoglée, MV : microvillosités des photorecepteurs, PC : cellules pigmentées, RC : cellules de régénération, SC : cellule sensorielle
Tiré de Weber (1981).

de deux semaines, la rhopalie régénérée a une morphologie similaire à celle des rhopalies originales. Elle est bien fonctionnelle : capable de capter les signaux lumineux et de déclencher les contractions de l'ombrelle.

Régénération du système digestif et reproducteur

La régénération du manubrium après ablation a été documentée chez les méduses hydrozoaires *Gonionemus vertens* (Hargitt 1897, 1902; Morgan 1899), *Obelia geniculata*, *Clytia hemisphaerica* (précédemment appelée *Phialidium variabile* et *Campanularia johnstoni)* (Neppi 1917; Schmid 1974a) et *Podocoryne carnea* (Schmid 1974a), ainsi que chez les scyphozoaires *Rhizostoma pulmo* (régénération de bras oraux uniquement (Hargitt 1904)), *Cassiopea xamachana* (Zeleny 1907; Stockard 1908) et *Mastogias papua* (Okada 1927).

Chez *Gonionemus vertens*, le manubrium est régénéré en quatre à dix jours après ablation. Tout d'abord le trou causé par la dissection se referme, entrainant la reconnexion de ses quatre canaux radiaires au centre de l'ombrelle. La cavité gastrique se forme au point de jonction des canaux puis s'ouvre (Hargitt 1897, 1902; Morgan 1899). Si le manubrium ainsi que la partie centrale des canaux radiaires est ôtée, les canaux grandissent tout d'abord jusqu'au centre, avant que la régénération du manubrium soit initiée au point de jonction de ces derniers (Morgan 1899). Le manubrium est donc systématiquement régénéré au centre de l'ombrelle, sur un canal radiaire. Chez la méduse *Clytia hemisphaerica*, le manubrium est bien régénéré sur un canal radiaire si présent (Schmid & Tardent 1971). En revanche, il peut également être régénéré sur des fragments d'ombrelle ne contenant pas de système gastrovasculaire (Schmid & Tardent 1971). Le manubrium se forme alors à partir d'un cluster de cellules de la sous-ombrelle. La sous-ombrelle, qui ne contient pas de cellules souches serait donc capable de reformer le système gastrovasculaire. De façon intéressante, chez *Obelia geniculata* et *Clytia hemisphaerica*, le nombre de lobes du manubrium régénéré semble correspondre au nombre de canaux radiaires auxquels il est attaché (Neppi 1917).

La régénération est parfois imparfaite, en effet des doubles manubriums ou manubriums bifurqués ont été observés dans 20% des cas de régénération par Hargitt (1902) chez *Gonionemus vertens*. Les méduses sauvages péchées des espèces *Gonionemus vertens* et *Oceania Languida* possèdent également parfois des doubles manubriums (Hargitt 1902). La présence de plusieurs manubriums a été observée dans des méduses péchées chez certains hydrozoaires, tels que *Stomobrachium mirabile*, *Clytia*, *Gastroblasta timida*, *Gastroblasta raffaele*i, *Sarsia*, *Multioralis ovalis*, *Epenthesis folleata*, *Pseudoclytia pentata* (Okada 1927).

Concernant les canaux radiaires reliés au manubrium, certaines méduses peuvent les régénérer, comme *Clytia hemisphaerica* (Schmid & Tardent 1971) et *Mastogias papua* (Okada 1927). Chez *Clytia*, une fois les canaux radiaires régénérés, les gonades sont régénérées sur ces derniers (Schmid & Tardent 1971).

Un manubrium isolé peut survivre jusqu'à un mois, mais n'est pas capable de régénérer la partie manquante de l'ombrelle (*Gonionemus vertens* (Hargitt 1897) et *Cassiopea xamachana* (Stockard 1908)). Suite à l'ablation du manubrium, la zone centrale de l'ombrelle chez le

scyphozoaire *Cassiomea xamachana* est régénérée (Stockard 1908), tandis que chez les hydrozoaires *Clytia hemisphaerica* (Schmid 1974a) et *Gonionemus vertens* (Hargitt 1897), le trou est refermé par contraction progressive de la zone de coupure.

Régénération du manubrium par transdifférenciation chez *Podocoryne carnea*

La source des cellules participant à la régénération est inconnue dans les exemples précédents. Parmi les sources de cellules possibles détaillées dans la section II.1 de l'Introduction, la seule piste ayant été explorée chez les méduses est la transdifférenciation.

Chez la méduse *Podocoryne carnea*, le manubrium peut régénérer en partie par transdifférenciation des cellules musculaires striées en culture, après traitement à la collagénase ou en combinaison avec des cellules endodermiques. L'ombrelle de *Podocoryne* se compose de trois épithéliums : l'épiderme de l'exombrelle, séparé par la mésoglée de la sous-ombrelle, composée de l'endoderme et des muscles striés circulaires. Chez Podocoryne, les muscles striés sont présents dans toute la sous-ombrelle, et sont recouverts par une couche de muscles lisses au niveau des canaux radiaires uniquement (Seipel & Schmid 2006). La couche de muscles striés est composée uniquement de cellules musculaires striées reposant sur une ECM qui les sépare de l'endoderme. Les fibres contractiles sont situées à la base de la cellule, le noyau en périphérie. Les cellules sont reliées par des jonctions desmosome et gap (Mackie & Singla 1975). Elles ne se divisent pas (Schmid 1988).

La présence d'une ECM entre l'endoderme et les muscles striés permet de les isoler mécaniquement à la pince à partir d'un fragment interradiaire (quart de méduse ne contenant pas de canal radiaire), ou par digestion de la mésoglée à la collagénase (Fig.35). Un fragment de tissus isolé contient 200 à 400 cellules musculaires striées. Une coloration au rouge neutre, qui est stocké dans les vacuoles des cellules endodermiques, permet de s'assurer de l'absence de ces dernières dans les fragments de muscles striés (Schmid *et al.* 1982), et le DAPI, qui colore moins les noyaux des cellules musculaires striées, permet de s'assurer de l'absence de contamination du fragment avec d'autres types cellulaires (Schmid & Alder 1984).

Ces cellules musculaires striées, après traitement à la collagénase perdent les filaments contractiles et se transdifférencient en d'autres types cellulaires. Dans les trois premiers jours, les myofibriles sont dégradées, les cellules acquièrent une vacuole, des flagelles, et des fibres contractiles typiques des muscles lisses (Schmid 1974b; Schmid & Alder 1984). Cette transformation a lieu en l'absence de cycle cellulaire (Schmid 1975; Schmid & Alder 1984; Alder & Schmid 1987), mais nécessite de la transcription et traduction (Weber *et al.* 1987). Puis ces cellules se divisent en donnant naissance à une même cellule musculaire lisse et une cellule nerveuse synthétisant le peptide FMRF-amide (Fig.35) (Schmid & Alder 1984; Alder & Schmid 1987). La division est nécessaire à l'apparition de cellules nerveuse (Alder & Schmid 1987). Cette dernière ne se divise plus, tandis que la cellule musculaire continue de se diviser, reformant les deux types cellulaires (Fig.35) (Alder & Schmid 1987). Les agrégats de cellules ainsi formés survivent deux à trois semaines (Alder & Schmid 1987).

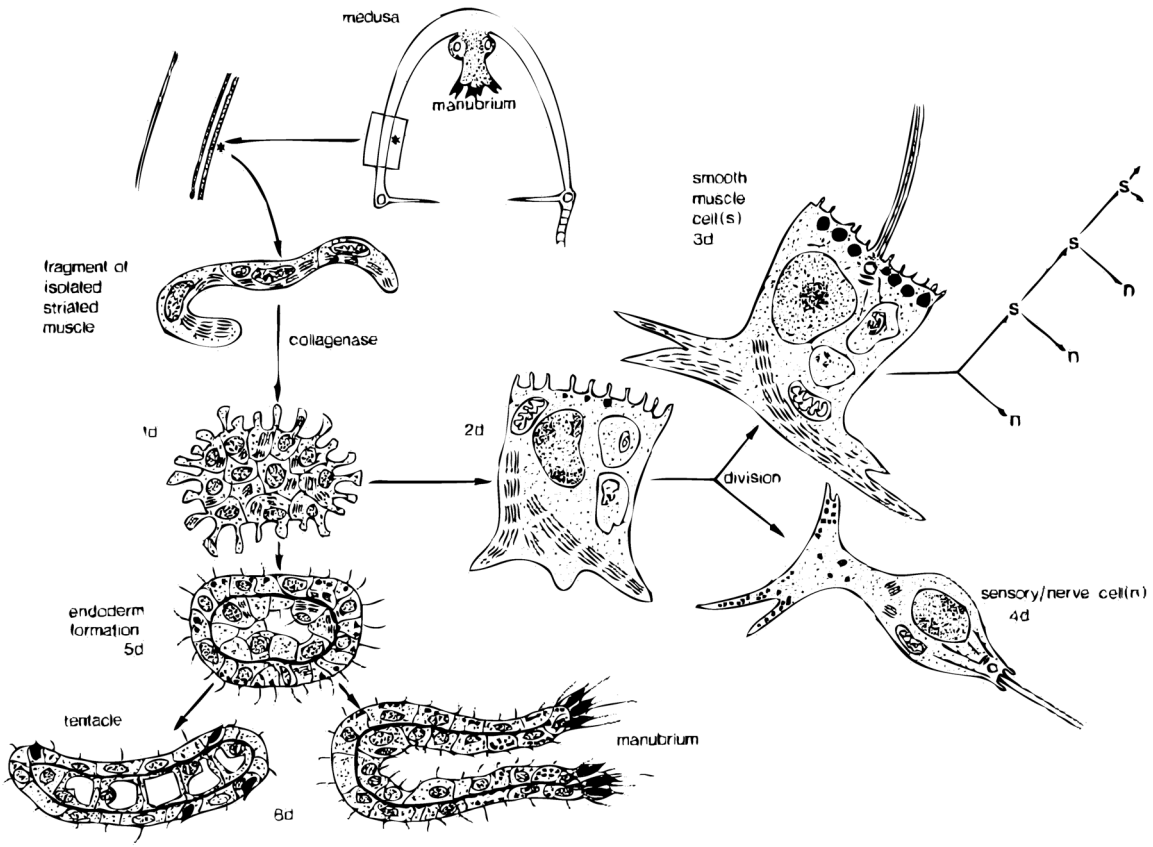


Figure 35 : Transdifférenciation des cellules musculaires striées chez la méduse Podocoryne carnea.
Tiré de Schmid (1988).

Après la première division, 20% des agrégats s'organisent en un endoderme et ectoderme présomptif, séparés par une lame basale. Une deuxième division permet l'acquisition d'un axe proximo-distal visible par une orientation préférentielle de nage grâce aux flagelles, ainsi que l'apparition de nouveaux types cellulaires (cellules glandulaires, digestives, i-cells, nématocytes…) (Fig.35) (Schmid & Alder 1984; Alder & Schmid 1987). La présence de fragments de filaments de muscles striés, absent normalement, dans ces cellules, est une preuve de transdifférenciation (Schmid & Alder 1984). La transformation en un autre type cellulaire est faite sans dédifférenciation. Le régénérat formé prend la forme d'un petit manubrium (Fig.35).

Dans le cas de la combinaison des muscles striés avec l'endoderme, la régénération suit les mêmes étapes : 1) transdifférenciation des muscles striés en muscles lisses, 2) séparation en deux couches distinctes, 3) orientation de l'axe et apparition des différents types cellulaires. Les nouveaux types cellulaires viennent principalement des muscles striés (Schmid 1976; Schmid *et al.* 1982). La proportion de manubrium régénéré est plus élevée et le régénérat est plus gros comparé à la régénération à partir de muscles striés seulement.

Le traitement à la collagénase, déstabilisant la mésoglée, est nécessaire pour déclencher la transdifférenciation chez *Podocoryne* (Schmid 1978). La formation de flagelles sur des agrégats de cellules musculaires striées isolées a été observée chez d'autres méduses (*Sarsia tubulosa*, *Leukartiara octona*, *Bougainvillia sp*., *Stomotoca atra*, *Polyorchis sp* (Schmid 1978)). Les cellules musculaires striées sont capables de migrer sur une ECM hôte (Schmid *et al.* 1993). Dans ces cas-là, la transdifférenciation est également induite par un anticorps monoclonal fait contre l'ECM de méduse, interférant avec les interactions cellules-ECM, ou un traitement de l'ECM au periodate oxydant les carbohydrates et inhibant l'adhésion des cellules à l'ECM (Reber-Müller *et al.* 1994). La transdifférenciation est donc surement causée par la perte de l'attachement de la cellule à son substrat, par blocage des ligands de l'ECM ou des récepteurs membranaires. La transdifférenciation est aussi induite par un traitement à la dihydrocytochalasin, affectant le cytosquelette, ou au TPA activant la proteine kinase C (Kurz & Schmid 1991).

Les cellules musculaires striées, capables de transdifférenciation pourraient permettre la régénération du manubrium *in vivo* chez Podocoryne. Les capacités de transdifférenciation chez les autres méduses sont pour l'instant inconnues.

III.3.3. Restauration de la forme méduse après amputation

Les méduses possèdent un autre type de plasticité intéressante : la capacité d'un fragment à restaurer la forme en cloche typique de la méduse après amputation. Cette capacité a été décrite chez les hydrozoaires *Gonionemus vertens* (Hargitt 1897, 1902; Morgan 1899), *Obelia geniculata* (Neppi 1917) et *Clytia hemisphaerica* (Neppi 1917; Schmid & Tardent 1971).

Des demi-méduses *Gonionemus vertens* contractent tout d'abord la zone de coupure, ce qui va permettre le rapprochement des deux bords du canal circulaire, et reformer en trois à cinq jours

une méduse ayant une forme similaire à l'originale et faisant la moitié de la taille (Fig.36.A) (Hargitt 1897, 1902; Morgan 1899). La forme est restaurée par une réorganisation des tissus restants, et non pas par régénération de la moitié manquante, ce qui est visible par la réduction de la taille de la méduse et la présence uniquement des deux canaux radiaires présents dans la demi méduse. La restauration de la forme est aussi valable pour les quarts de méduses (Fig.36.A) (Morgan 1899; Hargitt 1902). A l'exception de certains fragments de la marge de l'ombrelle, pour lesquels la restauration de la forme est imparfaite (Morgan 1899), des fragments de formes et d'origines diverses (Hargitt 1897) reforment systématiquement une forme circulaire, conduisant Hargitt à supposer la présence d'une propriété intrinsèque de l'ombrelle à reformer la forme méduse, telle qu'une 'prédisposition de cristallisation occulte'.

> "That in a minute fragment […] there seems to be an intrinsic potency to recast itself into the morphological equivalent of the original […]. So marked, indeed, was this tendency that it almost seemed as if there were present some occult organic crystallization prepotency, if such a phrase or comparison be tolerable." (Hargitt 1897)).

Comme *Gonionemus*, un fragment de l'ombrelle de *Clytia* peut restaurer rapidement sa forme méduse (Fig.36.B) (Schmid & Tardent 1971).

Certaines méduses scyphozoaires ont aussi cette capacité de restaurer leur forme méduse. La méduse scyphozoaire *Mastogias papua*, suite à l'ablation de parties de la marge ou amputation d'une moitié, restaure sa forme en cloche. Là encore, les parties manquantes ne sont pas régénérées, mais les parties restantes sont réorganisées, ce qui est visible par la diminution de la taille de l'ombrelle (Okada 1927).

La restauration de la forme méduse se produit aussi au stade juvénile chez les scyphozoaires. Il a été montré chez *Aurelia aurita* (Abrams *et al.* 2015), que l'éphyrule après amputation est capable de rétablir sa symétrie radiaire par un processus appelé symétrisation (Fig.37.A). Les bras manquants ne sont pas régénérés, mais les bras restants sont réarrangés, rétablissant ainsi la symétrie radiaire. La réorganisation des tissus est indépendante de la prolifération, de l'apoptose et de la régénération des muscles. Elle dépend probablement des forces générées par la contraction des muscles et à la réponse élastique de la mésoglée (Fig.37.B). En effet, elle est bloquée par l'inhibition de la contraction musculaire et accélérée par l'augmentation de la fréquence de contraction (Abrams *et al.* 2015). Le phénomène de symétrisation des éphyrules a aussi été observé chez d'autres scyphozoaires : *Chrysaora pacifica*, *Mastigias sp*., *Cotylorhiza tuberculata* (Abrams *et al.* 2015).

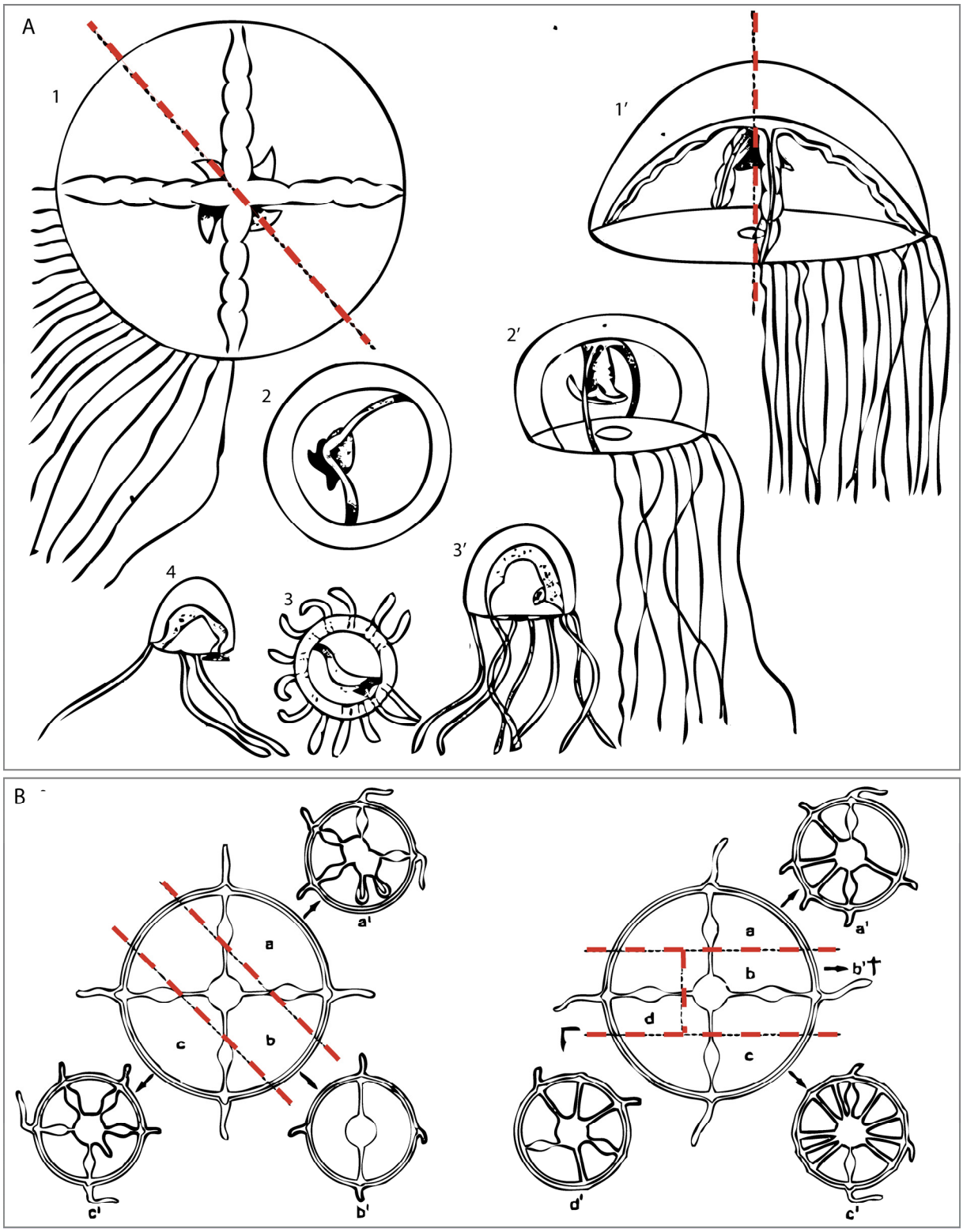


Figure 36 : Restauration de la forme chez les méduses *Gonionemus* et *Clytia.*
(A) Dessins de quelques découpes de méduses réalisées par Morgan. (1) et (1') Plan de coupe en pointillés rouges. (2) et (2') Demi-méduse ayant restauré la forme circulaire. (3) et (3') Médusoïde issu de quarts de méduses. (4) Medusoïde issu d'une portion plus petite qu'un quart. Adapté de Morgan (1901).
(B) Diagrammes de coupes réalisées chez *Clytia hemisphaerica* et de la restauration de la forme et des organes régénérés. Plan de coupe en pointillés rouges.
Adapté de Schmid & Tardens (1971).

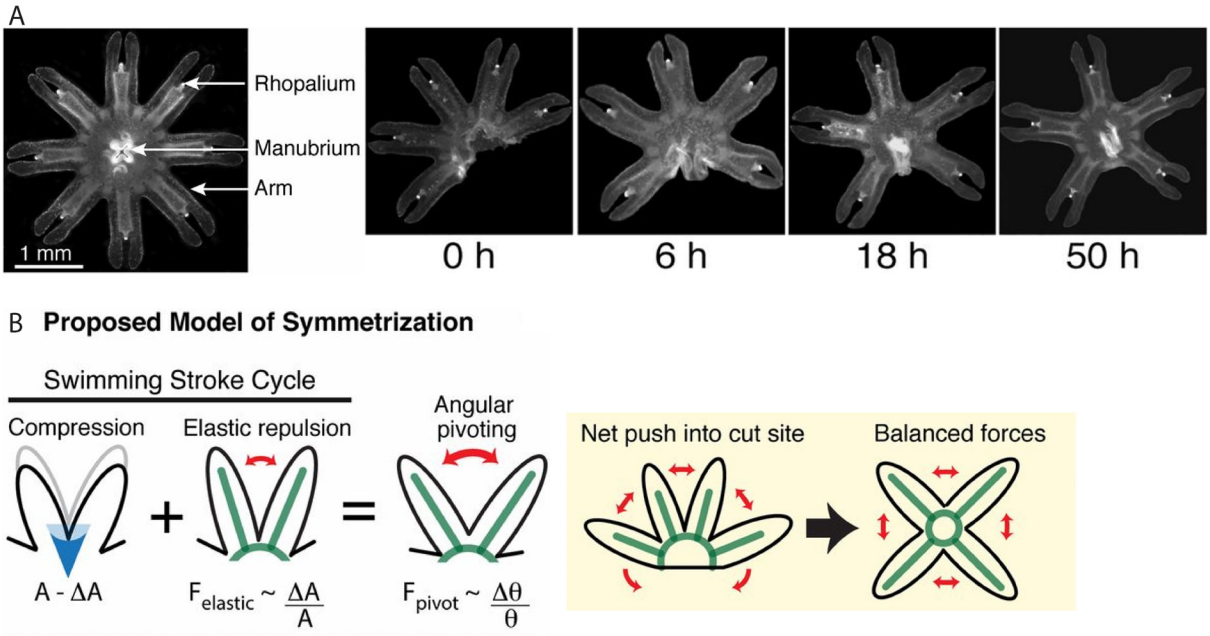


Figure 37 : Symétrisation chez l'éphyrule d'*Aurelia aurita.*
(A) Ephyrule entière et restauration de la symétrie radiaire suite à l'amputation de trois bras.
(B) Modèle de symétrisation proposé par les auteurs. Les mouvements de nage provoquent des forces de compression pendant la contraction et de répulsion sur les bras pendant la réponse élastique de la mésoglée. Après amputation, ces forces entrainent le pivot des bras vers la zone de moindre résistance qui est la zone de coupure. Les bras sont alors repoussés jusqu'à restauration de la symétrie et de l'équilibre des forces.
Tiré de Abrams *et al.* (2015).

Une fois la forme restaurée, certains organes manquants sont régénérés. Il semble exister une hiérarchie dans la régénération des organes. En effet, chez *Clytia* le manubrium est toujours régénéré en premier (Schmid & Tardent 1971). *Gonionemus* aussi régénère son manubrium si absent, à la même place que le manubrium d'origine (Hargitt 1902). Les hydroméduses réussissent à régénérer un seul manubrium, tandis que chez les méduses scyphozoaires comme *Mastogias papua*, un second manubrium est parfois régénéré (Okada 1927).

Dans tous les cas de restauration de la forme méduse, il est intéressant de noter que la symétrie originale, tétraradiaire chez *Obelia*, *Clytia* et *Gonionemus*, n'est jamais restaurée (Fig.36). Les canaux radiaires manquants du fragment sont rarement régénérés. Dans le cas des demi-méduses *Gonionemus*, aucun n'a été régénéré dans les expériences d'Hargitt (1897) et Morgan (1899), tandis qu'Hargitt (1902) a observé la régénération d'un seul canal supplémentaire. Chez *Clytia*, certains sont régénérés et partent du manubrium régénéré (Schmid & Tardent 1971), produisant des méduses tri- penta- ou hexa-radiées. Chez l'ephyrule d'*Aurelia* aussi, la méduse adulte issue d'une éphyrule amputée qui a symétrisé conserve sa symétrie imparfaite, visible au nombre plus faible de bras oraux (Abrams *et al.* 2015). Suite à ses observations de méduses ayant restauré leur forme après dissection mais conservant un nombre de canaux radiaires inférieur aux méduses non disséquées, Hargitt (1897) en conclut que seule la forme en cloche,

ainsi que la présence d'un manubrium semblent être vraiment importante pour la survie de la méduse.

III.3.4. Remodelage, régénération et cicatrisation chez les méduses

Suite à une blessure, une réponse commune à tous les organismes est la cicatrisation, permettant d'isoler rapidement le milieu intérieur. La cicatrisation ne permet pas la restauration de la structure et de la fonction de l'organe perdu (voir section I.1.1 de l'Introduction).

Chez les méduses la première réponse à une blessure est aussi la cicatrisation. Suite à une blessure superficielle, touchant uniquement la couche de cellules, le processus de cicatrisation est très efficace, effaçant rapidement toute trace de blessure et restaurant la fonction du tissu. Chez *Aurelia aurita*, une blessure dans la couche musculaire est résorbée en un jour, restaurant la continuité de la contractilité perdue suite à la blessure (Romanes 1878). Chez *Polyorchis* une blessure dans la couche musculaire striée est refermée en 10h en l'absence de prolifération par migration des cellules épitheliales vers le centre de la blessure grâce à des lamellipodes. Pendant la migration, les fibres musculaires se dissocient, ce qui entraine la perte de la contractilité des cellules. Ces dernières se redifférencient en cellules musculaires contractiles en 24 à 48h (Lin *et al.* 2000). Chez *Clytia*, la cicatrisation de la couche de cellules de l'exombrelle dépend également de migrations grâce à des lamellipodes si la membrane basale est intacte. En revanche, une membrane basale abimée déclenche la cicatrisation par un mécanisme de 'purse string'. Les deux processus dépendent chez *Clytia* de la contraction d'un câble supracellulaire d'actomyosin (Kamran *et al.* 2017). L'étape de cicatrisation chez les méduses est uniquement la fermeture rapide de la couche de cellules sur la mésoglée, la méduse ne change pas de forme.

Dans le cas de la restauration de la forme après amputation, la partie manquante de l'ombrelle, ou les bras manquants ne sont pas régénérés. De plus les organes manquants ne sont pas systématiquement régénérés, une demi méduse continuant à vivre avec la moitié seulement de ses organes (*Clytia* (Schmid & Tardent 1971) ; *Gonionemus* (Hargitt 1902); *Aurelia aurita* (Abrams *et al.* 2015)). En 1897, Hargitt décrit bien la restauration de la forme méduse chez *Gonionemus* après bissection comme un rétablissement de la forme, et non comme de la régénération.

> "In this case the restoration was somewhat peculiar. It would seem to be a sort of recovery of form and function rather than regeneration in the usual sense." (Hargitt 1897)

La restauration de la forme méduse permet donc la restauration de la fonction de nage, mais pas de la forme originale. De plus, la symétrie originale tétraradiaire n'est jamais restaurée. On ne peut donc pas parler de régénération. Cependant, le processus va plus loin que de la simple cicatrisation. La méduse change de forme, entrainant nécessairement une réorganisation profonde de la mésoglée, qui doit elle aussi changer de forme. De plus, les muscles aussi doivent être réorganisés pour adapter leur orientation à la nouvelle forme. Comme l'a observé Morgan en 1899, des processus complexes doivent intervenir dans la restauration de la forme :

> "It is puzzling to determine whether the medusa form assumed by the pieces is simply the form that necessarily results after the fusion of the cut edges, or whether the process includes something more than this." (Morgan 1899)

Hargitt, Morgan et Okada ont séparés les processus de régénération et restauration de la forme en deux catégories distinctes. Pour Hargitt, d'après ses observations sur la méduse *Gonionemus*, la restauration de la forme méduse dépend d'un réarrangement des tissus existants, tandis que la régénération du manubrium, des tentacules et des canaux repose sur la génération de nouveaux tissus (Hargitt 1899). Morgan (1899) complète les observations d'Hargitt sur *Gonionemus*. Pour lui, suite à une blessure il y a tout d'abord un processus appelé 'healing' permettant de restaurer la forme en cloche, puis la régénération, ou non, d'organes manquants. Il observe que les quarts et demi méduses ont une forte capacité de 'healing', mais une faible capacité de régénération puisque ces dernières rétablissent la forme en cloche, mais régénèrent uniquement le manubrium. L'organisation de départ est perdue. Quant à Okada (1927) il observe les mêmes phénomènes de restauration de la forme méduse et régénération chez le scyphozoaire *Mastigias papua*, et les sépare en 'faculté régulatrice' assurant la restauration de la forme, et 'faculté réparatrice' permettant la régénération des organes.

La restauration de la forme méduse est reconnue depuis la fin des années 1890 comme un processus à part entière, différent de la régénération, et étant plus que de la cicatrisation. Il s'agit bien d'un processus de réparation des tissus, comme ceux décrits dans la section I.1.2. de l'Introduction. Dans la suite de la thèse, il sera appelé remodelage.

IV. La méduse *Clytia hemisphaerica* comme modèle d'étude de la régénération

Clytia hemisphaerica (Linnée 1767), anciennement appelée *Phialidium hemisphaericum* (Bodo & Bouillon 1968) ou encore *Campanularia johnstoni* (Schmid & Tardent 1971; Schmid *et al.* 1976), est une méduse avec une distribution mondiale, et est présente dans la rade de Villefranche-sur-mer. Il s'agit d'une hydroméduse, faisant partie de la classe des hydrozoaires, de l'ordre des Leptothecata, aussi appelés les leptoméduses. Ces dernières sont caractérisées par l'enveloppe chitineuse (appelée thèque) protégeant les polypes, et la forme aplatie des méduses. Dans toute la thèse, elle sera appelée *Clytia*.

IV.1. Cycle de vie de *Clytia*

Clytia présente un cycle de vie typique d'hydrozoaire, alternant entre la larve planula, le polype colonial benthique et la méduse pélagique (Fig.38). La ponte a lieu tous les jours, deux heures après la réception d'un signal lumineux suivant une période d'obscurité (Amiel *et al.* 2010). L'œuf se divise par clivages jusqu'à former une blastula composée d'une seule couche de cellules. La gastrulation a lieu par ingression de cellules unipolaires (Byrum 2001) formant une larve planula avec deux couches de cellules qui s'allonge selon l'axe oral-aboral. Au bout de 48h, l'ectoderme et l'endoderme sont différenciés et séparés par une fine couche de mésoglée. La planula nage vers le pôle aboral grâce aux cellules ectodermiques ciliées, ayant des cils orientés le long de l'axe oral-aboral par l'action de la voie de signalisation Wnt/PCP (Momose *et al.* 2012). Le côté oral est celui qui donnera l'hypostome du polype (Freeman 2005). La larve ne se nourrit pas, elle est lécitotrophe. Elle a peu de types cellulaires (nématocytes, cellules nerveuses : sensorielles et ganglionnaires, cellules glandulaires et i-cells) (Bodo & Bouillon 1968).

Après trois jours, la larve se fixe par son pôle aboral sur un substrat. La métamorphose est induite par un film bactérien dans les conditions naturelles, ou par le neuropeptide GLW-amide au laboratoire (Piraino *et al.* 2011; Takahashi & Hatta 2011), formant un polype primaire avec une forme cylindrique et des tentacules lui permettant de capturer des proies à son extrémité orale (Fig.38). Un stolon se développe sur le substrat à partir duquel d'autres polypes se forment par bourgeonnement latéral. Les polypes ont peu de types cellulaires. Ils sont composés de cellules myoepithéliales ectodermiques et endodermiques, de cellules nerveuses, de cnidocytes, de cellules glandulaires différenciées et d'i-cells localisées dans le stolon. La colonie grandit en permanence par bourgeonnement. Elle est donc considérée comme potentiellement immortelle, les vieilles parties mourant étant remplacées par les nouvelles. Les individus de la colonie partagent le système gastrovasculaire qui est continu dans le stolon, ce qui permet la spécialisation des zoïdes en deux types : les gastrozoïdes assurant la capture des proies et leur digestion, et les gonozoïdes produisant des méduses par bourgeonnement latéral (Fig.38).

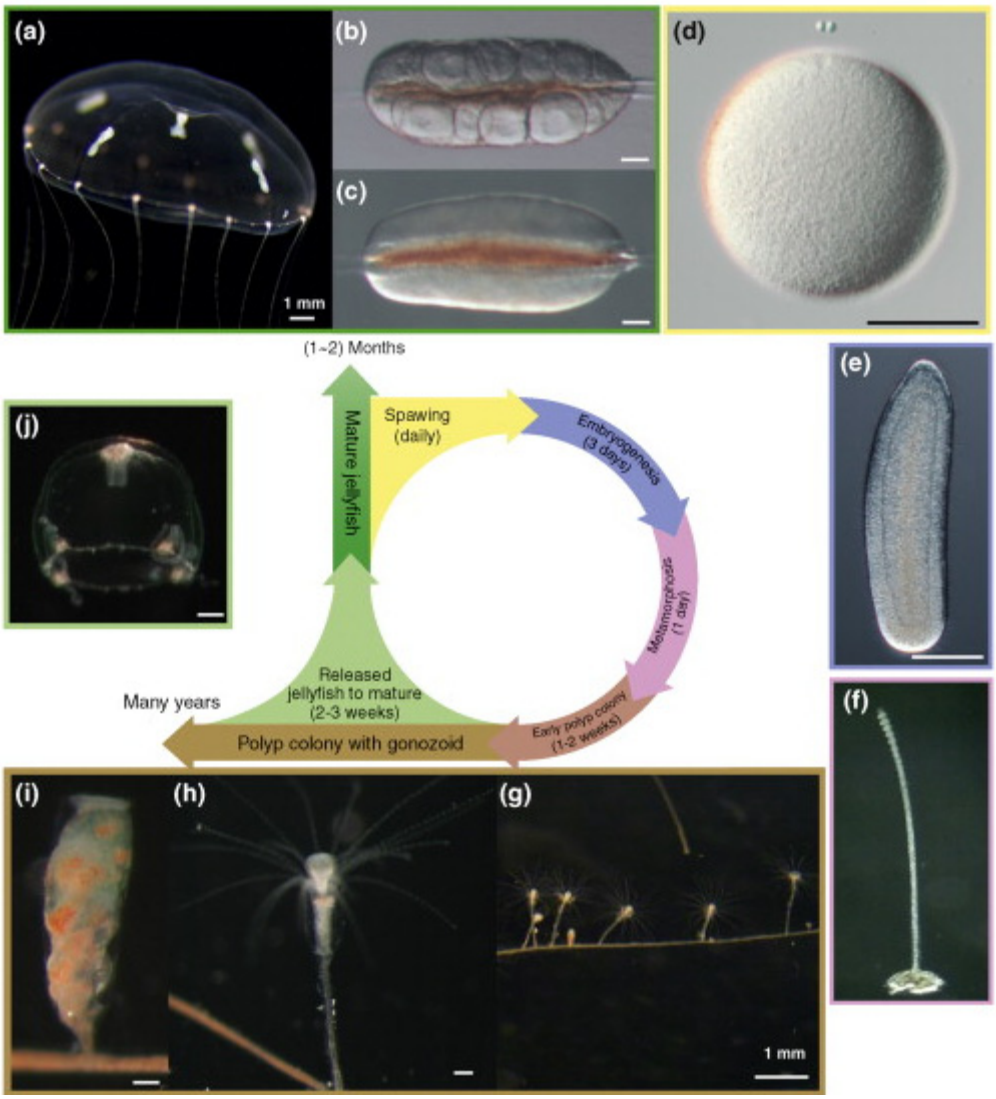


Figure 38 : Cycle de vie de la méduse *Clytia hemisphaerica.*
Tiré de Houliston *et al.* (2010).

Les méduses sont produites de façon clonale, et sont donc toutes génétiquement identiques. Le bourgeonnement commence par une excroissance de l'ectoderme et de l'endoderme de la paroi du polype, puis un groupe de cellules de l'ectoderme distal délamine, formant l'entocodon qui va donner naissance aux muscles striés de la sous-ombrelle de la méduse. L'ectoderme forme l'exombrelle, l'extérieur du vélum et l'ectoderme des tentacules, tandis que l'endoderme devient le système gastrovasculaire et l'épithélium interne des tentacules (Kraus *et al.* 2015). Une fois formée, la méduse grandit et se retrouve pliée à l'intérieur du gonozoïde. Elle se déplie complètement une fois relâchée. Les méduses sont gonochoriques (Fig.38). Le sexe dépend de la température pour les jeunes colonies de polype : des colonies élevées à 24°C et 15°C produiront respectivement surtout des femelles ou surtout des mâles (Carré & Carré 2000). Les méduses sont matures au bout de deux à trois semaines en fonction de la quantité de nourriture. Elles peuvent vivre environ deux mois et atteignent une taille d'environ 1,5 cm de diamètre.

IV.2. Morphologie de la méduse

La méduse a une symétrie tétraradiaire avec l'axe oral-aboral comme unique axe de symétrie. L'ombrelle en forme de cloche est composée de deux couches, l'exombrelle et la sous-ombrelle, séparées par la mésoglée (Fig.39.A). Au centre de l'ombrelle, du côté oral se situe le manubrium, l'organe digestif regroupant la bouche en forme de croix connectée à la cavité gastrique à la base. Les nutriments sont distribués dans le reste de l'ombrelle par quatre canaux radiaires partant du manubrium jusqu'à la marge de l'ombrelle, reliés au canal circulaire localisé à la marge. Quatre gonades sont localisées sur les canaux radiaires. Les bulbes tentaculaires, des excroissances produisant les tentacules, sont localisés sur le canal circulaire. Quand la méduse est libérée du gonozoïde, elle a quatre bulbes primaires localisés à l'intersection des canaux radiaires et circulaire. Des bulbes se forment au fur et à mesure de la croissance jusqu'à atteindre un nombre de 32. La marge est la zone de croissance de l'ombrelle (Schmid *et al.* 1974).

La méduse se déplace par contraction de l'ombrelle grâce à la contraction des muscles striés, orientés de façon circulaire à la marge de l'ombrelle (Fig.39.C). Ceux-ci sont uniquement présents à la périphérie de l'ombrelle, jusqu'aux gonades. L'efficacité de la propulsion est augmentée par le vélum. Les muscles lisses, situés en surface et orientés de façon radiaire, permettent les mouvements de replis de l'ombrelle, pour rapporter la nourriture à la bouche par exemple (Fig.39.C). Ils recouvrent la sous-ombrelle complète. Les mouvements de la méduse sont coordonnés par un système nerveux diffus dans la sous-ombrelle et sur les organes, et condensé en deux anneaux nerveux à la marge, l'anneau externe intégrant les informations sensorielles, l'anneau interne coordonnant les contractions (Fig.39.B) (Satterlie 2002; Houliston *et al.* 2010). Des organes sensoriels, les statocystes sont intercalés par deux entre les bulbes. Ils permettent à la méduse de sentir l'orientation dans la colonne d'eau et se composent d'une vésicule avec des parois internes ciliées et d'un statolite calcaire.

Chez la méduse, les i-cells (voir section III.1.2. de l'Introduction) sont présentes dans les trois organes principaux : le manubrium, les gonades (Leclère *et al.* 2012) et les bulbes tentaculaires

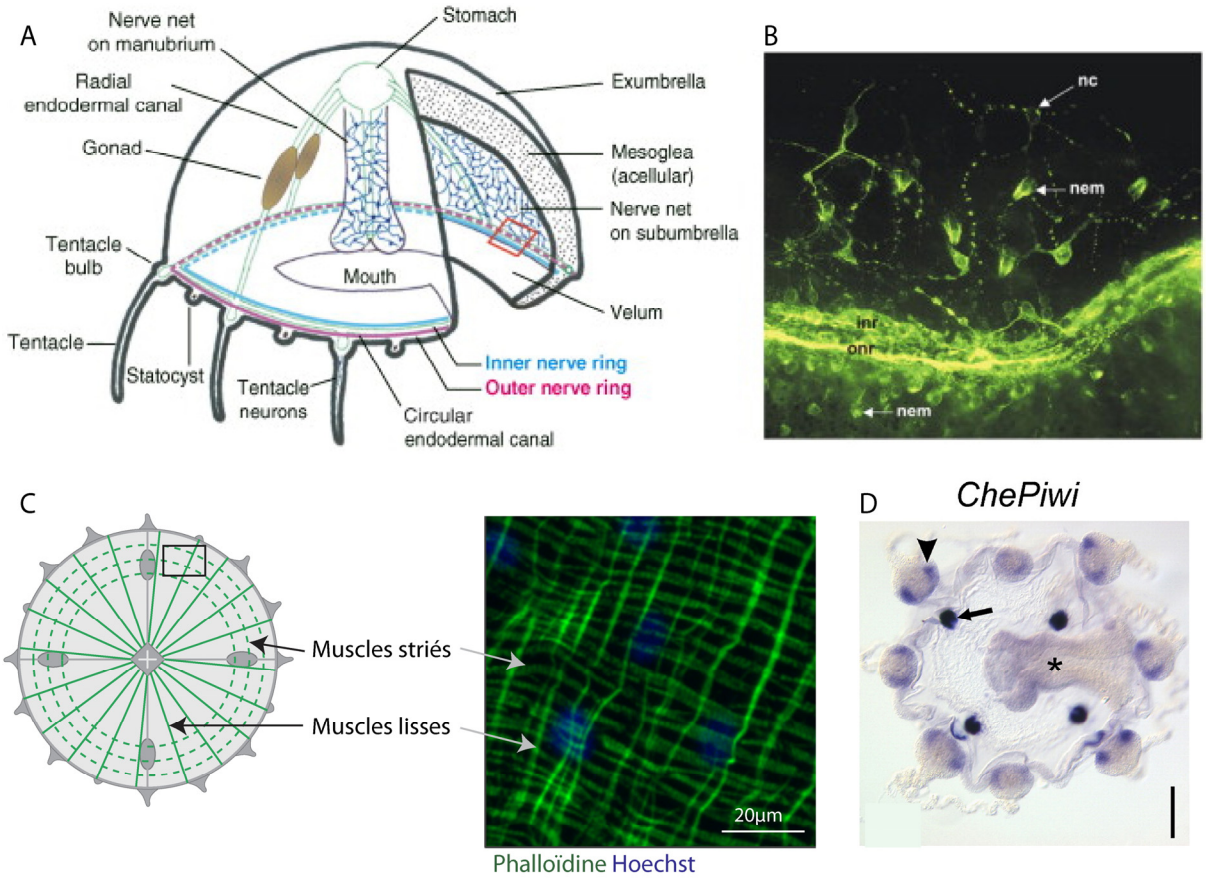


Figure 39 : Morphologie de la méduse *Clytia*
(A) Schéma des principaux organes de la méduse
(B) Anneaux nerveux visualisés par immunohistologie avec l'anticorps anti tubuline tyrosylée. Abréviations : inr : anneau nerveux interne, nc : cellule nerveuse, nem : nématocyte, onr : anneau nerveux externe
(C) Schéma et marquage de l'actine à la phalloïdine montrant l'organisation des muscles lisses et striés.
(D) Localisation des pools de cellules souches visualisées par ISH *Piwi*
(A) et (B) Tiré de Houliston *et al.* (2010), (D) tiré de Leclère *et al.* (2012).

(Fig.39.D) (Denker *et al.* 2008). Ceux-ci sont des zones de forte prolifération (Denker *et al.* 2008; Coste *et al.* 2016). Les i-cells peuvent être détectées chez *Clytia* grâce aux marqueurs *Nanos1, Piwi, Vasa, PL10*, et apparaissent au cours du développement de la larve (Leclère *et al.* 2012). L'ARN maternel *Nanos1* et *Piwi* est concentré dans l'œuf près du pronucléus femelle au pôle animal ; puis pendant les stades de clivage dans les blastomères venant du pôle animal. Au stade gastrula précoce, un cluster de cellules exprimant *Nanos* et *Piwi* se forme au pôle oral, au site d'ingression. La majorité se retrouve dans la moitié orale dans l'endoderme de la planula puis se disperse. Dans la planula âgée de trois jours, les cellules *Nanos*+ et *Piwi*+ se situent dans la couche endodermiques différenciée, et ont une forme typique d'i-cells (forme ronde et grand ratio nucléo-cytoplasmique) (Leclère *et al.* 2012). Les marqueurs *Nanos* et *Piwi* ne sont pas exprimés exclusivement dans les i-cells mais aussi dans précurseurs des dérivés somatiques comme les nématocytes (Denker *et al.* 2008) et les cellules germinales. Comme chez l'hydre, les i-cells donnent naissance aux nématocytes, cellules nerveuses, cellules glandulaires et aux gamètes. Pour l'instant seule la nématogenèse est bien caractérisée chez *Clytia*. Elle a lieu dans l'ectoderme des bulbes tentaculaires : les stades successifs des nématoblastes progressent de la zone proximale à la zone distale où commence le tentacule. Les i-cells sont présentes dans la région proximale, et les gènes correspondants aux différents stades de la nématogenèse sont exprimés le long de l'ectoderme du bulbe (Denker *et al.* 2008).

IV.3. *Clytia* comme modèle de biologie du développement

Clytia hemisphaerica est utilisée comme organisme modèle de biologie du développement depuis 2005 (Houliston *et al.* 2010). Quelques lignées ont été établies par des autocroisements successifs à partir de méduses prélevées dans la rade de Villefranche-sur-Mer en 2002, dont une lignée femelle Z4B et une lignée male Z10 utilisées pour étudier le développement embryonnaire et la méduse, ce qui permet d'étudier des individus ayant le même génome (description des lignées – (Leclère *et al.* 2019)). Le cycle de vie est entièrement complété au laboratoire en trois mois.

Avant les années 2000, *Clytia hemisphaerica* avait fait l'objet de quelques études. Par exemple, Bodo et Bouillon (1968) ont réalisé une description du développement et des types cellulaires de la larve ; et Schmid *et al.* (1971, 1976) ont étudié ses capacités de réparation et de régénération. L'espèce américaine *Clytia gregaria*, appelée à l'époque *Phialidium gregarium,* a été plus utilisée, notamment comme modèle pour l'embryologie expérimentale par Gary Freeman (Freeman 1981a, b, 2005; Freeman & Ridgway 1987; Thomas *et al.* 1987).

La méduse *Clytia* a été choisie comme modèle d'étude pour plusieurs raisons. Sa position phylogénétique aide à étudier l'évolution de caractères chez les bilatériens. *Clytia* est relativement facile à cultiver au laboratoire. Les organes de la méduse et les œufs sont transparents, ce qui rend possible l'imagerie sur des échantillons fixés et vivants. La fécondation est externe et la ponte contrôlable par la lumière.

Tous les stades de développement, ainsi que les œufs non fécondés sont accessibles, ce qui rend possible les approches de perturbation de fonction de gènes par injection dans les oocytes de

MO pour une perte de fonction, ou d'ARN pour gain de fonction (Momose & Houliston 2007; Momose *et al.* 2008; Amiel *et al.* 2009). L'efficacité des MO est probablement due au faible taux de polymorphisme des lignées de méduses cultivées au laboratoire. Ces approches de perturbation de fonction de gènes ont permis de mettre en évidence les mécanismes permettant l'établissement de la polarité chez la larve de *Clytia*. Au cours de l'oogenèse, des déterminants maternels sont localisés d'une façon précise dans l'œuf : *Wnt3* et *Fzl1* au pôle animal qui formera l'extrémité orale de la planula, *Fzl3* au pôle végétal qui formera l'extrémité aborale. La disposition des déterminants maternels conduit à l'activation de la voie Wnt canonique dans le futur territoire oral (Momose & Houliston 2007; Momose *et al.* 2008).

Les gonades de *Clytia* sont transparentes, contiennent différents stades de croissance des oocytes, et après isolation, conservent les cycles lumière/obscurité de maturation et libération des œufs (Amiel *et al.* 2009). Ceci permet l'étude de mécanismes conservés pendant la gamétogenèse. Mos est une kinase conservée, régulatrice de la méiose. Quatre orthologues ont été identifiés chez *Clytia*. Par injection de MO et d'ARN dans les oocytes, Amiel *et al.* (2009) ont pu déterminer le rôle de *Mos1* au cours de la maturation des œufs dans la régulation de la formation et de la position du fuseau méiotique, et dans l'émission du globule polaire. Chez *Clytia*, *Mos1* est également indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire post-méiotique, ce qui a été décrit chez d'autres modèles bilatériens et représente probablement une fonction ancestrale de cette kinase (Amiel *et al.* 2009).

Le génome ainsi que des transcriptomes de différentes phases du cycle de vie sont disponibles (Leclère *et al.* 2019), ce qui facilite l'établissement de lignées mutantes ayant une perte de fonction par CRISPR/Cas9. Cette approche a permis l'étude de la réception du signal lumineux déclenchant la maturation des œufs et la ponte deux heures après une transition nuit/jour. Un signal lumineux entraine la libération d'un neuropeptide, appelé maturation inducing hormone (MIH), synthétisé par des cellules neurales de l'ectoderme de la gonade (Quiroga Artigas *et al.* 2018). Le signal lumineux est capté par l'Opsin9, localisée dans l'ectoderme de la gonade. Une lignée de méduses générées par CRISPR/Cas9, pour laquelle l'Opsin9 est mutée, est incapable de recevoir le signal lumineux. Les œufs ne terminent pas la maturation après une transition nuit/jour, ce qui est réversible par traitement avec la MIH (Quiroga Artigas *et al.* 2018).

V. Objectifs

La méduse hydrozoaires *Clytia hemisphaerica*, utilisée comme modèle de biologie du développement est capable de régénérer ses organes après ablation, et de restaurer sa forme méduse après amputation. La régénération de l'organe digestif, le manubrium, est particulièrement intéressante car il regroupe une grande variété de types cellulaires, il s'agit du point central de la symétrie radiaire et il est homologue avec l'hypostome de l'hydre, permettant des comparaisons des mécanismes. Le but global de ma thèse est de réaliser une caractérisation au niveau cellulaire et moléculaire de la régénération du manubrium chez la méduse *Clytia hemisphaerica*. Les travaux réalisés permettent d'établir la méduse *Clytia* comme modèle de régénération et servent de base pour des études futures.

La thèse a cinq objectifs :

1) Caractériser la réponse à la blessure chez la souche Z4B de méduse *Clytia* utilisée au laboratoire. Grace à différentes coupes, j'ai déterminé les potentialités et les limites des capacités de régénération de la souche Z4B. J'ai pu également observer les trois phases successives ayant lieu après une blessure (cicatrisation, remodelage et régénération), qui ont lieu aussi après ablation du manubrium (Chapitre 1).

2) Identifier des sources de cellules alimentant la régénération du manubrium. J'ai étudié plus particulièrement le rôle de la prolifération cellulaire et de la migration de cellules venant de la gonade (Chapitre 1).

3) Identifier un/des mécanisme(s) impliqués dans la détermination de la position du manubrium au cours de la régénération. Mon étude s'est focalisée principalement sur le rôle des éléments structuraux (Chapitre 1).

4) Réaliser une description de la morphologie et des types cellulaires du manubrium et de leur organisation (Chapitre 2).

5) Identifier des gènes candidats impliqués dans les premiers stades de la régénération (entre 0 et 48hpd) par une approche transcriptomique. Le transcriptome a permis d'identifier à la fois des marqueurs de différents types cellulaires du manubrium, et les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la régénération (Chapitre 2).

CHAPITRE 1

Processus de régénération et remodelage chez la méduse *Clytia*

I. Introduction : *Clytia* comme modèle de régénération

I.1. Intérêt de la méduse *Clytia* pour l'étude de la régénération

Dans l'introduction générale, nous avons vu que les grandes capacités de régénération des cnidaires sont connues depuis longtemps. Ces études de la régénération se sont surtout portées sur les formes polypes des cnidaires et les méduses ont souvent été considérées comme ayant des capacités de régénération moindres. Des études réalisées depuis le début des années 1900 montrent que ce n'est pas le cas.

Les capacités de régénération de la méduse *Clytia hemisphaerica* ont été documentées par Schmid & Tardent (1971) et Schmid (1974a). Suite à l'amputation d'une partie de l'ombrelle, cette dernière est capable de restaurer sa forme méduse grâce à un processus de remodelage : la symétrie radiaire est rétablie par une réorganisation des parties restantes après amputation, et non pas par régénération. Dans un second temps, certains des organes manquants sont régénérés (Fig.36) (voir section III.3.2 de l'introduction) (Schmid & Tardent 1971; Schmid 1974a). La réponse à la blessure chez *Clytia* permet donc d'étudier deux processus de réparation différents, et de les comparer au sein de la même espèce.

Les cnidaires sont généralement considérés comme n'ayant pas d'organes (ex. "Cnidarians lack well developed organs" (Pierobon 2012)). Cependant les méduses possèdent des structures remplissant bien les critères des organes. Chez *Clytia*, le manubrium, les gonades et les bulbes tentaculaires sont bien des structures réalisant une fonction précise (respectivement la digestion, la production de gamètes et la production de tentacules), avec une organisation spatiale et des types cellulaires distincts (cellules glandulaires, lignée germinale, nématocytes et muscles du tentacule) (Neumann 2017). De plus ces organes sont complètement autonomes, ils continuent à remplir leur fonction même une fois isolés de la méduse. La maturation des œufs et la ponte ont lieu dans des gonades isolées et placées dans une boite de pétri (Amiel & Houliston 2009; Quiroga Artigas *et al.* 2018). Un manubrium isolé reste capable de digérer des proies (décrit chez *Aglantha digitale* (Mackie 2003), aussi observé chez *Clytia* au cours de mes expériences). La méduse *Clytia* est capable de régénérer ces trois organes principaux (Schmid & Tardent 1971; Schmid 1974a). Il est donc possible d'ôter totalement un des organes et d'étudier sa régénération de novo, ce qui est impossible chez le polype.

Chez la méduse *Clytia*, les i-cells sont localisées principalement dans ces organes et participent constamment au renouvellement des différents types cellulaires (Denker *et al.* 2008; Leclère *et al.* 2012). Le manubrium, les bulbes tentacules, et dans une moindre mesure les gonades sont des zones de forte prolifération cellulaire (Denker *et al.* 2008; Coste *et al.* 2016). La localisation spatiale des i-cells en différents pools, dans des organes régénérant après ablation, permet d'étudier les interactions entre ces pools. Il est possible de suivre la dynamique des i-cells grâce aux marqueurs *Nanos1*, *Piwi*, *Vasa* et *PL10* (Fig.39). La grande plasticité de la méduse *Clytia*, alliée à la présence d'organes et de pools de cellules souches spatialement séparés, permet

d'étudier la réponse des i-cells lors de la régénération des organes grâce à des approches de coupes et de greffes.

Enfin les mécanismes de patterning des méduses sont encore mal connus. La méduse *Clytia* a une symétrie tétraradiaire organisée en quatre quadrants disposés autour du manubrium en position centrale. Chacun contient un canal radiaire portant une gonade, une portion de canal circulaire avec, selon l'âge, un à quatre bulbes tentaculaires, ainsi qu'un quart du manubrium. D'après les expériences de Schmid &Tardent (1971), la réponse à la blessure de *Clytia* permet la restauration de la forme circulaire et de la position centrale du manubrium, mais pas de l'organisation des quatre quadrants. Etudier la restauration de la forme et la régénération des organes permettrait d'en savoir plus sur le système de patterning général des méduses.

La régénération chez *Clytia* est donc informative sur plusieurs processus de régénération pouvant être comparée aux autres espèces : la réponse à la blessure comprenant régénération et remodelage, la dynamique des cellules souches et les mécanismes de patterning.

1.2. Capacités de régénération des méduses Z4B

Les expériences de régénération présentée dans cette thèse ont toutes été réalisées sur la souche Z4B, une des souches de méduses femelles utilisées au laboratoire. La souche Z4B est issue de deux auto-croisements successifs d'une première souche Z obtenue par fécondation de méduses prélevées dans la rade de Villefranche-sur-Mer en 2002 (Houliston *et al.* 2010). Les méduses sont produites de façon clonale par bourgeonnement des polypes et sont donc génétiquement identiques.

Les expériences de régénération faites par Schmid *et al.* dans les années 1970 sur les méduses *Clytia* ont été réalisées sur des méduses issues du plancton collectées en méditerranée à Banyuls et Villefranche sur Mer (Schmid & Tardent 1971; Schmid 1974a). Des dissections de méduses réalisées au laboratoire avant mon arrivée confirment que la souche Z4B a bien les mêmes capacités de régénération. *Clytia* est capable de régénérer les principaux organes (manubrium, bulbes et gonades) après ablation, et un fragment de méduse est capable de restaurer sa forme circulaire. La seule différence que j'ai pu observer entre la souche Z4B et les méduses utilisées par Schmid *et al.* concerne la régénération de manubrium à partir d'un fragment interradiaire (quart sans canal radiaire). Chez les méduses Z4B, la présence d'un canal radiaire est indispensable à la régénération du manubrium, qui est régénéré sur ce dernier ; alors que Schmid *et al.* décrivent en détail la régénération de manubrium dans des quarts interradiaires, certains même sans canal circulaire (Fig.40) (Schmid & Tardent 1971; Schmid 1974a; Schmid *et al.* 1976). La différence pourrait être due à la souche de méduses, à la taille ou encore à la différence d'âge.

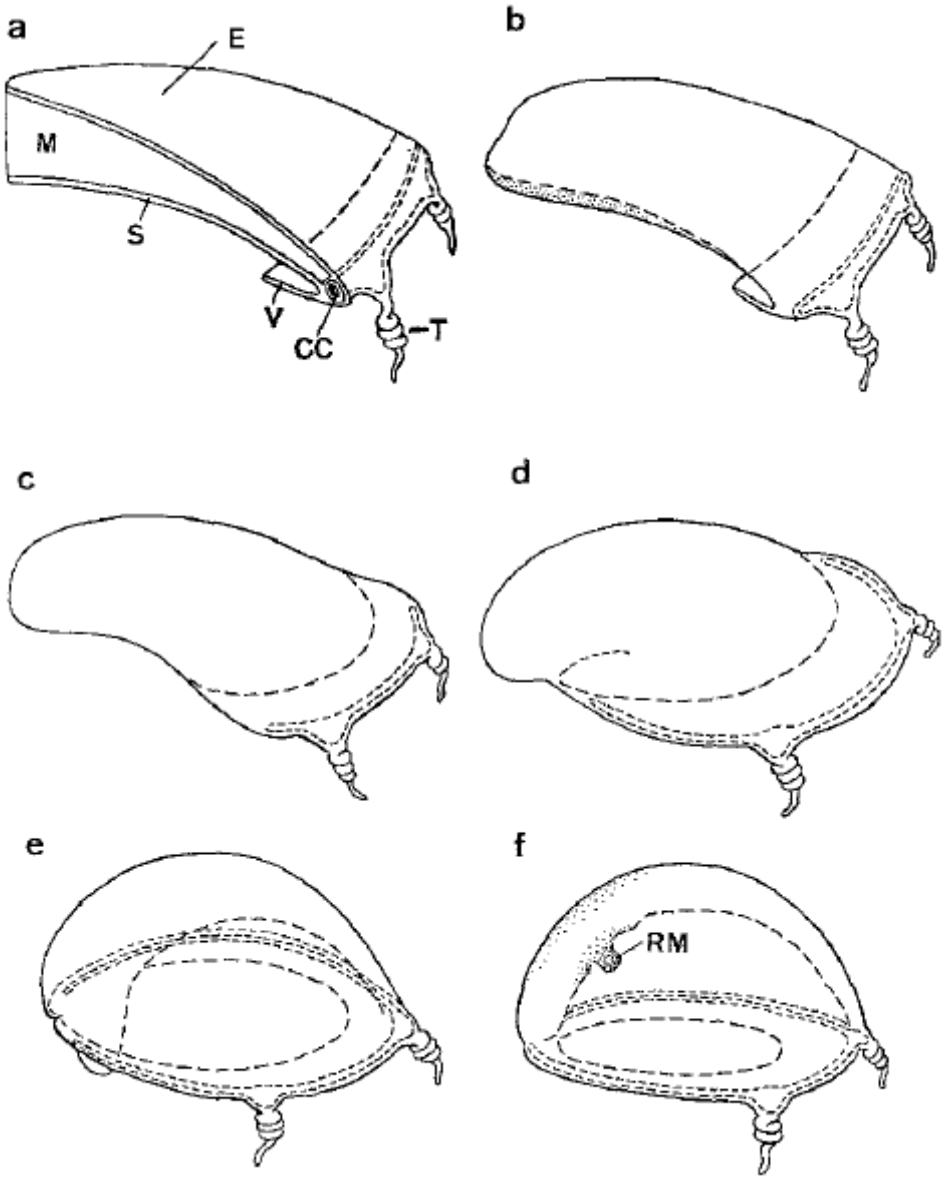


Figure 40 : Régénération d'un manubrium sur un quart interradiaire.
Juste après isolation du fragment, la mésoglée est apparente (a). La cicatrisation a lieu par un rapprochement de la sous-ombrelle et l'exombrelle qui recouvrent la partie exposée de la mésoglée (b). Ensuite, le canal circulaire s'étend et entoure progressivement le fragment (c) et (d). Une fois la forme circulaire rétablie (e), la régénération du manubrium débute (f).
Abréviations : CC : canal circulaire, E : exombrelle, M : manubrium, RM : manubrium régénéré, S : sous-ombrelle, T : tentacules, V : vélum
Tiré de Schmid et Tardent (1971).

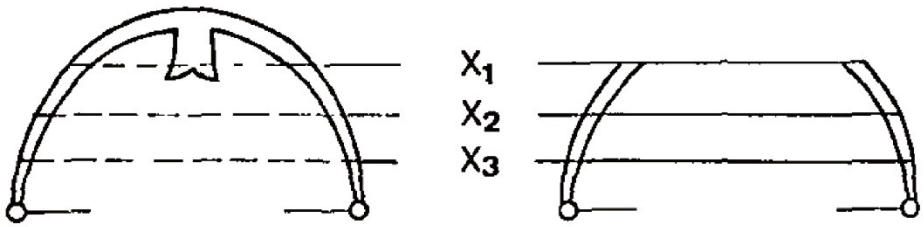
1.3. Etude de la régénération du manubrium

Mon étude se focalise sur la régénération du manubrium pour plusieurs raisons :

- Le manubrium est un organe unique, indispensable à la survie de la méduse.
- La régénération du manubrium est stéréotypée et ne dépend pas du nourrissage pendant le temps de régénération, à la différence de la régénération des gonades et des bulbes tentaculaires.
- Il s'agit d'un organe fonctionnel dès que la méduse est sortie du gonozoïde ; et contrairement aux bulbes tentaculaires, il n'y a pas d'ajout de nouveaux manubriums pendant la croissance de la méduse. Il n'y a donc pas d'ambiguïté entre régénération de l'organe et croissance.
- Le manubrium regroupe une grande variété de types cellulaires, certains liés à la digestion étant uniques au manubrium. Tous les types de dérivés somatiques des i-cells sont présents, permettant l'étude de leur différenciation.
- Le manubrium renferme un pool d'i-cells, localisé à la base ; permettant d'étudier la dynamique des autres pools localisés dans les bulbes et les gonades suite à son ablation.
- Le manubrium est le point central de la symétrie tétraradiaire de la méduse et a lui-même une symétrie tétraradiaire. Sa régénération est donc informative sur les mécanismes de patterning de la méduse.
- Le manubrium comprend le pôle oral de la méduse, ce qui permet la comparaison des mécanismes cellulaires et moléculaires avec la régénération du pôle oral des autres modèles cnidaires polypes.

I.4. Contrôle de la régénération du manubrium chez *Clytia*

La régénération du manubrium de *Clytia* a été étudiée dans les années 1970. Après avoir déterminé l'étendue des capacités de régénération de la méduse *Clytia*, Schmid *et al.* se sont intéressés aux mécanismes régulant la régénération du manubrium (Schmid & Tardent 1971; Schmid 1974a; Schmid *et al.* 1976). Ils ont tout d'abord déduit chez *Clytia* et *Podocoryne carnea* que la capacité à régénérer un manubrium est répartie inégalement dans l'ombrelle. En effet, suite à l'ablation du manubrium et de portions centrales de l'ombrelle de tailles différentes (représentant ¼, ½ et ¾ de l'ombrelle), le taux de régénération est plus élevé quand seule une petite portion de la zone centrale est ôtée avec le manubrium (Fig.41) (Schmid 1974a).



Niveau de la coupe	Quantité d'ombrelle ôtée avec le manubrium	n	*Podocoryne carnea*, % de manubrium régénérés	n	*Clytia hemisphaerica*, % de manubrium régénérés
X1	1/4	45	75,5		
X2	1/2	75	46,5	10	100
X3	3/4	59	15,3	10	0

Figure 41 : Ablation du manubrium et de la partie centrale de l'ombrelle.
Schéma des dissections réalisées. Méduses en vue latérale.
x1, x2 et x3 indiquent les différents niveaux de coupe ôtant respectivement ¼, ½ et ¾ de l'ombrelle avec le manubrium.
Le tableau indique les pourcentages de manubriums régénérés après ablation chez *Podocoryne carnea* et *Clytia hemisphaerica*.
Adapté de Schmid (1974).

La différence de capacité de régénération entre la zone centrale et la périphérie est aussi visible sur des quarts de méduses selon Schmid *et al.* (1976): dans les quarts contenant une portion du canal radiaire, la régénération est deux fois plus rapide et a un taux de succès plus élevé dans les quarts contenant des tissus de la zone centrale de l'ombrelle (appelés fragments A) que dans ceux contenant uniquement des tissus venant de la périphérie (appelés fragments C) (Fig.42). Si les quarts sont découpés dans les espaces interradiaires (donc sans portion de canal radiaire), la régénération du manubrium a lieu uniquement dans les quarts contenant une portion de zone centrale de l'ombrelle (Schmid *et al.* 1976).

Suite à ces observations, Schmid *et al.* (1974, 1976) concluent à la présence d'un gradient dans la potentialité de régénérer un manubrium, décroissant du centre de l'ombrelle vers la périphérie. Différentes hypothèses peuvent expliquer ces différences : les méduses diffèrent dans la taille de la zone de coupure et la présence ou non d'ombrelle de la zone centrale. Afin de déterminer les facteurs affectant la capacité de régénération, Schmid *et al.* ont étudié les capacités de régénération de quarts interradiaires de méduses en réalisant des coupes de manière à varier la longueur de la zone de coupure, la longueur de canal circulaire et la quantité d'ombrelle de la zone centrale (Fig.43) (Schmid 1974a). Ces fragments sont bien capables de restaurer la forme méduse et de régénérer le manubrium. Le taux de régénération n'est pas influencé par la longueur de la coupe ou la quantité de canal circulaire présent. Cependant, le taux de régénération est bien plus faible dans les fragments ne contenant pas de portion centrale d'ombrelle. Le gradient de potentialité à régénérer le manubrium est donc encodé directement dans l'ombrelle (Schmid 1974a).

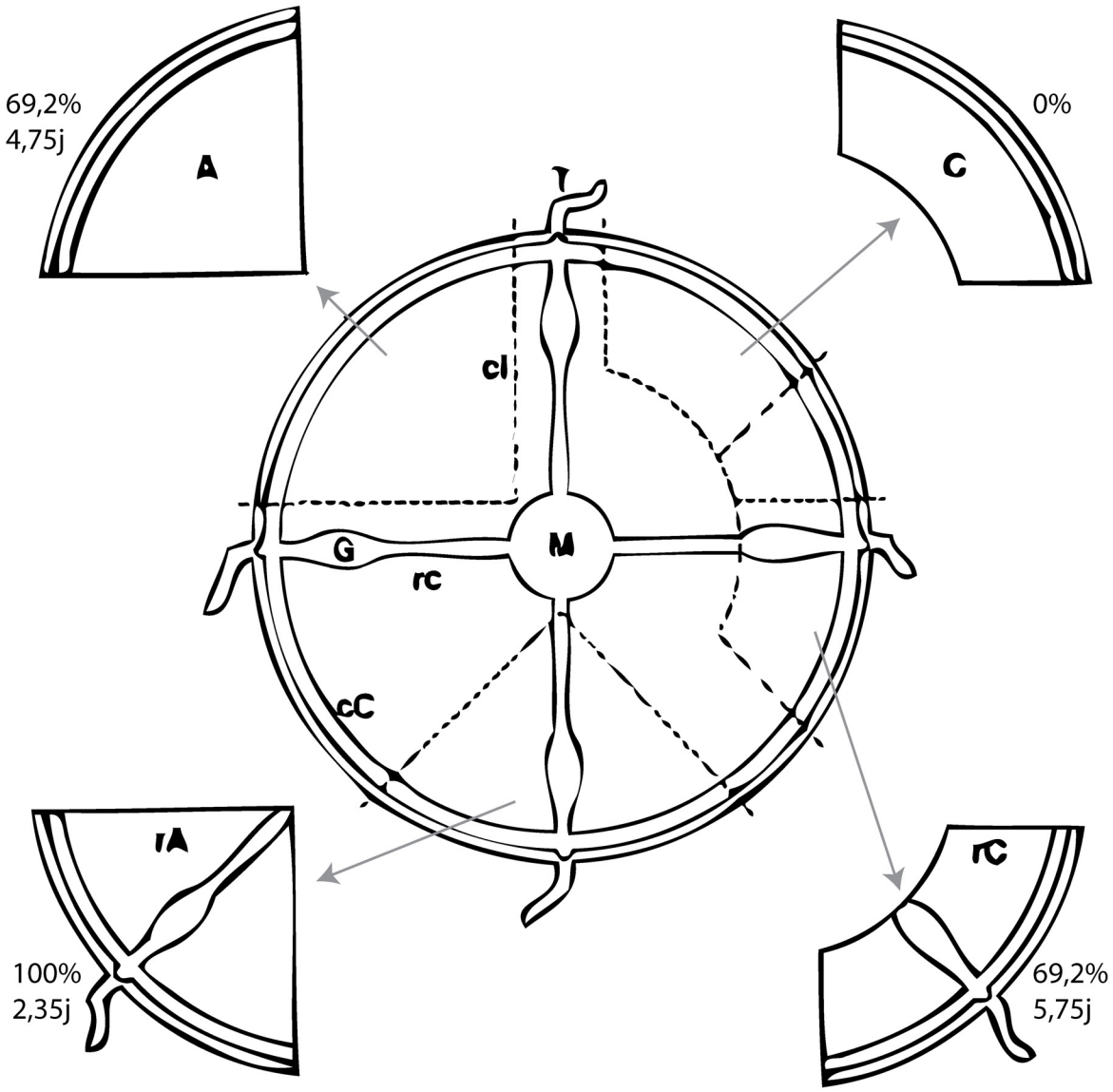


Figure 42 : Régénération du manubrium sur différents types de quartiers.
Schéma des dissections réalisées. Afin d'éliminer la variabilité entre méduses, les quatre types de fragments sont prélevés de la même méduse. Les nombres à coté de chaque type de coupe indiquent le pourcentage de manubrium régénérés à partir de ces fragments et la durée de la régénération.
Abréviations : A : fragment A, C, fragment C, cc : canal circulaire, cl : ligne de coupe, G : gonade, M : manubrium, rA : fragment A contenant une portion de canal radiaire, rC : fragment C contenant une portion de canal radiaire, rc : canal radiaire, T : tentacule.
Adapté de Schmid et al. (1976).

Chez l'hydre, le positionnement du pôle oral lors de la régénération est classiquement expliqué en termes de signaux inducteurs et inhibiteurs (voir section III.2.1 de l'Introduction générale). Schmid *et al.* ont supposé qu'un système similaire pourrait contrôler la régénération du manubrium chez *Clytia*. Des approches de greffe ont été utilisées afin de tester si des signaux inducteurs ou inhibiteurs sont sécrétés dans l'ombrelle et pourraient expliquer les différences dans la capacité de régénération. Une portion de manubrium greffée sur un canal radiaire ou sur la sous-ombrelle régénère un manubrium à n'importe quelle distance du manubrium endogène (Fig.44) et un manubrium entier greffé sur un fragment interradiaire n'inhibe pas la régénération du manubrium sur ce dernier (Fig.45.A) (Schmid *et al.* 1976). Une inhibition de la régénération par un manubrium greffé a été observée uniquement dans le cas où le manubrium est greffé directement sur la zone de régénération (Fig.45.A position c'), ce qui d'après Schmid *et al.* (1976), pourrait être causé par un encombrement stérique ou une compétition pour les mêmes cellules (les cellules de la sous-ombrelle servant la régénération étant incorporées à la base du manubrium greffé au lieu de servir à la régénération). Les auteurs en concluent que le manubrium ne génère donc pas de zone d'inhibition sur la formation d'un nouveau manubrium. L'hypothèse de la présence d'un signal inducteur a été réfutée par la greffe d'un manubrium sur l'ombrelle avant la découpe d'un fragment C ne régénérant pas de manubrium (Fig.45.B). Le manubrium greffé n'induit pas la formation de manubrium (Stidwill 1974; Schmid *et al.* 1976).

La régénération du manubrium ne dépendant pas de signaux inducteurs ou inhibiteurs, Schmid *et al.*ont supposé que la potentialité de régénérer un manubrium pourrait venir plutôt de la forme du fragment en lui-même et du processus de remodelage (Schmid *et al.* 1976) :

> "Zahlreiche Untersuchungen sprechen dafür, dass der Form der Fragmente und den daraus resultierenden Wundverschlussmechanismen Bedeutung für die Regenerationsleistungen beizumessen ist." (Stidwill 1974) (De nombreuses expériences indiquent que la forme du fragment et le processus de fermeture de la blessure qui en résulte sont importants pour les performances de régénération.)
> " […], dass offenbar die Form des Fragments darüber entscheidet, ob, wann und wo ein neues Manubrium gebildet wird." (Schneider 1975) (La forme du fragment est responsable du lieu et du temps de régénération d'un nouveau manubrium.)

Des quarts interradiaires A et C se referment selon le même mécanisme par contraction progressive de la zone de coupure. Schmid *et al.* (1976) proposent que les formes des différents fragments induisent des forces de tension différentes dans les tissus et la mésoglée (Schmid *et al.* 1976). L'ombrelle des fragments interradiaires est composée des deux couches de muscles lisses et striés et de la mésoglée. Les deux sont potentiellement source de forces de tension plus grande dans les fragments C que dans les fragments A. En effet, la modélisation de la longueur des fibres musculaires avant et après remodelage indique que les fibres musculaires lisses et striées des fragments C doivent s'étirer plus que celles des fragments A, entrainant des forces de tension plus grandes dans les fragments C (Fig.46) (Schmid *et al.* 1976). La mésoglée est composée de fibres s'étendant de la sous-ombrelle à l'exombrelle, elle est responsable de la stabilité structurelle à la méduse. Au cours de la restauration de la forme méduse, la forme de

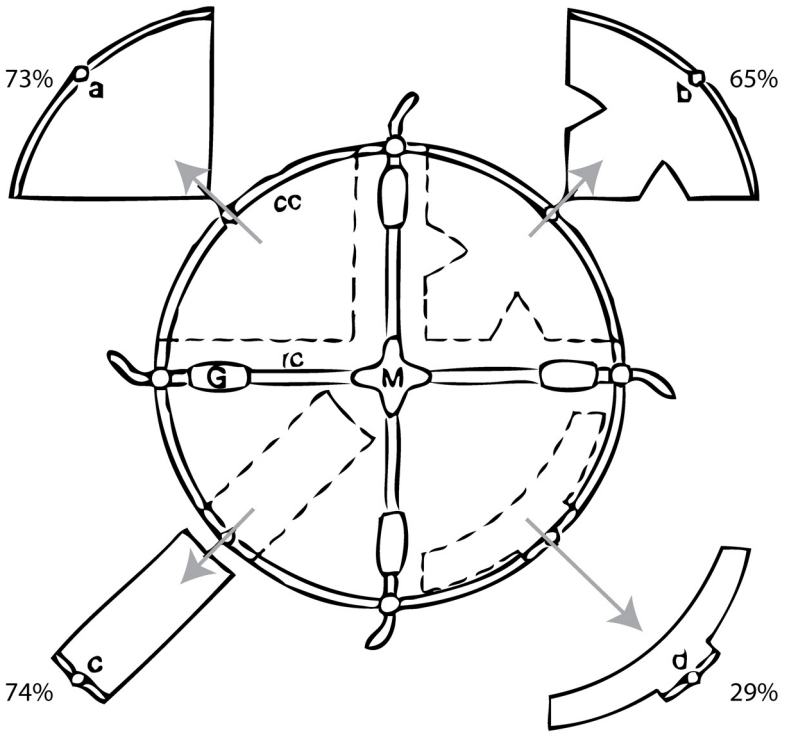


Figure 43 : Régénération du manubrium sur différents types de quartiers.
Schéma des dissections réalisées. Afin d'éliminer la variabilité entre méduses, les quatre types ont été prélevés à partir de la même méduse. Les nombres à côté de chaque type de coupe indiquent le pourcentage de manubriums régénérés à partir de ces fragments.
Abréviations : cc : canal circulaire, G : gonade, M : manubrium, rc : canal radiaire.
Adapté de Schmid (1974).

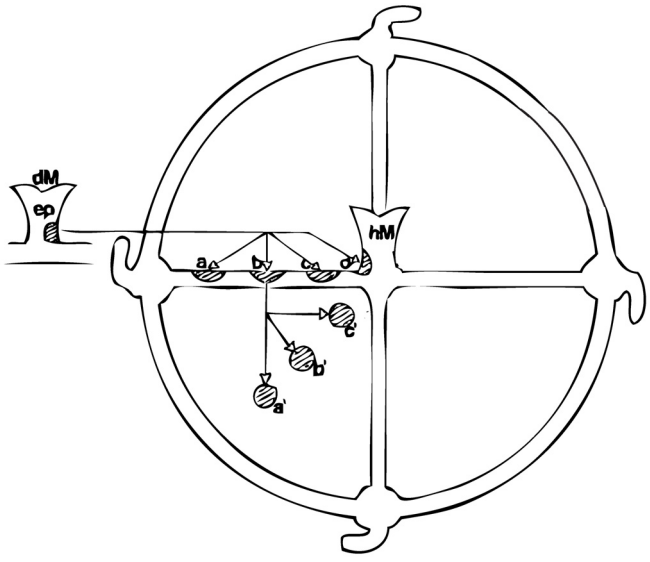


Figure 44 : Influence du manubrium endogène sur la régénération d'un manubrium.
Schéma de la greffe. a, b, c, a', b' et c' indiquent les emplacements des greffes de portions de manubrium sur le canal radiaire et sur l'ombrelle. Les portions de manubriums greffés reforment bien des manubriums entiers.
Abréviations : dM : manubrium donneur, ep : fragment de manubrium greffé, hM : manubrium hôte.

Adapté de Schmid et al. (1976).

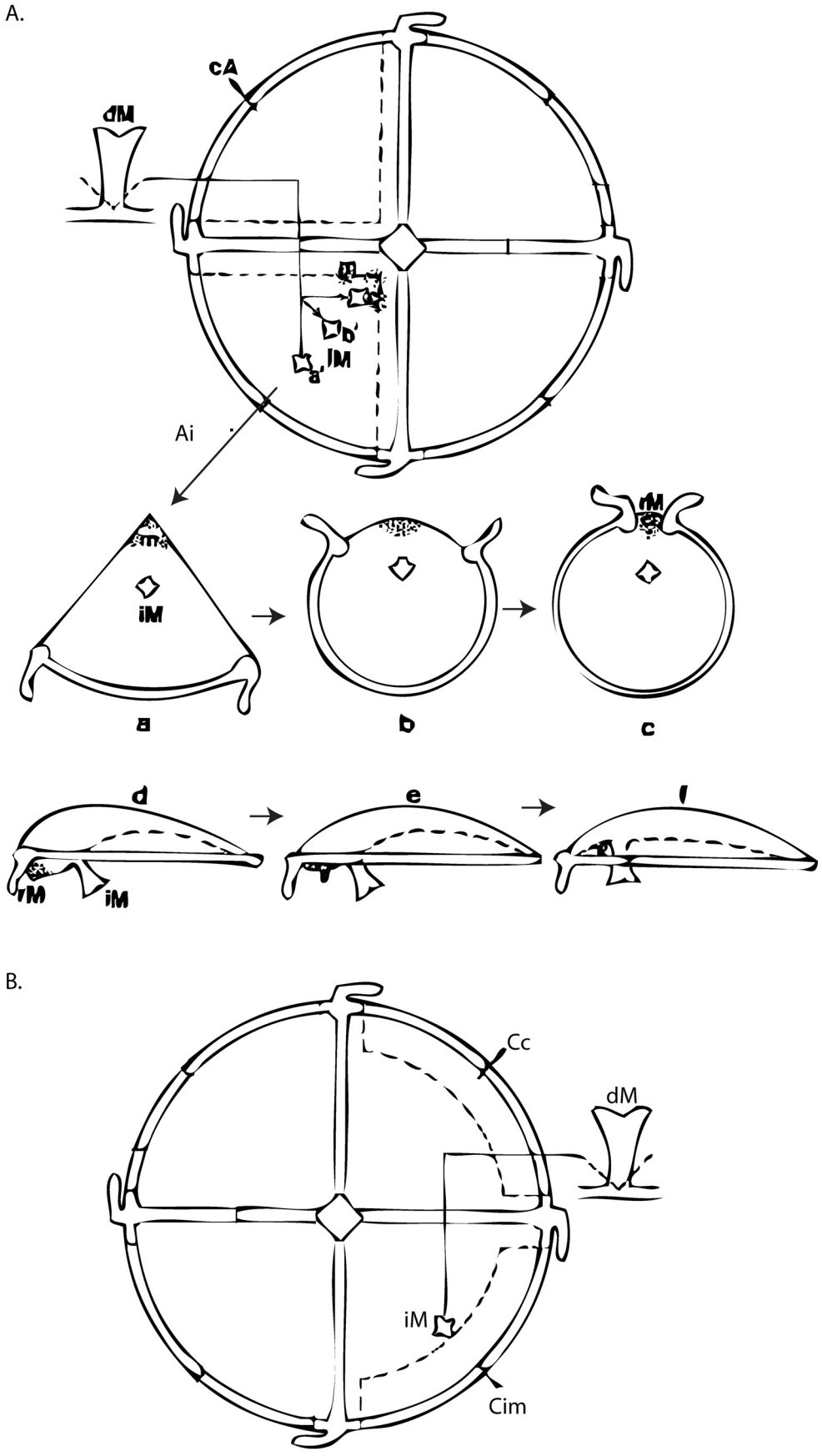


Figure 45 : Influence de la greffe d'un manubrium sur la régénération des fragments A et C interradiaires.

Figure 45 : Influence de la greffe d'un manubrium sur la régénération des fragments A et C interradiaires (légende).
Schéma de la greffe.
(A) Un manubrium est greffé sur l'ombrelle puis le quart interradiaire est isolé de la méduse. Après la restauration de la forme circulaire, un manubrium régénère malgré la présence du manubrium greffé.
(a), (b) et (c) marquage des fragments A au Bismarck brown (points).
(d), (e) et (f) régénération du manubrium proche du manubrium implanté, vue latérale.
a', b' et c' : zone d'implantation du manubrium sur les fragments A.
(B) Un manubrium est greffé sur l'ombrelle puis un fragment C interradiaire accolé au manubrium est isolé de la méduse. Ce fragment ne régénère pas de manubrium.
Abréviations : Ai : fragment A après implantation du manubrium, cA : fragment A contrôle, cC : fragment C contrôle, Cim : fragment C à proximité d'un manubrium implanté pendant une semaine, iM : manubrium greffé, m : marquage au colorant vital Bismarck brown, rM : manubrium en régénération.
Adapté de Schmid (1974).

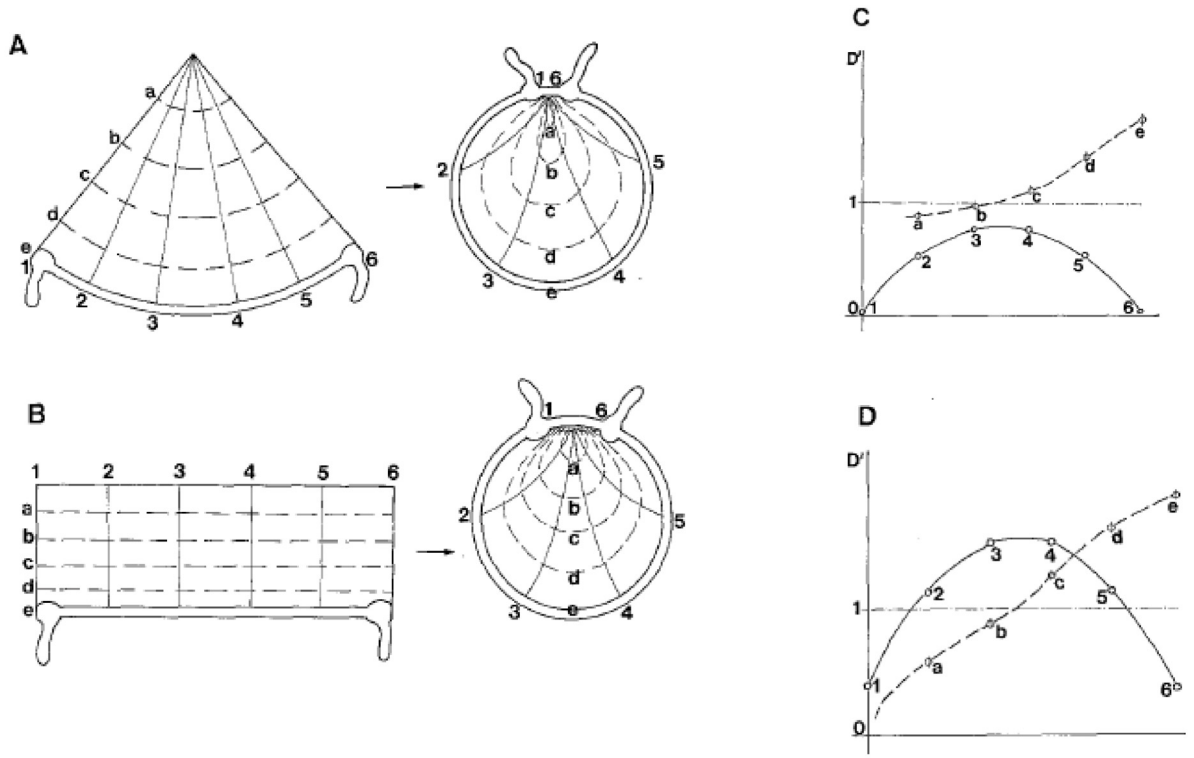


Figure 46 : Modèle des forces de compression s'appliquant aux fragments pendant la restauration de la forme méduse.
Schémas créés à partir de mesures de médusoïdes. a-e : muscles striés, 1-6 : muscles lisses.
(A) Fragment A.
(B) Fragment C.
(C) et (D) Changement de la longueur des fibres musculaires lisses et striées pendant le remodelage d'un fragment A (C) et d'un fragment C (D). Abscisse : distance relative des muscles lisses et striés. Ordonnée : longueur du muscle une fois la forme méduse rétablie. Les valeurs supérieures à 1 indiquent une extension, celles inférieur à 1 une compression.
Adapté de Schmid et al. (1976).

la mésoglée doit être réorganisée afin de correspondre à la nouvelle forme circulaire. Dans les fragments C, cette réorganisation est plus longue que dans les fragments A (72h contre 24h). La mésoglée exerce donc des forces qui s'opposent à la restauration de la forme méduse qui sont plus importantes dans les fragments C que dans les fragments A (Schneider 1975; Schmid *et al.* 1976).

Ces forces de tension seraient responsables de la répartition différente des cellules localisées à la zone de coupure, utilisées pour régénérer le manubrium. Dans un fragment A, les cellules sont concentrées en un point ; tandis que dans un fragment C, elles sont réparties dans le médusoïde, et donc indisponibles pour la régénération (Fig.47) (Schmid *et al.* 1976). La forme du fragment, par la génération de forces de tensions au cours du remodelage, influencerait donc les cellules mises à disposition pour la régénération (Stidwill 1974; Schneider 1975; Schmid *et al.* 1976).

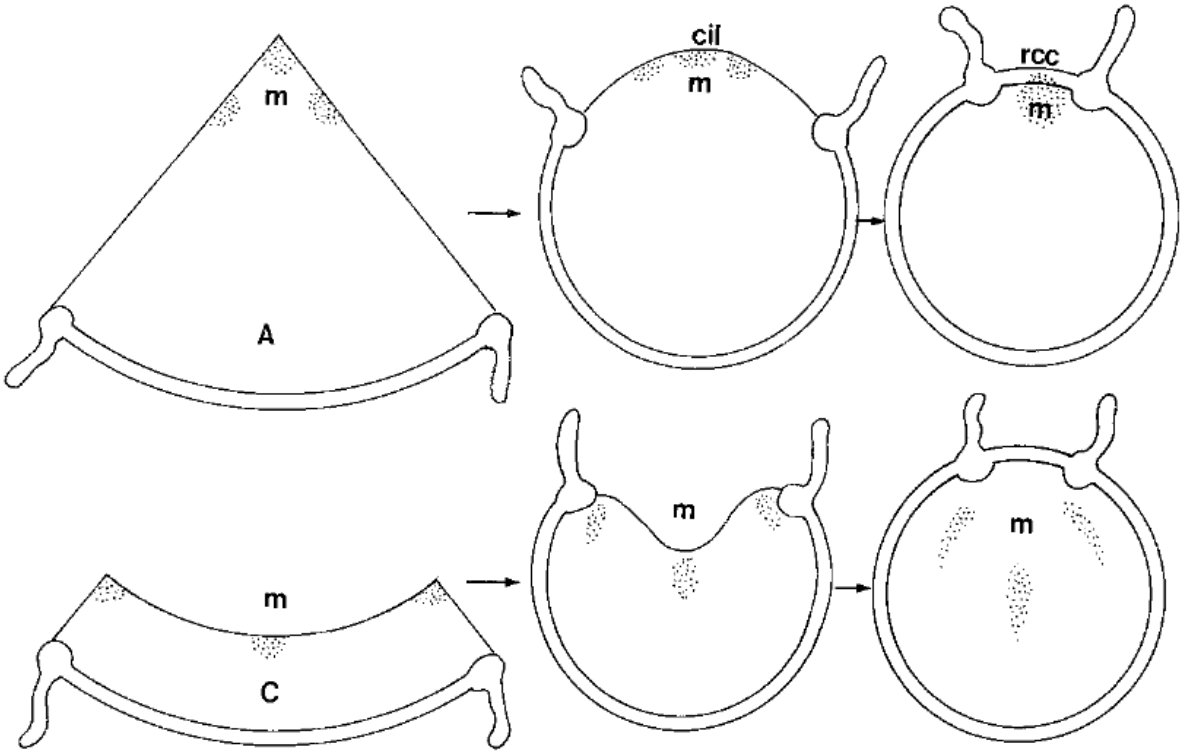


Figure 47 : Restauration de la forme circulaire dans des fragments C et A.
Sous-ombrelle proche de la zone de coupure marquée au Bismarck brown.
Abréviation : A : fragment A, C : fragment C, cil : zone de coupure, m : marquage au Bismarck brown, rcc : canal circulaire complet.
Tiré de Schmid 1976.

Les expériences de Schmid *et al.*(1971, 1974, 1976) laissent certains problèmes non résolus :

- Les mécanismes permettant la restauration de la forme circulaire sont pour le moment inconnus.
- Les capacités de régénération différentes entre fragment C et fragment A sont expliquées par les différences entre les forces de tension, notamment celles des muscles (Schmid *et al.* 1976). Il n'y a aucune preuve fonctionnelle de cette hypothèse.
- Le comportement des fibres musculaires lors du remodelage n'a jamais été observé. Schmid *et al.* notent que les fragments sont capables de se contracter et donc que les fibres striées circulaires restent probablement intactes au moins en partie. Cependant les fibres lisses pourraient se dissocier et donc ne pas exercer de tension sur les tissus. De plus, d'après le modèle, une fois la zone de coupure refermée les fibres lisses n'ont plus une orientation radiaire, il est possible qu'elles soient réorganisées soit pendant la restauration de la forme circulaire, soit après afin de regagner l'orientation radiaire.
- L'hypothèse de Schmid *et al.* pour l'initiation ou non de la régénération repose sur l'accumulation ou non de cellules en un point. La nature de ces cellules est inconnue. De même, le mécanisme permettant d'initier la régénération dans le cas de l'accumulation des cellules en un point n'est pas expliqué.
- On ne sait pas si les manubriums régénérés à partir des fragments interradiaires ont bien tous les types cellulaires.
- Le modèle explique l'initiation de la régénération dans un cas particulier, celui de la régénération sans canal radiaire. Les mécanismes dans le cas de la régénération en présence d'un canal radiaire sont potentiellement différents (à la différence des fragments C interradiaires, la régénération du manubrium est possible sur les fragments C radiaires).

Ces questions s'inscrivent dans les problématiques plus globales des mécanismes assurant le remodelage, du comportement des tissus lors du remodelage, de l'induction de la régénération et de la source des cellules. Elles ont été abordées dans l'article présenté dans ce chapitre. Le modèle auquel nous avons abouti diffère en partie de celui de Schmid *et al.* (1976). Les deux modèles seront confrontés dans la discussion de cette partie.

II. Article

Résumé
Il s'agit du premier article, depuis ceux publiés dans les années 1970, présentant des mécanismes cellulaires au cours de la régénération chez la méduse *Clytia*. L'article décrit tout d'abord les capacités de régénération de jeunes méduses de la souche Z4B, avant de se concentrer sur les mécanismes de régénération du manubrium.

Les principales conclusions sont les suivantes :

- La méduse *Clytia*, souche Z4B, a des capacités de régénération importantes. Les deux seules limites sont l'incapacité à régénérer la marge si elle est entièrement perdue, et l'absence de régénération du manubrium dans les fragments interradiaires (ne contenant pas de portion de canal radiaire).
- La réponse à la blessure est séparée en trois phases successives qui sont la cicatrisation, le remodelage et la régénération. Les phases de régénération et remodelage peuvent facilement être distinguées par la nécessité ou non de la prolifération cellulaire.
- Au cours de la régénération du manubrium, la prolifération augmente dans le manubrium en régénération ainsi que dans les canaux radiaires.
- Une approche de greffe a révélé la contribution à la régénération de deux populations de cellules venant des gonades (cellules souches et cellules gastrodermiques) se déplaçant à travers les canaux radiaires. Un canal radiaire doit être connecté à un pool de cellules souches pour que le manubrium régénéré soit complet.
- Le manubrium régénéré n'est pas systématiquement de forme tétraradiaire. Sa géométrie dépend du nombre de canaux radiaires présents dans le fragment, et n'est pas une propriété intrinsèque du primordium (ébauche du manubrium en régénération).
- La position du manubrium régénéré n'est pas déterminée par le centre géométrique de la méduse, ou par un champ d'inhibition généré par le manubrium. Une inhibition locale venant du manubrium a cependant été observée si un manubrium est greffé en proximité immédiate du site de régénération.
- Les éléments structuraux jouent un rôle dans la détermination de la position du manubrium sur le canal radiaire. Le manubrium est toujours régénéré au niveau du point de jonction des fibres musculaires lisses.
- Le point de jonction des fibres musculaires lisses est formé suite au remodelage, dont le principal moteur est la présence d'un câble d'actomyosine au niveau du site de blessure. Au cours du remodelage, les muscles et la mésoglée sont réorganisés.

Les expériences permettant la validation du modèle de la formation du point de jonction sont en cours. L'article sera soumis très bientôt au journal eLife.

Contribution à l'article

La mise en place de *Clytia* comme modèle de régénération, les premières caractérisations, ainsi qu'une grande partie du travail de conceptualisation ont été réalisés par Chiara Sinigaglia. J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans l'article.

Les expériences de greffes de gonades et de manubrium ont été réalisées par Chiara Sinigaglia et Lucas Leclère. Une partie des tests des inhibiteurs de la contraction musculaire et de la myosine, ainsi que les dissections présentées dans la figure supplémentaire 1.1 ont été réalisées par Lucas Leclère. Les tests initiaux avec les billes fluorescences utilisés pour la figure 3 ont été réalisés par Julia Steger et Gwladys Perez.

La rédaction du manuscrit a été réalisée par Chiara Sinigaglia et Lucas Leclère, avec des contributions d'Evelyn Houliston et de moi-même.

An integrated system of structural elements patterns regenerating *Clytia* medusae

Chiara Sinigaglia[1,2,#*], Sophie Peron[1,2], Julia Steger[1,#], Evelyn Houliston[1], Lucas Leclère[1*]

1. Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-mer (LBDV), 06230 Villefranche-sur-mer, France.

2. These authors contributed equally to this work

Present address: CS: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), École Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5242 - INRA USC 1370, 69364 Lyon cedex 07, France; JS: Department for Molecular Evolution and Development, Centre of Organismal Systems Biology, University of Vienna, Vienna A-1090, Austria.

*For correspondence: chi.sinigaglia@gmail.com, lucas.leclere@obs-vlfr.fr.

Abstract

We present the self-organization properties of regenerating *Clytia* medusae. Cutting and grafting experiments allowed to define patterning rules that govern medusa regeneration, and to investigate the underlying cellular mechanisms. The regeneration process can be divided into three phases: 1) wound healing, 2) tissue remodeling to restore global symmetry, and 3) organ reformation dependent on cell proliferation in the blastema and fueled by cell recruitment from distant organs. Positioning and geometry of the manubrium (central feeding organ) can be predicted by the initial disposition of structural elements in the dissected fragment. Actomyosin-driven bell remodeling efficiently reestablishes the circular medusa shape, generating new hubs of radial smooth muscle fibers that define manubrium regeneration sites. Radial canals locally dictate the geometry of the new manubrium. These findings provide a systems understanding of medusa regeneration in which global self-organization properties rely on integration of local responses between structural elements and coordinated long-range cell recruitment.

Keywords: self-organization, stem cell, jellyfish, Cnidaria, Hydrozoa, *Clytia hemisphaerica,* muscle, symmetry, positional information.

Introduction

Regeneration-competent species show different strategies for recovering lost body parts (see eg. (Bely and Nyberg, 2010)). The dynamics of regenerative processes have been extensively studied, particularly in relation to the relative contributions of cell proliferation and remodeling of existing tissues. The signaling pathways regulating such processes have received considerable attention. In numerous species, organizer-like centers and gradients of morphogens were found to define the positional information of new tissues (eg. (Raz et al., 2017; Witchley et al., 2013)). Recent studies have highlighted the key role played by structural and mechanical cues during regenerative processes. In planarians, both the body wall muscles and the tissues at the injury site act as structural landmarks defining positional information during whole-body regeneration (Cebrià, 2016; Oderberg et al., 2017; Scimone et al., 2017; Witchley et al., 2013). Supra-cellular actin fibers have been demonstrated to direct mechanically the orientation of the body axis in regenerating hydra polyp fragments (Livshits

et al., 2017). Unraveling the role played by structural elements in a diversity of species will be essential for understanding the evolution of regenerative capacities in Metazoa.

Cnidarians, the sister group to bilaterian animals, display remarkable regenerative capacities. The classic regeneration model *Hydra* (Galliot, 2012), the colonial hydrozoan *Hydractinia* (Bradshaw et al., 2015; Gahan et al., 2016)) and the sea anemone *Nematostella vectensis* (Amiel et al., 2015; DuBuc et al., 2014; Schaffer et al., 2016) provide tractable systems for studies of wound healing and whole-body regeneration. Research has focused so far mainly on the cnidarian polyps, with little attention being paid to the medusa stage, historically deemed to have lower regenerative potential. Consistent with this notion, a recent study showed that the radial symmetry of scyphozoan jellyfish is restored after amputation by a simple muscle-powered process, termed “symmetrization” (Abrams et al., 2015). Hydrozoan medusae, however, have long been known to possess greater developmental plasticity than scyphozoans (Hargitt, 1899, 1903; Morgan, 1899; Neppi, 1918; Schmid, 1974; Schmid and Tardent, 1971). *Podocoryna carnea* medusae provided one of the first demonstrations of cellular transdifferentiation in animals, where striated muscle cells could generate multiple alternative cell types (Schmid and Alder, 1984). Hydrozoan medusae offer an excellent paradigm for addressing complex biological systems (Leclère et al., 2016). Compared to the long-lived, asexually propagating polyp stage they display more complex tissue architectures and behaviors and shorter life-spans.

The pioneering work of V. Schmid and P. Tardent provided an initial characterization of the regenerative capacity of hydrozoan medusae, including the ability of wild-caught *Clytia hemisphaerica* to reconstitute organs and restore umbrellar shape after diverse types of damage (Schmid and Tardent, 1971). *Clytia* is a reliable laboratory model with extensive genomic and transcriptomic resources (Houliston et al., 2010; Leclère et al., 2019) amenable to gene function analysis (Momose et al., 2018). *Clytia* medusae show four-fold rotational symmetry around the central manubrium feeding organ (Figure 1A). Organ distribution thus can be defined by positional values along a radial axis and relative angular spacing. Each quadrant harbors one radial gastrovascular canal, one gonad, one lobe of the manubrium, and an equal number of tentacle bulbs, increasing (up to four) by intercalation as the medusa grows. A peripheral circular canal connects tentacle bulbs and radial canals. Located on the rotational axis of the tetraradial bell, the manubrium is itself organized with tetraradial symmetry: a basal (proximal) gastric cavity is surmounted by the distal mouth part, terminating in a four-lobed lip; the base of the gastric cavity is organized in four gastric pouches connected to the four radial canals, defining the corners of the square base (Figure 1B). The manubrium, bulbs and gonads behave as distinct functional units, and can be

considered as true organs. The bell, mainly constituted by acellular mesoglea, is covered on its external face (exumbrella) by a monolayer of epithelial cells. The underside, termed subumbrella, has a more complex architecture: an inner endodermal epithelium is covered by a layer of smooth epitheliomuscular cells, oriented radially. The peripheral part of the bell is characterized by an additional layer of circularly-oriented striated epitheliomuscular cells lying between the endoderm and smooth muscles (Figure 1C,D), which plays an essential role during swimming (Leclère and Röttinger, 2016).

We used cutting and grafting experiments to define a series of the patterning rules that govern *Clytia* medusa regeneration, and to investigate the underlying cellular mechanisms. The regeneration process could be divided into distinct phases of wound healing, tissue remodeling to restore global symmetry, and cell proliferation-dependent organ reformation. We found that manubrium positioning can be predicted by the behavior of subumbrellar muscles and radial canals in response to injury. Actomyosin-driven contraction at the wound site is a necessary process that reestablishes a radial arrangement of subumbrellar muscle fibres, the new muscle “hub” marking the manubrium formation site. Radial canals provide a second key structural element for regeneration, locally dictating the geometry of the regenerated manubrium, and allowing recruitment of stem and somatic cell types mobilized from distant organs to fuel the regenerative process. We propose that self-organization during regeneration in *Clytia* medusae relies on integration of local responses between structural elements and coordinated long-range cell recruitment.

Results

Temporal and spatial segregation of wound healing, remodeling, and organ regeneration

To define the self-organizing properties of the medusa, we performed a series of dissections, designed to explore the regenerative responses of *Clytia* (Figure 1E-K). Targeted ablations demonstrated that all organs and radial canals fully regenerate. Fully functional manubria regenerate in 4 days (Figure 1G), gonads (harboring mature oocytes) and tentacle bulbs in about a week (Figure 1E,F; gonads: 48/48, bulbs: 45/52, after 8 days). Removed segments of radial canals rapidly reform, regrowing from the stumps in both centripetal and centrifugal directions (Figure 1H; notice the thickened end). The recovery efficiency of gonads and tentacle bulbs vary, both within and between medusae, and appears to be affected by the

physiological state of the animal, in particular by feeding levels (Figure 1-S1). In contrast, the manubrium regenerates reliably and stereotypically, suggesting this feeding organ is prioritized during the regeneration process.

Any injury in the umbrella triggers a wound healing response, with the exumbrella and subumbrella sealing to close the wound in less than 2h. This initial response was systematically followed by a remodeling of the umbrella, which rapidly restores the circular bell shape, irrespective of the starting topology and of the number of surviving organs or canals (Figure 1
J,K, 1-S2). Dissecting out the entire bell margin results in one of the few exceptions; the fragment seals into a spherical shape, which is unable to progress through regeneration (Figure 1I). Each medusa half ("bisected") and quarter fragments morph within 24 hours post dissection (hpd) into a circular, smaller, bell (Figure 1J,K). Missing "quadrants" are never restored, although occasionally additional radial canals sprout from the manubrium (10/30 of bisected medusae showed 3 radial canals after 6 weeks). Any portion of the manubrium, when present, rapidly seals and becomes displaced away from the bell margin, before regaining its feeding function (Figure 1J). In manubrium-free quarter fragments, within 24 hpd, cells accumulate at the free end of the remaining radial canal(s); the cell mass regenerates into a new functional manubrium within 4 days post-dissection (dpd) (Figure 1K).

Manubrium regeneration, but not umbrella remodeling, requires cell proliferation

The initial characterizations of *Clytia* medusa regeneration potential show that wound healing, umbrella remodeling and organ regeneration are temporally and spatially distinct in *Clytia* medusae. What is the role of cell proliferation in these sequential processes? We addressed this question by focusing on regeneration of the manubrium following its complete removal along with a surrounding disc of all the umbrellar tissues (see Methods for details on the ablation procedure).

Manubrium regeneration starts by the fusion of the wounded exumbrellar and subumbrellar, sealing off the exposed mesoglea (stage 0, wound closure; Figure 2A,). The hole in the bell starts to constrict progressively, pulling together the cut ends of the four radial canals. By 12 hpd, the tissue gap is closed, and the radial canals join at the center (stage 1, remodeling; Figure 2A). Cells start accumulating at the junction of the radial canals, the first sign of organ regeneration; by 24 hpd the cell mass morphs into a roughly square, flat primordium (stage 2, regenerating primordium; Figure 2A). The primordium thickens, and by 48 hpd it fissures

centrally, revealing the now distinguishable gastric cavity (stage 3, opening; Figure 2A). A thicker rim emerges, which develops into a short tubular outgrowth (stage 4, outgrowth; Figure 2A). The protuberance elongates, and within 4 dpd, it develops the characteristic lip folds, tetraradially arranged; the manubrium is now fully functional, albeit smaller than the original one (stage 5, folding; Figure 1-S1).

No early peak of cell proliferation could be observed in *Clytia* following manubrium ablation, as shown by a pulse incubation with the thymidine analogue EdU (Figure 2-S1). Instead, we observed a reduction of cell proliferation within the first hours following manubrium ablation, notably within the segment lying between gonad and manubrium, which we term the “MG-segment” (Figure 2C, 2-S1). Cell division significantly increased within the primordium (24 hpd), and peaked during the thickening phase (between 48 hpd and 72 hpd; Figure 2A,B). Cell proliferation increased again within the radial canals around 48 hpd, and peaked during primordium thickening stage (72 hpd), before returning to basal levels after 96 hpd (Figure 2C, 2-S1).

Treatment with the inhibitor of DNA synthesis hydroxyurea blocked manubrium regeneration before the mouth opening stage (stage 3), thus establishing the dependency of manubrium regeneration on cell proliferation (Figure 2D, 2-S1). After removal of the inhibitor the regenerative process resumed, and a complete manubrium formed within 3 days (14/20; Figure 2E). Conversely, hydroxyurea treatment did not impair wound healing, bell remodeling or the repositioning of regenerating manubrium (Figure 2G), consistent with the relatively low mitotic levels detected during these processes (Figure 2F). Umbrella remodeling and manubrium regeneration steps can therefore be distinguished by the requirement or not of cell proliferation.

Cell recruitment via the radial canals sustains manubrium morphogenesis

We observed a high number of EdU-labelled cells in the radial canals following pulses at the different stages of manubrium regeneration (Figure 2C, 2-S1A). We hypothesized that these might originate from either gonads or tentacle bulbs, which connect via the radial canals and harbor niches of multipotent stem cells, called interstitial stem cells (i-cells). I-cells can generate both somatic and germ cell types, and characteristically express stem cell markers including *CheNanos1* (Denker et al., 2008; Leclère et al., 2012).

CheNanos1-positive cells were detected in both regenerating manubrium and radial canals, starting from 24 hpd (Figure 3A). The gonadal origin of such i-cells was demonstrated by the replacement of a gonad in a host medusa prior to manubrium ablation with one from an EdU-labeled donor (see Methods). EdU-positive cells were detected both within regenerating manubrium, and the connecting radial canal, 48h after manubrium ablation (Figure 3B), demonstrating that cells of the EdU-labeled grafted gonad contributed to the regenerating manubrium. A subset of the migrating EdU+ cells express *CheNanos1* (Figure 3C), indicating that they are i-cells. Unexpectedly, gonad-derived EdU+ small oocytes were also detected both in the radial canal and regenerating primordium (Figure 3B, 3-S1), suggesting that germ cells at different stages of development can contribute to the regenerating manubrium. No mobilization of *Nanos1+*/EdU+ cells was observed in control medusae (grafted, but non-dissected) (Figure 3D), showing that i-cell recruitment is specifically triggered by the regeneration process. In the gonad transplantation experiments, the EdU+/Nanos1+ cells that left the graft were found exclusively in the MG-segment of radial canals and in the primordium (Figure 3C), suggesting that cell migration from the gonad is targeted towards the regenerating manubrium.

A few additional EdU+ cells distributed more widely through the regenerating medusa were identified as differentiated gastro-endodermal cells. This unexpected population of migrating cells showed characteristic brown pigmentation, likely derived from the crustacean diet (Figure 3E). These cells could be labeled by feeding the medusa with fluorescent beads, which accumulate in digestive gastro-endodermal cells lining manubrium, gonads and tentacle bulbs (Figure 3F). The bead labeling experiments reveals that some endodermal cells circulate through the canals, and can integrate into the gastroderm in other organs. This phenomenon was observed in both regenerating (manubrium ablation) (Figure 3G) and undissected conditions (not shown). This previously undescribed cell mobilization process, particularly conspicuous in starvation conditions (not shown), might assure the nutritional balance between medusa organs. We performed gonad transplantation experiments after feeding the donor medusa with fluorescent beads (see Methods), and confirmed that gastrodermal cells from the gonad endoderm are recruited by the primordium as well as by non-regenerating tentacle bulbs and the other gonads of the medusa (Figure 3H).

We next demonstrated that the recruitment of cells through the radial canals from other organs documented above Is necessary to achieve manubrium regeneration. We removed all four radial canals (including gonads), leaving just their most proximal segments. Under these conditions manubrium regeneration was either blocked at early stages (Figure 4B,C; n=16/21) or generated abnormal manubria with incorrect geometry with disrupted

morphogenesis (Figure 4B,C; n=5/21). A complete tetraradial manubrium was only observed when at least one radial canal was connected to the peripheral gastrovascular system (Figure 4A; n=25/44).

We conclude that massive cellular recruitment via the canals to the manubrium anlagen is necessary for correct manubrium regeneration in *Clytia*. Mobilized cells display two main behavioral patterns: stem cells and differentiating cells are specifically targeted to the regenerating site, while digestive cells detached from the gonads and likely other sites circulate through the canal system and can settle in the endoderm of the other organs, including the manubrium regeneration site.

Radial canals dictate the geometry of the regenerated manubrium

The tetraradial symmetry of the native manubrium mirrors the global symmetry of undamaged medusae, and is also perfectly recovered by regenerating manubria if properly connected to the canal system (Figure 4K). Does the manubrium symmetry depend on the global tetraradial symmetry of the medusa body? To test this we examined the geometry of the manubrium in the presence of different elements of the surrounding medusa.

Bisected and quartered medusae regenerated double- and single-lobed manubria, respectively (Figure 4D,E). Furthermore, irrespective of the dissection topology, the number of lobes of the regenerating manubrium and number of radial canals was always conserved, such that three radial canals generated a three-lobed manubria, and so on (Figure 4D-G). This pattern might be caused by the positional information around a circular “axis” retained within the medusa fragments, or by the canals themselves. To distinguish these possibilities we systematically
removed radial canals from manubrium-ablated (but otherwise undamaged) medusae. In most cases, the presence of four canals led to a tetraradial manubrium, three canals to a trilobate one, two canals a bilaterial manubrium, and one canal to a tubular one (Figure 4H-J). We conclude that the topology of manubrium is determined by the number of connecting canals. The canals might provide a mechanical or biochemical signal (for example through the dense nervous system associated with the canals), or might directly contribute materially to the blastema composition by providing migrating cells (Figure 3). Results of from a previous dissection experiment argued against this latter possibility: a small piece of canal only connected to the primordium was found to be sufficient to direct the geometry of the

regenerated manubrium (Figure 4A). The signal provided by the canal is therefore most likely local and structural.

Muscle fiber ‘hubs’ predict the site of manubrium regeneration

Remodeling and regeneration of fragmented *Clytia* medusa generates a new stable functional state. in which radial symmetry is only partially restored, despite the recovery of circular shape and organ functionality, (Figure 1). Despite the symmetry mismatch, regenerating medusae are well-organized. Recovering medusae usually regenerate only one manubrium (see below for an exception), reform radial canals (which interconnect bulbs and manubrium), and regenerate well-positioned gonads. These global properties indicate that positional information within the bell is globally re-specified during the remodeling phase. We next addressed the nature of the global patterning system that determines the position of the new manubrium.

The initial position of the regenerating manubrium does not coincide with the geometrical center of the remodeled medusa. In addition we observed that a manubrium could form at any location along the radial axis of the bell, such that any fragment along the radial axis could regenerate a manubrium. Indeed a well-formed manubrium could develop at any distance from the bell margin (except for the region immediately adjoining the peripheral canal; Figure 5A), These observations suggest that the bell tissues do not to carry intrinsic positional information along the radial axis, as also suggested by (Schmid et al., 1976).

Despite the potential of umbrella tissues, only a single manubrium usually regenerates, suggesting a control mechanism. One hypothesis is that the manubrium of *Clytia* could exert an organizing role, as is the case to the hypostome (mouth) of *Hydra* polyps (Meinhardt, 1993; Bode, 2011; Vogg et al., 2019), acting as the source of an inhibitory signal within the bell that could prevent the formation of additional manubria. We tested the inhibitory influence of the manubrium by grafting supernumerary manubria at different subumbrellar positions. In almost all cases these could co-exist stably with the original one (in “homeostatic” conditions, not shown), and did not prevent the regeneration of an excised manubrium, resulting in the formation of a two-manubria medusa; Figure 5B). Each manubrium behaves as an independent module, and participates in feeding. One exception was observed when the exogenous manubrium was grafted precisely at the place of the excised one, in which case no regeneration occurred, perhaps due to steric effect (Figure 5C).

We can conclude from these experiments that an additional manubrium does not inhibit manubrium reformation nor induce a global re-organization of the radial axis and of medusa topology. At a local scale, however, the grafted manubrium sprouts new canals from its base, which grow and fuse with the existing canal system (Figure 5-S1). The growth pattern of canals suggests that local cues play an important role in guiding the outgrowths. Thus the manubrium of *Clytia* medusae, unlike the hypostome of *Hydra* polyps, does not appear to act as an active organizer of global patterning, but rather to constitute the central element of a self-organizing framework maintained through local interactions.

In undisturbed conditions, the manubrium is located at the geometrical center of the umbrella, at the point of convergence ('hub') of the radial smooth muscles fibers and of the four endodermal radial canals. This configuration is observed also in regenerating medusae, where, irrespective of the wound topology, both radial canal(s) and a hub of smooth muscle fibers were invariably found associated with the manubrium anlage, and to precede its initiation (Figure 1). This pattern suggests that either the canals or the muscle fiber hub (or both) might play a role in defining the position of the new organ.

Successful manubrium regeneration depends on the presence of radial canals: cells recruited through the radial canals are necessary for correct manubrium morphogenesis (see above: Figure 3), while interradial fragments never regenerate a manubrium in our conditions (Figure 5D). Despite their frequent co-occurrence, it is not the merging of multiple free canal ends, often generated by the remodeling process that direct manubrium positioning and regeneration: in quarter fragments, the manubrium regenerates on the sole surviving radial canal (Figure 5A). In contrast, several observations indicated that the key parameter defining the location of the new organ is the position of the “hub” of smooth muscle fibers that invariably forms as a result of the remodeling process (Figure 5E, n= 9/11). This hub forms independently of the radial canals, which do not seem to influence neither wound closure nor umbrella remodeling: removal of the MG-segment of radial canals did not delay the closure of the gap left by manubrium excision (hole closed after 24h: n=170/170; Figure 5F) nor the formation of a new muscle hub. In no cases did manubrium regeneration commence until at least one excised canal regrew to reach the hub of smooth muscle fibers (Figure 5G, n=3/3). Taken together we can conclude from these results that the position of the hub of smooth muscle fibers is the key parameter defining the location of the new organ, while connection to the radial canals is then necessary to fuel primordium growth and morphogenesis.

In order to test the relationship between muscle fibers hub and manubrium regeneration site, we performed a longitudinal cut along the umbrella of manubrium ablated medusae, which generated two muscle hubs (Figure 5H, n=17/20 at 24hpd). This configuration led to the formation of two separate manubrium primordia, within 24 hpd (Figure 5H, n= 119/326). In 1/3 of cases, two independent manubria regenerated, sometimes linked by a radial canal (Figure 5H, n=16/159). In other cases, the two manubrium anlages later fused into a single oral structure, correctly patterned or twinned (Figure 5H, fused manubria after 5d: n =24/159). The “double hub” experiments confirm i) that the formation of any hub is solely the product of remodeling process and is independent of the radial canals (Figure 5-S1, n=8/12), and ii) that each hub identifies the location of a regenerating manubrium, which can remain separate (two hubs) or fuse (fused hub), (Figure 5H, n=6/20).

Taken together, these results show that manubrium regeneration is triggered at the hub of smooth muscle fibers, while initiation of regeneration depends on the concomitant presence of at least one radial canal. The remodeling process defines a new point of convergence for the radially oriented smooth muscle fibers (“muscle hub”), which in turn identifies the position of a potential manubrium.

Actomyosin-driven subumbrella remodeling restores medusa shape

Closer examination of the tissue behavior of bisected medusae provided insights into the mechanisms underlying shape restoration after fragmentation. Within the first two hours from dissection, subumbrellar and exumbrellar layers fuse together (Figure 6A,B). In the following hours, myoepithelial tissues around the wound site constrict, progressively reducing the cut edge perimeter (Figure 6B). This active wound closure process draws together the intact tissues at each end of the cut edge, rapidly restoring the dome-shaped bell (Figure 6B).

A continuous bundle of actin lines the remodeling edge (Figure 6D), reminiscent of the actin ring that has been described around wound sites in the exumbrella layer of *Clytia* (Kamran et al., 2017). The bundle resembles the purse-string structures tightening epithelial wounds in several species, through a contraction of actin/myosin cables stretching over cells at wound edges (Begnaud et al., 2016; Schwayer et al., 2016). The phosphorylation of myosin-II regulatory light chain (MRLC), detected around the wound area by antibody staining (Figure 6D), is consistent with a local stimulation of the actomyosin contraction system. Treatment with myosin II inhibitors (Blebbistatin and BDM; Herrmann et al., 1992; Ostap, 2002; Forer et

al., 2005) impaired umbrella remodeling, providing further evidence that force generation depends on actomyosin (Figure 6E, 6-S1).

A comparable "symmetrization" process described in damaged *Aurelia* ephyrae was proposed to depend on rhythmic contractions of the striated muscles (Abrams et al., 2015). Newly fragmented *Clytia* indeed undergo vigorous contractions (not shown). Treatment with the anesthetic menthol, which efficiently blocks umbrella contractions, slightly delayed bisected medusa remodeling, hinting that striated muscle rhythmic contractions may only facilitate medusa shape restauration (Figure 5F).

These results suggest that actomyosin-dependent tissue remodeling is the major driver of *Clytia* medusa shape restoration. Actomyosin cables assemble in response to diverse types of wound, which similarly affect the remodeling process after manubrium ablation (Figure 6-S2). Contractions of the striated circular muscles accelerate remodeling but are not required, unlike what previously suggested for *Aurelia* ephyrae (Abrams et al., 2015). We postulate that the actomyosin based contraction of the wound site drives the formation of the radial smooth muscle hub that positions the manubrium during regeneraton (see above)**.**

Tracing experiments and filamentous actin staining (see Methods) demonstrate that bell remodeling is accompanied by an extensive reorganization within the area close to the wound, of both the radial subumbrellar muscle layer (Figure 6B,C) and of the underlying mesoglea (not shown). During the constriction phase, the tissues adjacent to the wound area are compressed; which correlates with the smooth muscle fibers loosening their radial alignment and disorganizing (Figure 6C, 6hpd). By 12 hpd, the still recognizable muscle fibers are variably arranged, but twelve hours later the smooth muscle fibers comprised between the site of manubrium anlage and circular canals reacquire a radial orientation, newly matching the final shape of the remodeled medusa. Thus, during Clytia medusa regeneration, manubrium reformation is directed by the formation of the smooth muscle hub, which in turn is the product of remodeling of the subumbrellar tissue of the bell.

Discussion

Swimming *Clytia* medusae cope efficiently with diverse damage, rapidly recovering a stable, functional, body organization. Our experiments demonstrate that this flexibility stems from the integration of 1) local structural signals generated by the remodeling process, which

redefine positional information within the umbrella, and of 2) long-range migration of progenitors cells, coupled to localized cell proliferation, which fuel the rapid restoration of missing organs. Mechanical forces exerted by an actomyosin cable assembling around the wound likely play key roles in the recovery of the medusa form.

The basic grammar of medusae regeneration

Medusae respond to damage by activating a stereotypic wound healing process. The mesoglea is sealed off by the fusion of subumbrella and exumbrella layers, and an actomyosin cable assembles at the cut edge. This cable gradually constricts the exposed surface, closing any gap in the umbrella and re-establishing the circular medusa shape. This remodeling rearranges any surviving element in the umbrella (canals, gonads, manubrium), and modifies the organization of radial smooth muscle fibers in the subumbrellar layer. The local compression of radial fibers at the wound site leads to the formation of a “muscle hub” which defines the site for a new manubrium. The combined presence of a smooth muscle hub and at least one radial canal is sufficient to support the regeneration of a new manubrium. Manubrium regeneration is highly stereotypical and is sustained by targeted migration of progenitor cells through the radial canals (from other organs). Gonads and tentacle bulbs can also regenerate, but less efficiently. The native tetraradial symmetry is usually not reestablished, and the novel global positional information within the umbrella emerges from the integration of local signaling sources, corresponding to “structural” elements. The characteristic tetraradial symmetry is likely defined during development of the medusa bud, while local interactions between the elements of the medusa system might maintain it during growth and homeostasis.

A system-level coordination of cellular behaviors

Manubrium regeneration relies on the integration of different cellular sources, proliferating epithelial cells, migrating i-cells and circulating differentiated (gastro-dermal) cells. Cell tracking experiments demonstrated a substantial contribution of multiple cell types converging to the primordium site from other organs, notably the gonads, through the radial canals. Such cells display a differential behavior according to their degree of differentiation: multipotent stem cells (i-cells) directionally migrate towards the regeneration site, and start proliferating both within the radial canals and at the primordium site, while differentiated gastro-dermal cells travelling through the gastrovascular canal system, can integrate into the

endoderm of other organs. The untargeted migration of gastro-dermal cells was also observed in physiological conditions, and likely plays a role in the metabolic regulation of the medusa. The targeted migration of progenitor cells has been shown to contribute to regenerative processes in multiple species, including planarians and *Hydractinia* (Atabay et al., 2018; Bradshaw et al., 2015). The different behavioral patterns of distinct recruited cell populations in *Clytia* medusa offer a unique system for studying the mechanism controlling cell movements.

Uncoupling remodeling and proliferative phenomena

The proliferation of progenitor cells to restore missing structures and the remodelling of surviving tissues to reset anatomical proportions have long been recognized as two complementary aspects of regenerative processes (Morgan, 1900); employed to varying degrees by different regenerating species. The source of regenerative materials and the proliferative events unfolding at the cut site have received considerable attention (eg. *Nematostella*, annelids, salamander, (Amiel et al., 2015; Özpolat and Bely, 2016; Passamaneck and Martindale, 2012; Planques et al., 2019; Sandoval-Guzmán et al., 2014; Tanaka and Reddien, 2011)). Remodelling processes, which re-specify the positional information, have been shown in *Hydra*, annelid and planarian regeneration (Agata et al., 2007; Chera et al., 2009; Pellettieri et al., 2010), but remain poorly characterized (Pellettieri, 2019). Disentangling the relative contributions of proliferation and tissue remodeling is, in most regenerating animals, challenging, due to the fact that the phenomena are often temporally undistinguishable, and overlap spatially. Anterior pole regeneration in planarians relies on the instructive role of the wound site, which patterns the in situ-forming blastema, and integrates it with the rest of surviving tissues, re-establishing body proportions (Oderberg et al., 2017; Reddien and Alvarado, 2004). Body re-proportioning and blastema formation are however independent processes, as shown by shifts in position-dependent gene expression in irradiated planarians (Gurley et al., 2010; Petersen and Reddien, 2009; Reddien et al., 2007).

The sequential regenerative process observed in *Clytia* medusae, and their circular geometry, allows decoupling the sites of wounding, remodeling and blastema positioning. Wounding activates the actomyosin-powered remodeling process that modifies the organization of undamaged tissues. The result is the identification of a new landmark within the umbrella, emerging from the union of discontinuous tissues, the smooth "muscle hub". Cell proliferation-dependent regeneration of missing organs (the manubrium) will then be

triggered at the muscle hub forming a blastema. Interestingly, longitudinal muscles have been shown to be required in blastemal formation in planarians (Scimone et al., 2017; Witchley et al., 2013) and comparable smooth muscle hubs are also early landmark of regenerating tip in both *Hydra* (Livshits et al., 2017) and planarians (Scimone et al., 2017). The temporal and spatial separation of the regenerative phases observed in *Clytia* offers a paradigm for addressing the contributions of each process (wound healing, muscle and epithelium remodeling, blastema formation) to the restoration of body parts and organs after injury.

Tension-driven pattern formation and morphogenesis

Understanding how organisms achieve their shape is one of the fundamental questions of biology. The positional information model (Wolpert, 1969), despite being traditionally associated to chemical cues, exemplified by the action of gradient of morphogens, did not originally make assumptions about the nature of the signal, and it is now clear that generation of forms in biological systems depends on the integration of different type of signals, both of chemical and mechanical origin (Chiou and Collins, 2018; Green and Sharpe, 2015; Ingber, 2003; Urdy, 2012; Vining and Mooney, 2017). *Hydra* regeneration, the classic model where morphogen gradient-based patterning has been studied and theorized (e.g. (Bode, 2009; Gierer and Meinhardt, 1972), depends also on the original organization of the actomyosin cytoskeleton; the axis of regenerating fragments is determined by the alignment of the supra-cellular contractile actomyosin fibers (Livshits et al., 2017; Mercker et al., 2015).

The active remodeling process seen in *Clytia* medusae, based on the actomyosin-powered constriction of cut edges, restores the circular shape, and rearranges umbrella structures. The damaged radial smooth muscle fibers in the subumbrellar layer are brought together and heavily reorganized. The crammed smooth muscle fibers, initially locally disorganized, are predictably reorganized into an emergent landmark in the umbrella, the "muscle hub", which, in presence of at least one radial canal, triggers the regeneration of a new manubrium. Experimental uncoupling of hubs and radial canals suggests that the hub is not simply an anatomical by-product of remodeling, but that it represents a novel feature of the umbrella, which will anchor an emerging self-organizing unit constituted by the manubrium and the eventual radial canals that will form (and the gonads that will regenerate along them). The possibility that this site represents a signaling center remains to be explored.

The key event in the emergence of the muscle hub appears to be the transition from the crammed, disorganized (relaxed) fibers adjacent to the wound site, to the characteristically radially-ordered array. This observation suggests that the formation of a hub might depend on the forces exerted by the intact segment of radial muscles, which progressively pull away from the periphery of the umbrella the merging point of muscle fibers. In the developing striated flight muscles of Drosophila, the attachment of developing muscles cells to tendons increase the tension in the system, and triggers myofibril self-organization thorough the entire muscle fiber (Weitkunat et al., 2014). Similarly, in *Clytia* the uninjured anchoring of radial muscle fibers to the stiffer circular canal might sustain the novel buildup of radial tensions within the stretched and compressed umbrella, and promote the assembly of actomyosin fibers in the epitheliomuscular cells perturbed by the remodeling – inducing the organization of the hub and progressively pulling the (eventual) regenerating anlage towards the center.

The epitheliomuscular cells lining the subumbrella of the medusa are a type of epithelial cells, featuring a primary cilium, and containing smooth actomyosin fibers orderly aligned among the radial axis. The coordinated re-orientation of smooth muscle fibers in the subumbrella might be controlled by the Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) pathway, which directly communicates polarity cues to the cytoskeleton of neighboring epithelial cells, in both invertebrate and vertebrate epithelia (Seifert and Mlodzik, 2007). Local feedback loops are able to orient small groups of cells, but in silico simulations have shown that the range of action of PCP signaling is local, and that a long-range cue is further necessary to globally align the axis (Amonlirdviman et al., 2005; Burak and Shraiman, 2009). In Drosophila wing disk the planar polarity of epithelial cells is set up early during development, and is later remodeled at the pupal stage, when cells rearrange and globally orient along the proximo-distal axis of the elongating wing (Carvajal-Gonzalez and Mlodzik, 2014; Sagner et al., 2012). The exact nature of the cue remains unclear, but contractility of the wing hinge has been shown to alter the tissue shape, subjecting cells to anisotropic tensions in the proximal-distal axis, which re-orient cell polarity (Aigouy et al., 2010; de la Loza and Thompson, 2017). The asymmetric force generated by the intact portion ending of radial muscle fibers might play an analogous organizing role in *Clytia* subumbrella, and contribute to the local re-alignment of muscle fibers, mediated by PCP signalling. Wnt/PCP signaling has been shown to orient ciliated epithelial cell in the larva of Clytia (Momose et al., 2012).

Our findings do not exclude the possibility that radial molecular gradients might be present within the umbrella, regionalizing the centro-peripheral axis. In planarians ‘Positional Control Genes’ (PCGs) encode a coordinate system that provides a positional reference throughout

the body (Reddien, 2018). PCGs are expressed in the body wall muscles, which perform both contractile and signaling roles (Cebrià, 2016; Cutie et al., 2017). Following amputation, muscle fibers alter their PCG expression profiles to reestablish a complete coordinate system, generating the pre-pattern that will direct the restoration of structures and proportions (Witchley et al., 2013). Patterning along the antero-posterior axis has been shown to depend on a Wnt/β-catenin signaling-circuit (Petersen and Reddien, 2009; Scimone et al., 2016). Wnt/β-catenin signaling has key role in patterning the primary body axis also of regenerating *Hydra* polyps, and might represent a clear candidate contributing to the control of *Clytia* patterning (Hobmayer et al., 2000; Nakamura et al., 2011). The sequential action of both canonical Wnt signaling and PCP/Wnt signaling have been shown to be necessary for the specification and orientation of muscle cells in vertebrate embryos: myogenesis in chick is initiated by the Wnt/β-catenin-dependent pathway, which specifies myocyte cell fates and activates wnt11 expression, which orients, through the PCP pathway, to myocytes elongation along the antero-posterior axis of the embryo (Gros et al., 2009).

The morphogenesis of the regenerating manubrium relies on the localized proliferation of progenitor cells and its final symmetry correlates with the number of adjoining radial canals. The possibility of experimentally uncoupling the global symmetry of the medusa from the symmetry of isolated regenerating organs (Figure 4), indicates that the shape of the manubrium does not depend on a native, constitutionally active, rotational patterning system, but that is instead locally specified. The canals joining at the muscle hub are associated to thicker smooth muscle fibers (Figure 4-S1), which extend to the incipient blastema; while the other radial muscle fibers in the subumbrella are still organizing at the level of the discontinuity with the emerging anlage. Interestingly, the application of directional mechanical stresses has been shown to drive cell proliferation and differentiation in cell aggregates, in a stress magnitude-dependent pattern (Li et al., 2009), which could provide an explanation for the differential growth of the primordium. The emergence of the initial tubular anlage might be also mechanically-controlled, and depend on actomyosin interaction with the underlying mesoglea, in a process similar to has been described for branching morphogenesis. During epithelial branching, for example in the morphogenesis of salivary glands, cells exert intrinsic actomyosin contractility and traction forces on the ECM, which assembles at the cleft region and promotes cell proliferation in the budding region (reviewed in (Vining and Mooney, 2017)).

Materials and methods

Clytia hemisphaerica husbandry

Clytia medusae were clonally grown from Z4B female colony (see (Leclère et al., 2019) for further information on the genome and the establishment of the line), in the Clytia facility at IMEV, according to the method developed by Lechable et al., *in prep.* (custom-made closed system, at 18°C, fed with Artemia sp. nauplii). We performed all experiments on medusae 11-14 days old (diameter 0.5 – 0.8 cm), corresponding to newly matured medusae (spawning). Selected animals were not fed for at least 12 hours prior to experiments; and generally not fed during regeneration, with the exception of some of the gonad and bulb-regeneration experiments and of the fluorescent beads assay (see later).

Surgical procedures

Surgical manipulations were performed on agarose-coated petri dishes (2% agarose in filtered artificial sea water or FASW), by means of custom-made tools made of fine planum wire, acupuncture needles, pipette tips of diverse diameters, dowell scissors (Fine Science Tools, catalogue #15040-11), fine forceps (Fine Science Tools, catalogue #11370-40), fine scalpels. For manipulations, animals were relaxed either with ice-cold water or menthol (400 µM). Tentacles were trimmed with fine scissors, to avoid damages to the animals due to entangling. Operated animals were kept in a clean multi-well plate, in ca 1.5 ml of filtered artificial sea water with antibiotics (penicillin plus streptomycin), changed at least once per day; multi-well plates were kept in an incubator, at 18°C, agitating.

Organ dissections were performed either by punching out the corresponding area in the umbrella using an appropriately-sized pipette tip (thus generating a hole across subumbrella, mesoglea and exombrella), or by excising the targeted organ by means of forceps and a scalpel or with custom made wire tools (minimizing umbrella damage). Grafts were performed by means of acupuncture needles, used to stich fragments together, and fine forceps.

Experiments were monitored at least once per day, and pictures were taken when necessary. For imaging, animals were briefly relaxed with menthol (400 µM).

In-vivo cell labeling experiments

EdU labeling was performed by incubating medusae in a 100 µM solution, for the designed amount of time (pulse and pulse-chase experiments). Animals were then fixed with 4% paraformaldehyde in FAWS, for one hour, then rinsed with 1x PBS. Staining was performed with the EdU Click-It kit (Alexa Fluor 555 kit; ThermoFisher #C10338), following the manufacturer protocol (BSA not added). Nuclei were contrasted with Hoechst 33258 (30 minutes incubation).

Fluorescent beads labeling (FluoSpheres, Molecular Probes #F8812) was performed by feeding animals with hatched artemia mixed to beads. Beads are ingested and retained by gastro-endodermal cells.

Chemical treatments

Cell proliferation was blocked by treating animals with hydroxyurea (Sigma-Aldrich #H8627), at a 10 mM concentration. Solution was renewed twice a day. Muscle contraction was inhibited by means of: 34 mM blebbistatin in DMSO (Sigma-Aldrich #B0560), 8mM BDM in FASW (2,3-Butanedione monoxime; Sigma-Aldrich #B0753), 400 µM menthol dissolved in ethanol, (ethanol 1:2500 final).

In situ Hybridization, immunostaining and phalloidin staining

Fluorescent in situ hybridization and probe synthesis were performed according to the urea-based protocol in (Sinigaglia et al., 2018). For immunostaining, animals were fixed for 2 hours with PFA 4% in buffer, rinsed and permeabilized with 1X PBS plus Triton X-100, blocked and incubated with the anti-tyrosinated tubulin antibody YL1/2 (1:50, rat; Abcam #6160), revealed by a goat anti-rat secondary antibody coupled to Alexa 488 or 594 (1:200; Thermo-Fisher #A-11006 and #A-11007), and mounted in Citifluor AF-1 (Citifluor, catalogue #AF1-100) for imaging. Actin fibers were stained with 1:100 phalloidin coupled to Alexa 488 (Fisher Scientific #10125092; solubilized in methanol, and dried prior to use), following fixation with 4% formaldehyde in 1X FASW or with HEPES buffer. For FISH plus EdU reaction, the EdU click-It reaction was performed after the TSA reaction of FISH. For the EdU plus immunostaining experiments, immunostaining followed the click-It reaction. Nuclei were counterstained with 1 µM/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, catalogue #94403).

Image acquisition and processing

Macroscopic images were taken with a Sony camera (NEX-5R), mounted on a Olympus stereoscope (SZ61). Fluorescent images were taken with the Zeiss Axio Imager A2 microscope and with the Leica SP8 confocal microscope. Image processing (maximum projection, color display), and quantifications were done with the Fiji software. Figures were composed with Illustrator CS6 (Adobe).

Acknowledgements

We thank J. Lupette, S. Rei-Rosa, P. Freschu, G. Perez and S. Chevalier for technical assistance, and S. Collet, L Gissat, A. Jan and L. Gilletta for animal maintenance. We thank Yulia Kraus for grafting advice. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-PDOC-0016), PhD fellowships for SP from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT201805005536), as well as core CNRS and Sorbonne University funding to the LBDV. We thank the Marine Resources Centre (CRBM and PIV imaging platform) of Institut de la Mer de Villefranche (IMEV) that is supported by EMBRC-France, whose French state funds are managed by the ANR within the Investments of the Future program (ANR-10-INBS-02).

References

Abrams, M.J., Basinger, T., Yuan, W., Guo, C.-L., and Goentoro, L. (2015). Self-repairing symmetry in jellyfish through mechanically driven reorganization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, E3365-3373.

Agata, K., Saito, Y., and Nakajima, E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. Dev. Growth Differ. *49*, 73–78.

Aigouy, B., Farhadifar, R., Staple, D.B., Sagner, A., Röper, J.-C., Jülicher, F., and Eaton, S. (2010). Cell flow reorients the axis of planar polarity in the wing epithelium of Drosophila. Cell *142*, 773–786.

Amiel, A.R., Johnston, H.T., Nedoncelle, K., Warner, J.F., Ferreira, S., and Röttinger, E. (2015). Characterization of Morphological and Cellular Events Underlying Oral Regeneration in the Sea Anemone, Nematostella vectensis. Int J Mol Sci *16*, 28449–28471.

Amonlirdviman, K., Khare, N.A., Tree, D.R., Chen, W.-S., Axelrod, J.D., and Tomlin, C.J. (2005). Mathematical modeling of planar cell polarity to understand domineering nonautonomy. Science *307*, 423–426.

Atabay, K.D., LoCascio, S.A., de Hoog, T., and Reddien, P.W. (2018). Self-organization and progenitor targeting generate stable patterns in planarian regeneration. Science *360*, 404–409.

Begnaud, S., Chen, T., Delacour, D., Mège, R.-M., and Ladoux, B. (2016). Mechanics of epithelial tissues during gap closure. Curr. Opin. Cell Biol. *42*, 52–62.

Bely, A.E., and Nyberg, K.G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. Trends in Ecology & Evolution *25*, 161–170.

Bode, H.R. (2009). Axial patterning in hydra. Cold Spring Harb Perspect Biol *1*, a000463.

Bradshaw, B., Thompson, K., and Frank, U. (2015). Distinct mechanisms underlie oral vs aboral regeneration in the cnidarian Hydractinia echinata. Elife *4*, e05506.

Burak, Y., and Shraiman, B.I. (2009). Order and stochastic dynamics in Drosophila planar cell polarity. PLoS Computational Biology *5*, e1000628.

Carvajal-Gonzalez, J.M., and Mlodzik, M. (2014). Mechanisms of planar cell polarity establishment in Drosophila. F1000prime Reports *6*.

Cebrià, F. (2016). Planarian body-wall muscle: regeneration and function beyond a simple skeletal support. Frontiers in Cell and Developmental Biology *4*, 8.

Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.-C., and Galliot, B. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. Dev. Cell *17*, 279–289.

Chiou, K., and Collins, E.-M.S. (2018). Why we need mechanics to understand animal regeneration. Developmental Biology *433*, 155–165.

Cutie, S., Hoang, A.T., Payumo, A.Y., and Huang, G.N. (2017). Unconventional functions of muscles in planarian regeneration. Developmental Cell *43*, 657–658.

Denker, E., Manuel, M., Leclère, L., Le Guyader, H., and Rabet, N. (2008). Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of Clytia hemisphaerica (Hydrozoa, Cnidaria). Dev. Biol. *315*, 99–113.

DuBuc, T.Q., Traylor-Knowles, N., and Martindale, M.Q. (2014). Initiating a regenerative response; cellular and molecular features of wound healing in the cnidarian Nematostella vectensis. BMC Biol. *12*, 24.

Gahan, J.M., Bradshaw, B., Flici, H., and Frank, U. (2016). The interstitial stem cells in Hydractinia and their role in regeneration. Curr. Opin. Genet. Dev. *40*, 65–73.

Galliot, B. (2012). Hydra, a fruitful model system for 270 years. Int. J. Dev. Biol. *56*, 411–423.

Gierer, A., and Meinhardt, H. (1972). A theory of biological pattern formation. Kybernetik *12*, 30–39.

Green, J.B., and Sharpe, J. (2015). Positional information and reaction-diffusion: two big ideas in developmental biology combine. Development *142*, 1203–1211.

Gros, J., Serralbo, O., and Marcelle, C. (2009). WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. Nature *457*, 589.

Gurley, K.A., Elliott, S.A., Simakov, O., Schmidt, H.A., Holstein, T.W., and Alvarado, A.S. (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. Developmental Biology *347*, 24–39.

Hargitt, C.W. (1899). Experimental studies upon Hydromedusae. The Biological Bulletin *1*, 35–51.

Hargitt, G.T. (1903). Regeneration in hydromedusae. Development Genes and Evolution *17*, 64–91.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbächer, U., and Holstein, T.W. (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. Nature *407*, 186–189.

Houliston, E., Momose, T., and Manuel, M. (2010). Clytia hemisphaerica: a jellyfish cousin joins the laboratory. Trends Genet. *26*, 159–167.
Ingber, D.E. (2003). Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. International Journal of Developmental Biology *50*, 255–266.
Kamran, Z., Zellner, K., Kyriazes, H., Kraus, C.M., Reynier, J.-B., and Malamy, J.E. (2017). In vivo imaging of epithelial wound healing in the cnidarian Clytia hemisphaerica demonstrates early evolution of purse string and cell crawling closure mechanisms. BMC Dev. Biol. *17*, 17.
Leclère, L., and Röttinger, E. (2016). Diversity of Cnidarian Muscles: Function, Anatomy, Development and Regeneration. Front Cell Dev Biol *4*, 157.
Leclère, L., Jager, M., Barreau, C., Chang, P., Le Guyader, H., Manuel, M., and Houliston, E. (2012). Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian Clytia. Dev. Biol. *364*, 236–248.
Leclère, L., Copley, R.R., Momose, T., and Houliston, E. (2016). Hydrozoan insights in animal development and evolution. Curr. Opin. Genet. Dev. *39*, 157–167.
Leclère, L., Horin, C., Chevalier, S., Lapébie, P., Dru, P., Peron, S., Jager, M., Condamine, T., Pottin, K., Romano, S., et al. (2019). The genome of the jellyfish Clytia hemisphaerica and the evolution of the cnidarian life-cycle. Nat Ecol Evol *3*, 801–810.
Li, B., Li, F., Puskar, K.M., and Wang, J.H. (2009). Spatial patterning of cell proliferation and differentiation depends on mechanical stress magnitude. Journal of Biomechanics *42*, 1622–1627.
Livshits, A., Shani-Zerbib, L., Maroudas-Sacks, Y., Braun, E., and Keren, K. (2017). Structural inheritance of the actin cytoskeletal organization determines the body axis in regenerating Hydra. Cell Reports *18*, 1410–1421.
de la Loza, M.D., and Thompson, B.J. (2017). Forces shaping the Drosophila wing. Mechanisms of Development *144*, 23–32.
Mercker, M., Köthe, A., and Marciniak-Czochra, A. (2015). Mechanochemical symmetry breaking in hydra aggregates. Biophysical Journal *108*, 2396–2407.
Momose, T., Kraus, Y., and Houliston, E. (2012). A conserved function for Strabismus in establishing planar cell polarity in the ciliated ectoderm during cnidarian larval development. Development *139*, 4374–4382.
Momose, T., De Cian, A., Shiba, K., Inaba, K., Giovannangeli, C., and Concordet, J.-P. (2018). High doses of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein efficiently induce gene knockout with low mosaicism in the hydrozoan Clytia hemisphaerica through microhomology-mediated deletion. Sci Rep *8*, 11734.
Morgan, T.H. (1899). Regeneration in the Hydromedusa, Gonionemus vertens. The American Naturalist *33*, 939–951.
Morgan, T.H. (1900). Regeneration in planarians. Development Genes and Evolution *10*, 58–119.
Nakamura, Y., Tsiairis, C.D., Özbek, S., and Holstein, T.W. (2011). Autoregulatory and repressive inputs localize Hydra Wnt3 to the head organizer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 9137–9142.
Neppi, V. (1918). Sulla rigenerazione nelle idromeduse. Pubblicazioni Della Stazione Zoologica Di Napoli *2*, 191–207.
Oderberg, I.M., Li, D.J., Scimone, M.L., Gaviño, M.A., and Reddien, P.W. (2017). Landmarks in Existing Tissue at Wounds Are Utilized to Generate Pattern in Regenerating Tissue. Curr. Biol. *27*, 733–742.
Özpolat, B.D., and Bely, A.E. (2016). Developmental and molecular biology of annelid regeneration: a comparative review of recent studies. Current Opinion in Genetics & Development *40*, 144–153.
Passamaneck, Y.J., and Martindale, M.Q. (2012). Cell proliferation is necessary for the regeneration of oral structures in the anthozoan cnidarian Nematostella vectensis. BMC Dev. Biol. *12*, 34.
Pellettieri, J. (2019). Regenerative tissue remodeling in planarians–The mysteries of morphallaxis. In Seminars in Cell & Developmental Biology, (Elsevier), pp. 13–21.
Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D.R., and Alvarado, A.S. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. Developmental Biology *338*, 76–85.
Petersen, C.P., and Reddien, P.W. (2009). A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 17061–17066.
Planques, A., Malem, J., Parapar, J., Vervoort, M., and Gazave, E. (2019). Morphological, cellular and molecular characterization of posterior regeneration in the marine annelid Platynereis dumerilii. Developmental Biology *445*, 189–210.
Raz, A.A., Srivastava, M., Salvamoser, R., and Reddien, P.W. (2017). Acoel regeneration mechanisms indicate an ancient role for muscle in regenerative patterning. Nat Commun *8*, 1260.
Reddien, P.W. (2018). The cellular and molecular basis for planarian regeneration. Cell *175*, 327–345.
Reddien, P.W., and Alvarado, A.S. (2004). Fundamentals of planarian regeneration. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *20*, 725–757.

Reddien, P.W., Bermange, A.L., Kicza, A.M., and Alvarado, A.S. (2007). BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. Development *134*, 4043–4051.
Sagner, A., Merkel, M., Aigouy, B., Gaebel, J., Brankatschk, M., Jülicher, F., and Eaton, S. (2012). Establishment of global patterns of planar polarity during growth of the Drosophila wing epithelium. Current Biology *22*, 1296–1301.
Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., Tazaki, A., Joven, A., Tanaka, E.M., and Simon, A. (2014). Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. Cell Stem Cell *14*, 174–187.
Schaffer, A.A., Bazarsky, M., Levy, K., Chalifa-Caspi, V., and Gat, U. (2016). A transcriptional time-course analysis of oral vs. aboral whole-body regeneration in the Sea anemone Nematostella vectensis. BMC Genomics *17*, 718.
Schmid, V. (1974). Regeneration in medusa buds and medusae of Hydrozoa. American Zoologist *14*, 773–781.
Schmid, V., and Alder, H. (1984). Isolated, mononucleated, striated muscle can undergo pluripotent transdifferentiation and form a complex regenerate. Cell *38*, 801–809.
Schmid, V., and Tardent, P. (1971). The reconstitutional performances of the Leptomedusa Campanularia jonstoni. Marine Biology *8*, 99–104.
Schmid, V., Schmid, B., Schneider, B., Stidwill, R., and Baker, G. (1976). Factors effecting manubrium-regeneration in hydromedusae (Coelenterata). Development Genes and Evolution *179*, 41–56.
Schwayer, C., Sikora, M., Slováková, J., Kardos, R., and Heisenberg, C.-P. (2016). Actin Rings of Power. Dev. Cell *37*, 493–506.
Scimone, M.L., Cote, L.E., Rogers, T., and Reddien, P.W. (2016). Two FGFRL-Wnt circuits organize the planarian anteroposterior axis. Elife *5*.
Scimone, M.L., Cote, L.E., and Reddien, P.W. (2017). Orthogonal muscle fibres have different instructive roles in planarian regeneration. Nature *551*, 623–628.
Seifert, J.R., and Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. Nature Reviews Genetics *8*, 126.
Sinigaglia, C., Thiel, D., Hejnol, A., Houliston, E., and Leclère, L. (2018). A safer, urea-based in situ hybridization method improves detection of gene expression in diverse animal species. Developmental Biology *434*, 15–23.
Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. Developmental Cell *21*, 172–185.
Urdy, S. (2012). On the evolution of morphogenetic models: mechano-chemical interactions and an integrated view of cell differentiation, growth, pattern formation and morphogenesis. Biological Reviews *87*, 786–803.
Vining, K.H., and Mooney, D.J. (2017). Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. Nature Reviews Molecular Cell Biology *18*, 728.
Weitkunat, M., Kaya-Çopur, A., Grill, S.W., and Schnorrer, F. (2014). Tension and force-resistant attachment are essential for myofibrillogenesis in Drosophila flight muscle. Current Biology *24*, 705–716.
Witchley, J.N., Mayer, M., Wagner, D.E., Owen, J.H., and Reddien, P.W. (2013). Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. Cell Rep *4*, 633–641.
Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. J. Theor. Biol. *25*, 1–47.

Figures

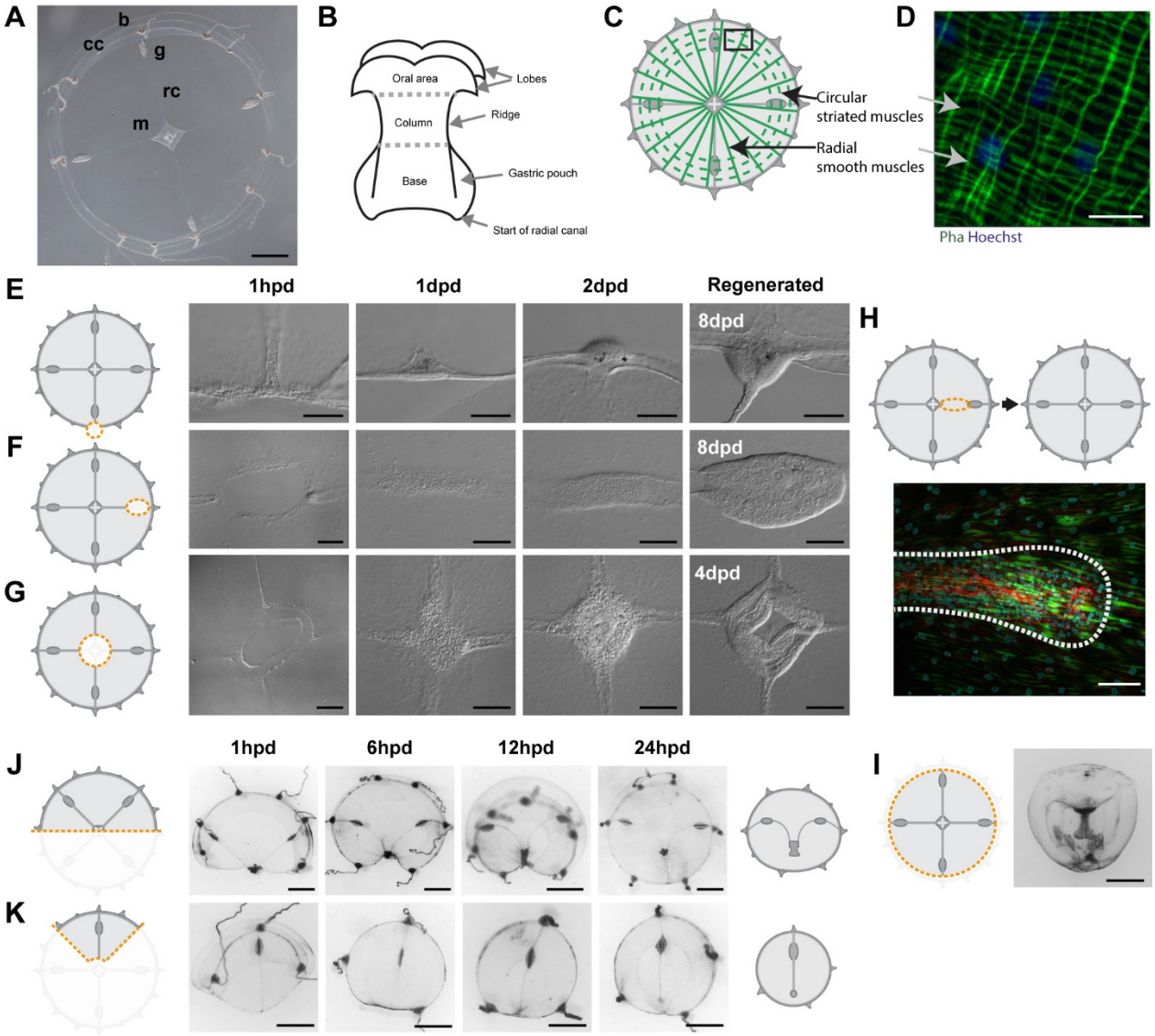


Figure 1 - Temporal and spatial segregation of wound healing, remodeling, and organ regeneration. (A-D) Anatomy of *Clytia* medusa. A) Female medusa, subumbrellar view. Umbrella is organized in four quadrants, each containing a radial canal (rc), a gonad (g), and up to four tentacle bulbs (b). The tetraradially shaped manubrium (m) lies at the centre. A peripheral circular canal (cc) connects the tentacle bulbs. B) Diagram of manubrium, oral (distal)- aboral (proximal) view. The gastric pouch is located at the base, connected to the four radial canals. C) The organization of musculature in the subumbrella. D) Detail of the peripheral area, showing phalloidin-stained striated and smooth muscle fibers. (E-G) All organs regenerate. E) Bulb regeneration. F) Gonad regeneration. G) Manubrium regeneration. (H) Radial canals regenerate. (I-K) Medusa remodeling. Scale bars: A,I-K: 1 mm; E-G: 100 µm; D,H: 20 µm.

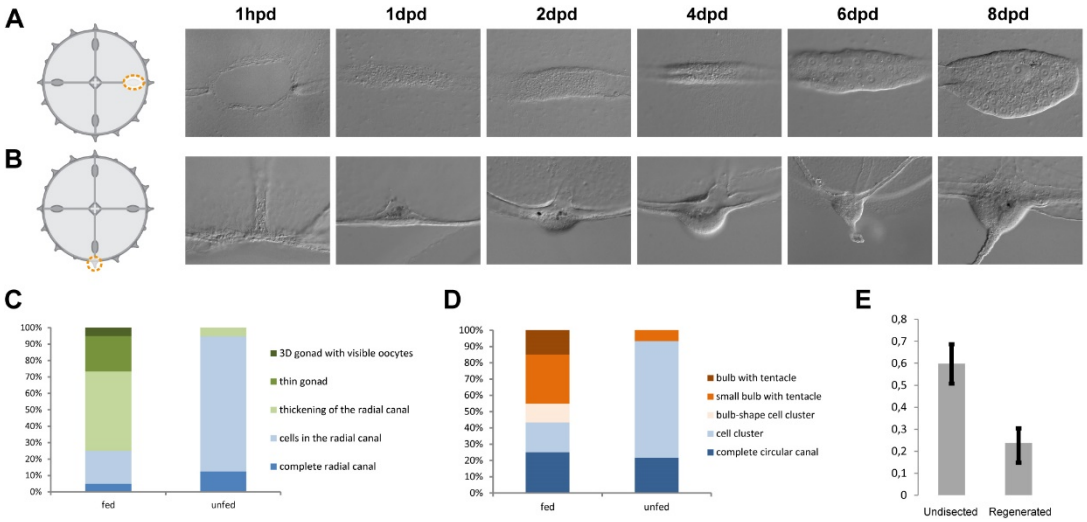


Figure 1.S1 – Gonad and tentacle regeneration. Gonad (A) and tentacle (B) regeneration takes about a week, and it depends on the feeding status of the medusa (C and D, respectively). (E) Size comparison between undissected (left) and fully regenerated manubria (total length from base to mouth, in mm).

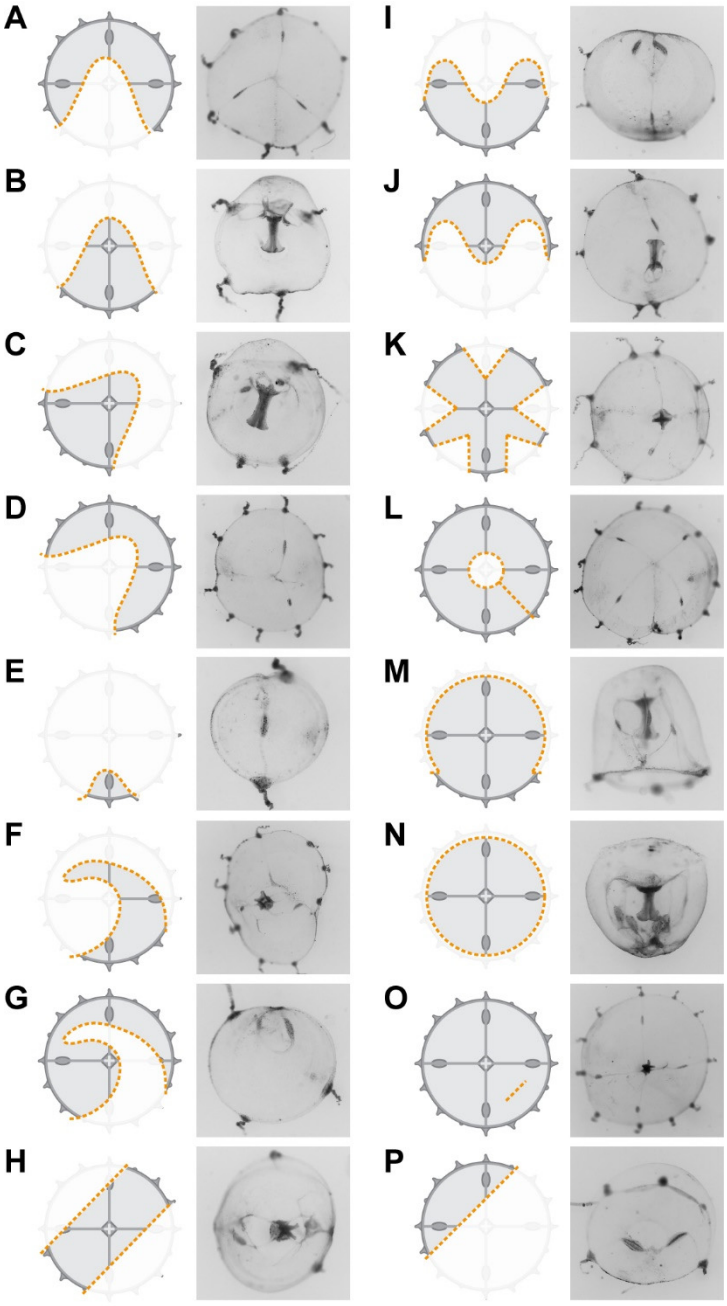


Figure 1.S2 – Medusa remodeling. Any type of damage (A-P) triggers the remodeling of the umbrella, driven by a rapid reduction of the exposed edges - which causes the fusion of all remaining segments of circular canals. The circular shape is always restored. Left: diagram of dissection (yellow dotted line), Right: resulting morphology.

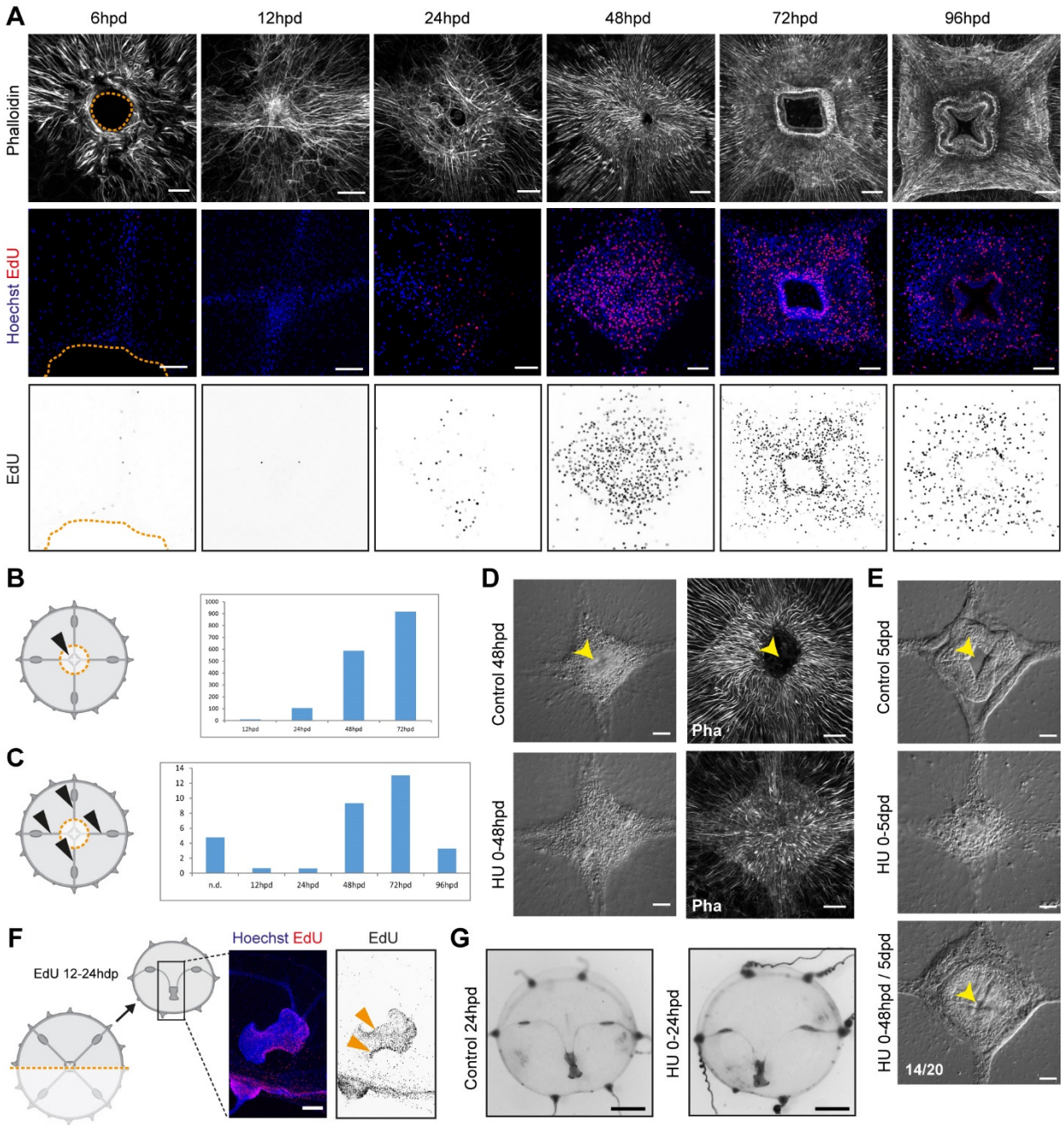


Figure 2 - Manubrium regeneration, but not umbrella remodeling, requires cell proliferation. (A-E) Proliferation-dependent manubrium regeneration. (A, B) EdU pulse labelling (in magenta, and in the black/white image) shows a peak of cell proliferation in the manubrium anlage, starting from 48 hpd, and peaking at 72 hpd. (C) After dissection, cell proliferation levels in the radial canals are reduced, and increase again at 48 hpd. At 96 hpd proliferation return to approximately the basal level. (D) Treatment with hydroxyurea (HU) shows that cell proliferation is not necessary for the initial accumulation of the cell mass. (E) Cell proliferation is instead necessary for the tubular outgrowth, and the correct formation of lobes. (F, G) Remodeling does not require cell proliferation. (F) Cells proliferate in the proximity of the remodeling margin, but (G) HU-treatment shows that proliferation is not necessary for a successful medusa shape restoration. Scale bars: A,D-F: 100 µm, G: 1 mm.

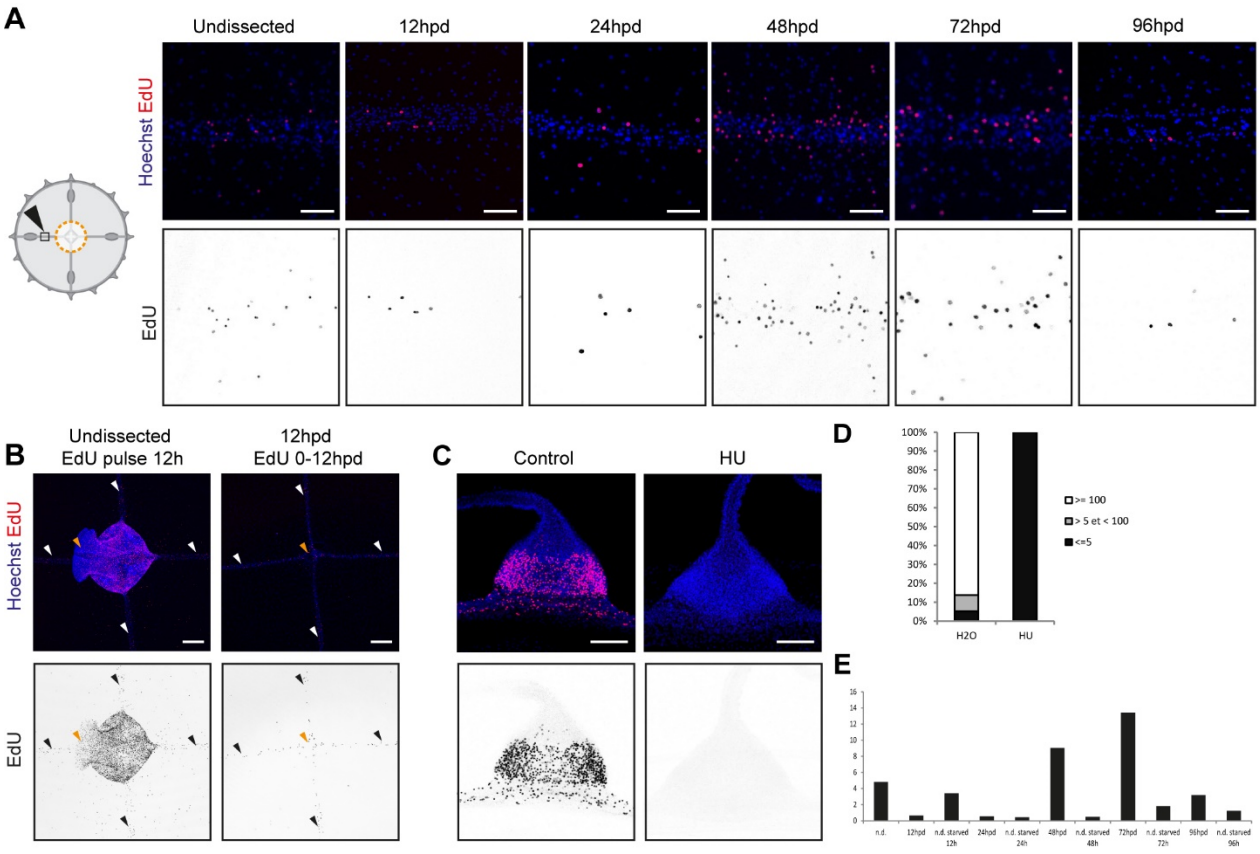


Figure 2.S1 – Dynamics of cell proliferation during regeneration. (A) Following manubrium ablation, EdU-labeled cell levels first drop, then increase between 48 hpd and 72 hpd, in the radial canals. (B) Proliferation in a regenerating vs non-regenerating medusae, over a 12 hs pulse. (C) HU-treatment successfully inhibits cell proliferation, as shown by the absence of EdU-positive cells in the tentacle bulb, a highly proliferating stem cell niche. (D) Proliferation levels are inhibited by HU-treatment, quantification. (E) Proliferation levels depend on the nutritional state of the animal.

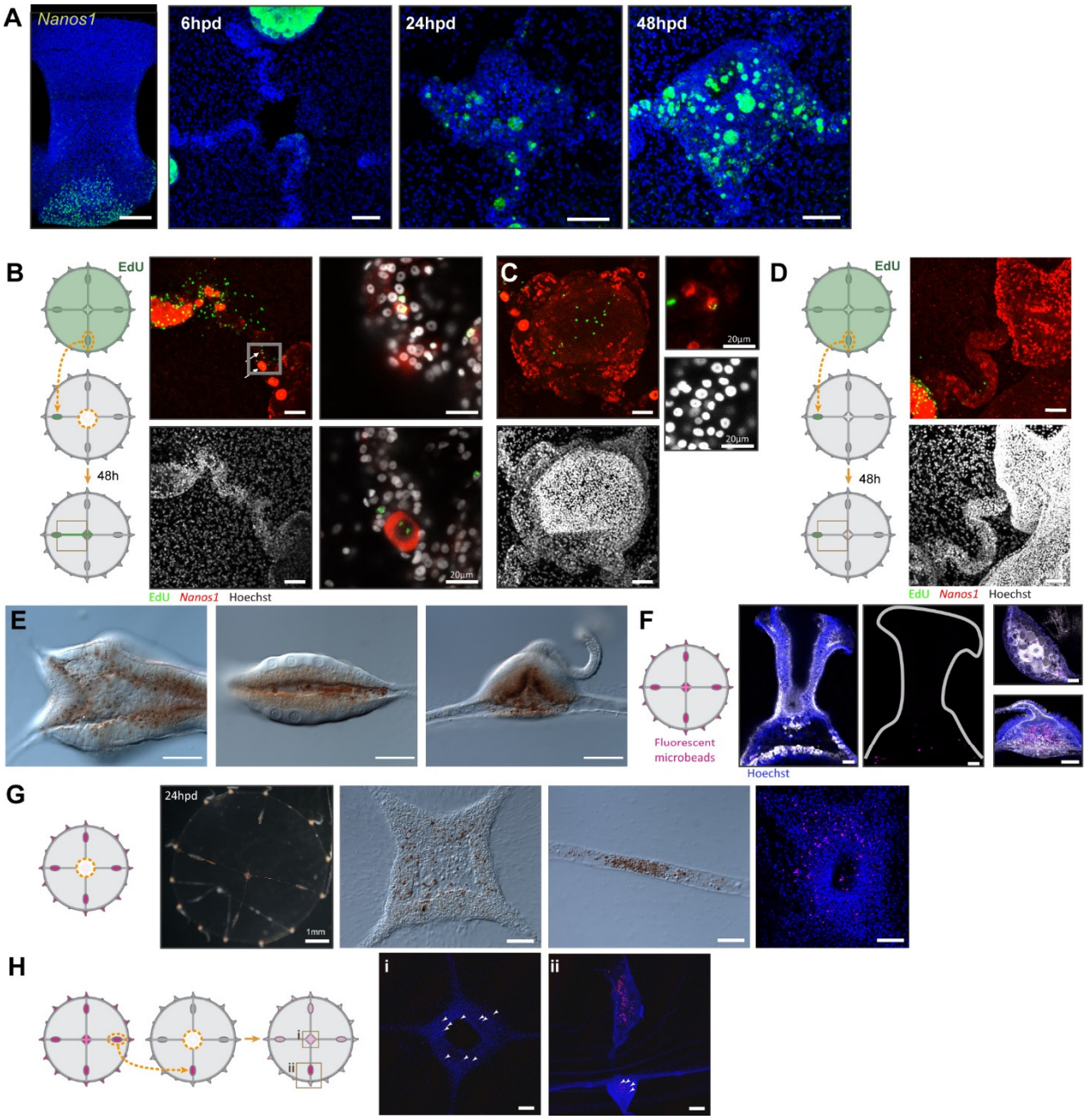


Figure 3 – Dynamics of cell migration during manubrium regeneration. (A-D) Targeted migration of stem cells during manubrium regeneration. (A) I-cells (shown by FISH for *Nanos1*), which are located at the base of the manubrium, are present in the regenerating anlage, and in the radial canals. (B) Grafting experiments demonstrate that stem cells migrate from the gonad to the site of manubrium regeneration. Diagram of experimental approach: a donor medusa is incubated with EdU for 24 hs, one gonad is then excised and placed at the site of one of the gonads of a non-treated receiver. After 48 hs cells positive for both *Nanos1* and EdU are found in the canal connecting grafted gonad to the regenerating manubrium and in the anlage itself. Some of the positive cells resemble maturing oocytes. (C) EdU-positive cells are still detectable in the fully regenerated manubrium. (D) In non-regenerating animals, there is no migration of EdU-positive cells targeting the manubrium anlage. (E-H) Non-targeted migration of gastro-endodermal cells. (E) Cells containing dark-tinted products of digestion are present in the endoderm of the three organs, manubrium, gonads and tentacle bulbs. (F) Fluorescent microbeads feeding labels the gastro-endoedermal cells, suggesting that they correspond to the brown-colored cells observable by transmitted light. (G) Brown cells accumulate in the regenerating anlage of manubrium-depleted medusae, moving through the radial canals. Fluorescent microbeads are similarly detected in the anlage. (H) Grafting of a fluorescent-bead labeled gonad to a naïve receiver shows that microbeads-labeled cells migrate in the regenerating anlage of the

manubrium (i), but not exclusively, and are found also in neighboring organs (ii). Scale bars: 100 µm, otherwise indicated.

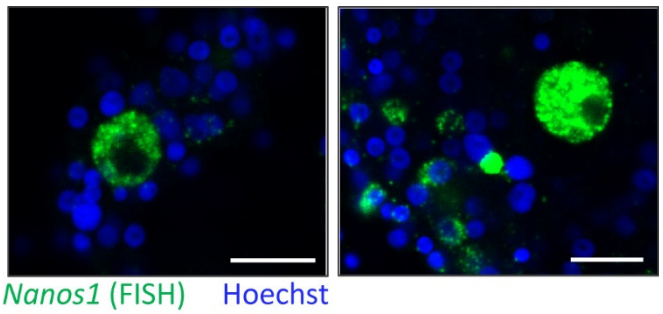


Figure 3.S1. *Nanos1* positive small oocytes are found in large number in the primordium from 24hpd. Scale bars: 20 µm.

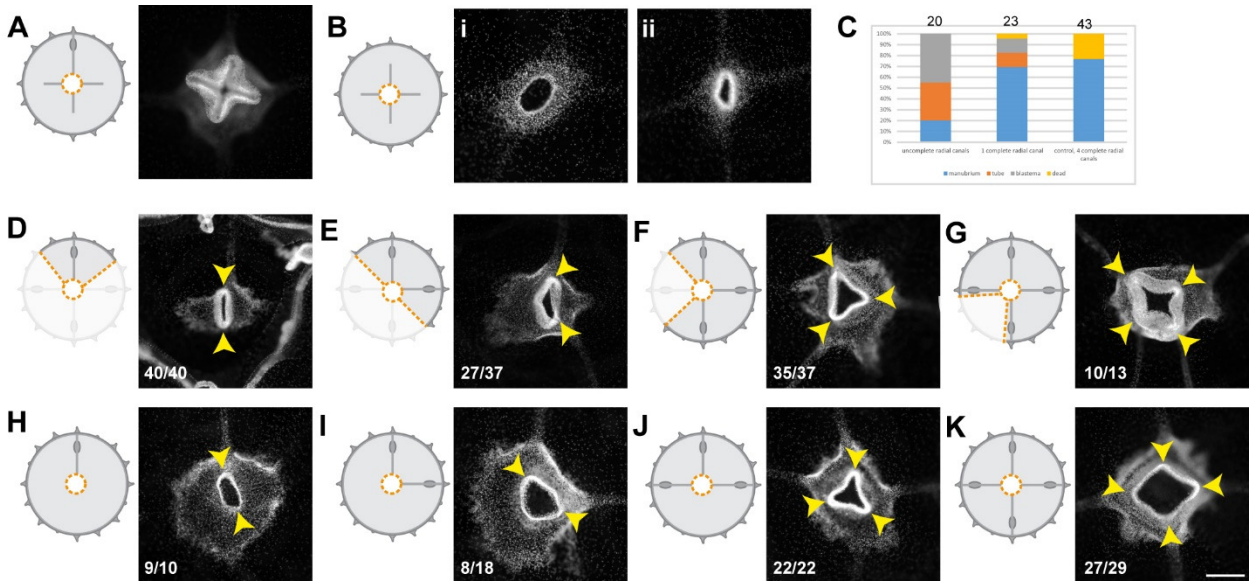


Figure 4 - Radial canals locally dictate the morphology of the regenerating manubrium. (A) At least one radial canal needs to be connected to the manubrium anlage, for a correctly-patterned manubrium. (B) Morphogenesis of manubrium is arrested (i) or impared (ii) if no complete radial-canal is connected. (C) Quantification. (D-G) Four different umbrella dissections; the number of lobes of the regenerating manubrium depends on the number of adjoining canals, and their orientation affects the geometry of the manubrium. Umbrella dissection changes the relative angles of merging radial canals. (D) The presence of only one radial canal causes the formation of a tubular regenerate independently of the shape of the initial aggregate (manubrium base). (E) Two radial canals entail a bi-lobed manubrium; the two lobes are highlighted by the angular orientation of canals. (F) Three-lobed manubrium, connected to three radial canals. (G) Four radial canals cause a tetraradial structure, but the geometry depends on the angle between canals. (H-K) Removal of entire radial canal(s) and connected gonad(s) prior to manubrium dissection; The number of lobes of the regenerating manubrium depends on the number of adjoining canals, and their orientation affects the geometry of the manubrium.

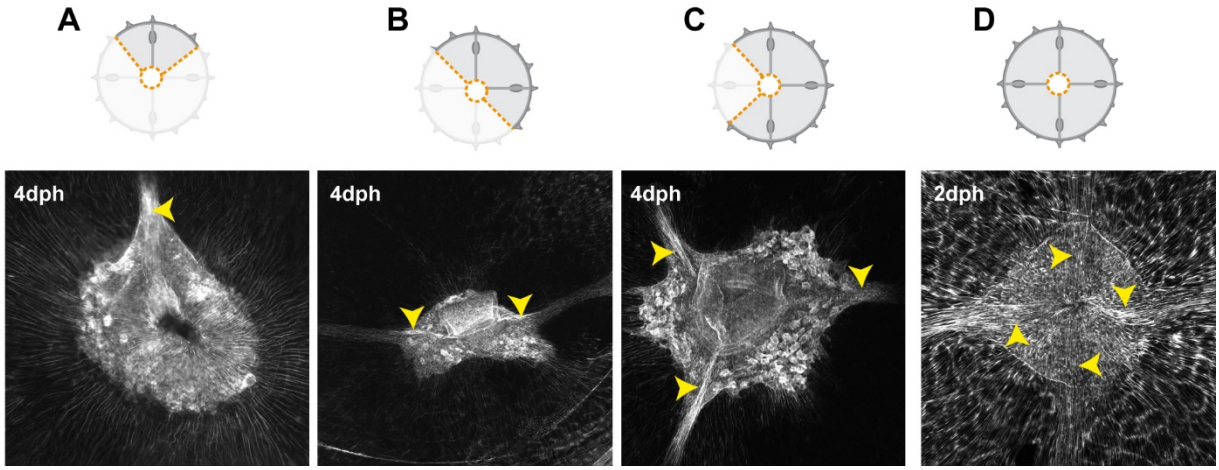


Figure 4.S1 – Manubrium morphogenesis might depend on radial musculature. (A-C) Following manubrium regeneration, thicker smooth radial muscle fibers are visible on the radial canals, irrespective of their number and orientation. Those muscle fibers are in direct continuity with those present at the ridge of the manubrium. The other radial muscle fibers of the manubrium are less well organized and in partial discontinuity with the subumbrella. (D) Stronger radial muscles on top of the canals reaching the mouth area are already visible at the onset of morphogenesis (2dpd).

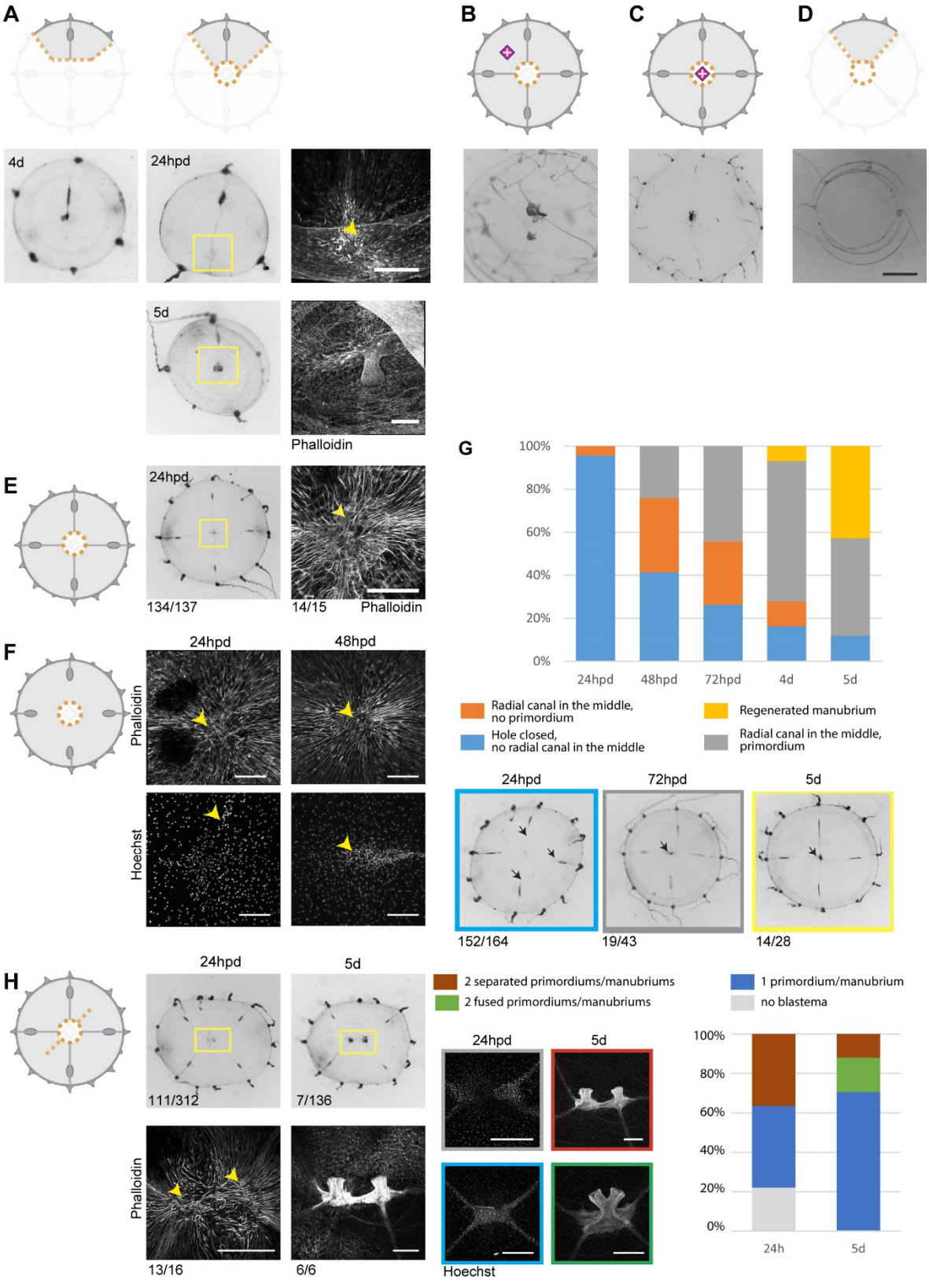


Figure 5 - The smooth "muscle hub" identifies the position of manubrium regeneration. (A) Any position of the umbrella can reform a manubrium. (B) Grafting an additional manubrium does not inhibit the regeneration of the endogenous one. (C) Inhibition is observed if the grafted one is inserted at the place of the endogenous one. (D) Fragments lacking radial canals can re-circularize, but not regenerate a manubrium. (E) Smooth radial muscle fibers join at the centre, after manubrium ablation. They form a "muscle hub". (F) If canals are removed, the muscle hub can form, but no manubrium

regeneration is triggered. (G) Quantification of the outcome of regenerative processes (manubrium regeneration) in presence or absence of radial canals. (H) Ectopic/surnumerary manubria can be regenerated, by inducing the formation of multiple muscle hubs (cut outline in yellow dotted line). The regenerating anlages might fuse, at blastema or later stages. Scale bars: A,E,F: 150 µm; D: 1 mm; H: 300 µm.

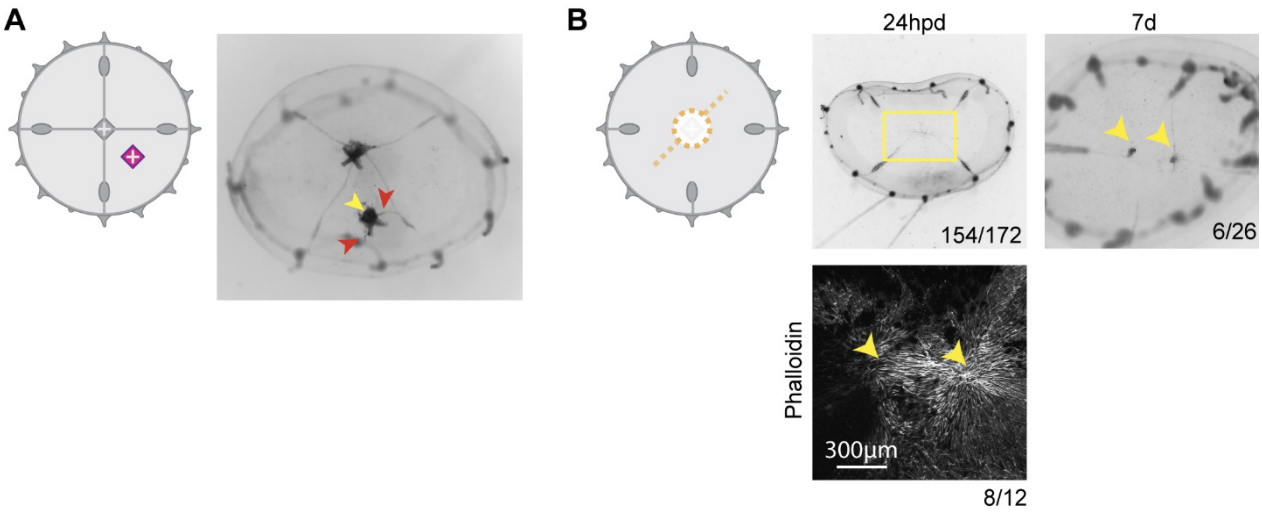


Figure 5.S1 – Independence of canals and umbrella patterning. (A) Manubrium grafted on the umbrella sprout novel radial canals in random directions. Canals will grow and connect to the endogenous canal system. (B) Radial canals are not necessary for the formation of a muscle hub. Phalloidin staining shows that a double hub forms also when the adjoining canal segments are removed leading in some cases into the regeneration of two manubria, following the growth of the radial canals to the new muscle hubs (right pictures).

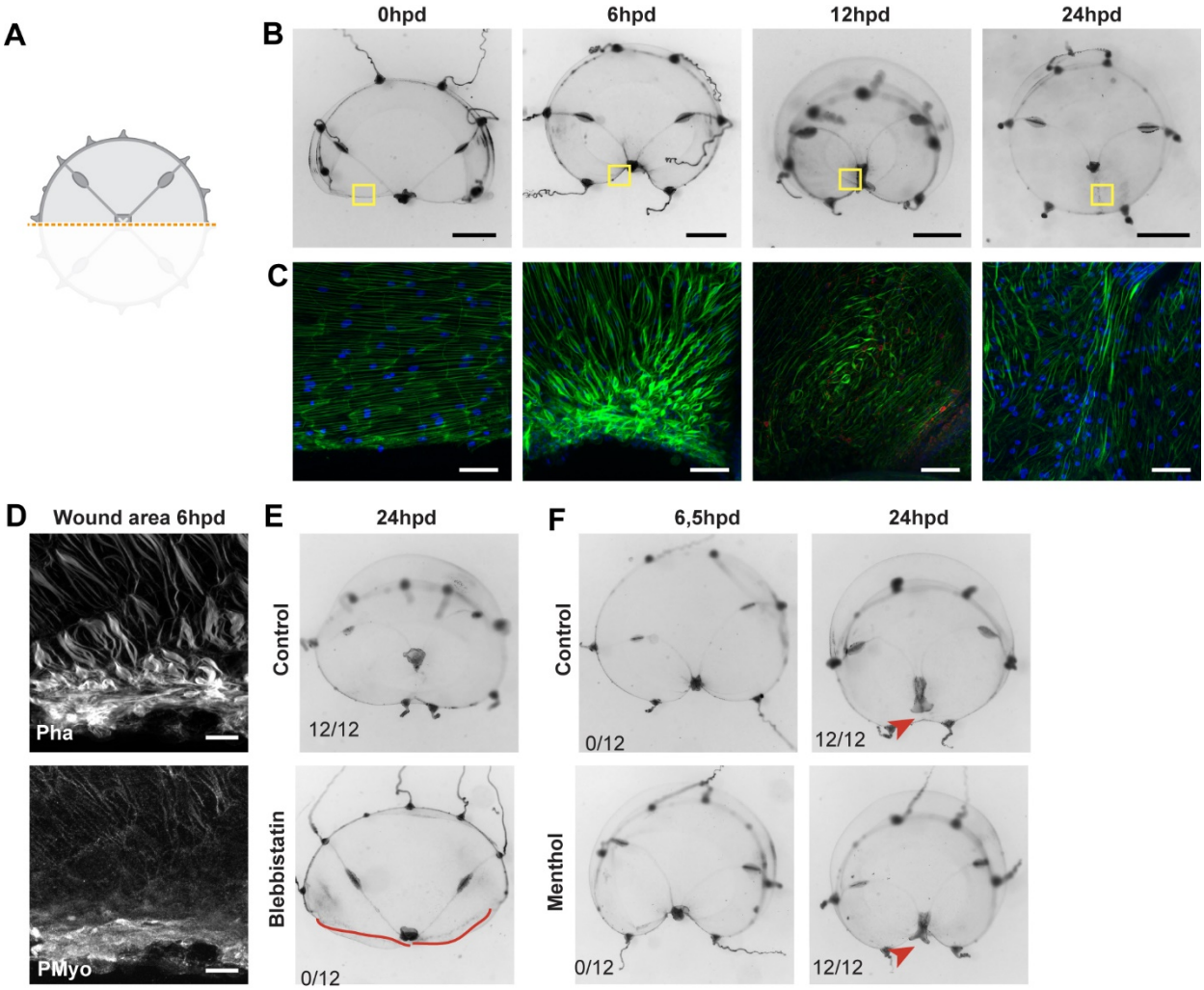


Figure 6 - Actomyosin-driven subumbrella remodeling restores medusa shape. (A) The standard experimental set up for remodeling employed medusa bisection, across the manubrium. (B) Gross morphology of remodeling hemi-medusa, showing the rapid reduction of exposed edges. After closure of the wound, the manubrium migrates towards the center: by 24 hpd only a scar-like trace is visible in the umbrella, which will then disappear. (C) Phalloidin-staining showing the dynamics muscle fibers at the remodeling edge (yellow squares in B): the initially organized fibers disorganize, and are heavily rearranged following the movements of the umbrella. (D-E) Remodeling is driven by an actin-myosin cable that assembles at the edge. (D) Myosin phosphorylation at the edge indicates an activation of actin-myosin. (E) Blebbistatin-based inhibition of myosin II, shows that actin-myosin is responsible for remodeling. (F) Inhibition of striated muscle rhythmic contraction with menthol shows only a minor delay in remodeling, indicating that they play only a facilitating role. Scale bars: A: 1 mm; B: 50 µm, C: 25 µm.

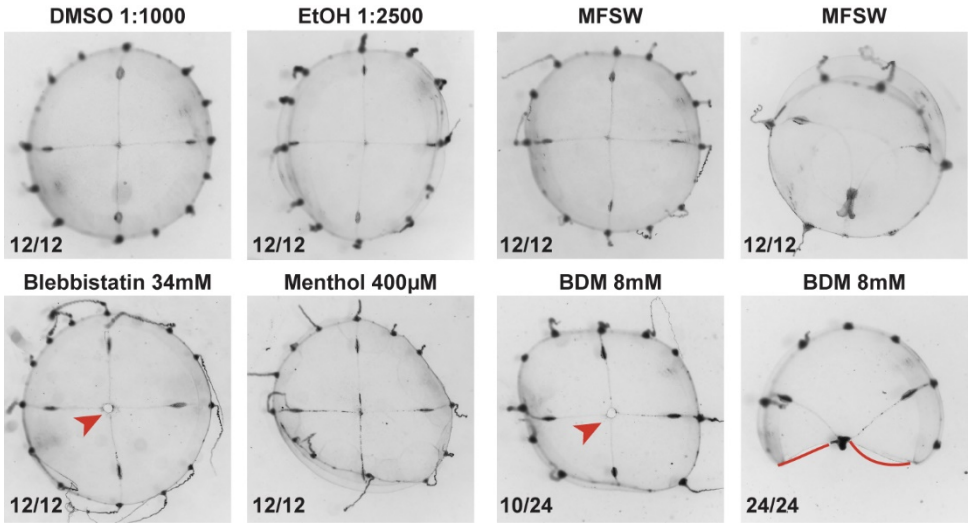


Figure 6.S1 – Actin-myosin based remodeling. Myosin inhibitors (blebbistatin and BDM) demonstrate that wound healing and remodeling depend on the action of actin-myosin cables assembling at the edge, while inhibition of muscle contraction (EtOH, menthol) has no major effect. Controls: MFSW (micro-filtered sea water) and DMSO.

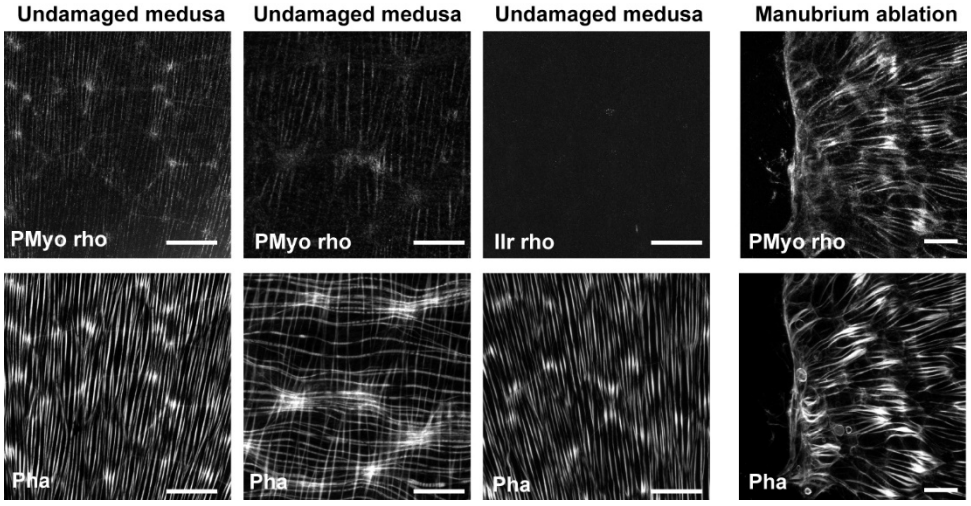


Figure 6.S2 – Myosin phosphorylation in intact and remodeling fibers. Myosin phosphorylation can be detected in radial smooth muscle fibers but not in circular striated muscle fibers, nor without primary antibody (IIr rho only). Disorganizing muscle fibers (notice the actin rings) are accompanied by myosin phosphorylation, showing enhanced contractility. Scale bar: 25 µm.

III. Discussion : Confrontation des différents modèles de régénération chez les méduses

Les données sur la régénération obtenues chez *Clytia* confirment certaines observations faites par Morgan, Hargitt et Schmid concernant la régénération chez les méduses (Hargitt 1897, 1902; Morgan 1899; Schmid & Tardent 1971; Schmid 1974a; Schmid *et al.* 1976). Elles apportent aussi un modèle d'initiation de la régénération différent de celui proposé par Schmid *et al.* (1976).

Les deux phénomènes de régénération des organes et du remodelage de l'ombrelle caractérisés par Morgan, Hargitt et Schmid ont pu être observés également dans notre souche Z4B de méduse *Clytia*. La capacité d'auto-organisation de l'ombrelle, reconstituant rapidement la forme méduse, remarquée par Hargitt (1897, 1902) a bien été confirmée chez *Clytia* et nous avons déterminé que la formation d'un câble d'actomyosine le long de la zone de coupure est responsable de ce phénomène. Nous avons également confirmé le fait que le manubrium est le seul organe régénéré systématiquement, la régénération des bulbes et gonades dépendant en partie de l'apport nutritif. Le nombre original de canaux, si complètement disséqués, n'est jamais rétabli.

Hargitt et Morgan ont fourni les premières descriptions de la réponse à la blessure chez des méduses (Hargitt 1897; Morgan 1899). 70 ans plus tard, Schmid *et al.* (1976) proposent un modèle expliquant l'initiation de la régénération chez *Clytia* dans le cas des fragments interradiaires. Le modèle suppose la présence d'un gradient de la capacité de régénération dans l'ombrelle. Ce gradient serait causé par les forces de tension dans les muscles et la mésoglée due au processus de remodelage, et entrainerait la concentration ou non des cellules permettant la régénération en un point (Schmid *et al.* 1976). Ce modèle est assez différent de celui auquel nous avons abouti. Notre modèle actuel repose sur l'initiation de la régénération par la formation d'un point de jonction des fibres musculaires radiaires suite à l'étape de remodelage. La régénération se produit systématiquement sur un canal radiaire qui assure l'approvisionnement en cellules.

Malgré ces différences, nous avons pu confirmer certains aspects du modèle de Schmid *et al.* (1971, 1974, 1976):

- Schmid & Tardent (1971) ont décrit avec précision les étapes du remodelage de la cicatrisation à la fermeture totale du canal circulaire sur un fragment interradiaire. Nous avons observé les mêmes étapes sur des fragments de différentes formes.
- Schmid (1974) a observé l'effet de la forme de départ et du processus de remodelage du fragment dans la régénération. Il l'a cependant expliqué par la différence de forces de tension due à la mésoglée, alors que notre modèle indique plutôt le rôle du point de jonction des fibres musculaires.
- Comme Schmid *et al.* (1976), nous avons observé le fait que le manubrium endogène peut coexister avec un manubrium greffé dans l'ombrelle, et que la greffe d'un manubrium n'inhibe pas la régénération. Schmid *et al.* (1976) ont observé une inhibition

locale dans le cas d'une greffe de manubrium sur un fragment interradiaire au niveau du site de régénération. Nous avons observé une inhibition similaire dans le cas de la greffe d'un manubrium sur le site de régénération sur une méduse entière ; ainsi que dans le cas de l'ablation du manubrium plusieurs heures après la greffe.

- Schmid *et al.* (1976) ont prédit aussi avec leur modèle la concentration des fibres musculaires en un point suite à la réduction de la zone de coupure. Par des marquages des fibres musculaires à la phalloïdine, nous avons pu confirmer cette hypothèse. Nous avons également observé la dissociation des fibres les plus proches de la zone de coupure, phénomène non pris en compte dans le modèle de Schmid *et al.* (1976).
- Le modèle de Schmid *et al.* (1976), en accord avec le nôtre, suppose que le remodelage induit des forces de tension dans les tissus de la sous-ombrelle.

Les différences majeures entre les deux modèles de régénération sont les suivantes :

- Schmid *et al.* (1974, 1976) ont observé la présence d'un gradient de la capacité à régénérer le manubrium dans l'ombrelle et expliquent ce gradient par les forces de tension issues du remodelage générées par la mésoglée et les muscles. Nous n'avons pas observé ce gradient lors de nos expériences. Sur notre souche Z4B de méduse, le taux de régénération du manubrium est identique suite à l'ablation du manubrium seul ou avec une portion de la zone centrale allant jusqu'au milieu de la portion 'manubrium-gonade' des canaux radiaires. Cependant, Schmid *et al.* (1976) ne décrivent une différence marquée de capacité de régénération du manubrium entre zone centrale et zone périphérique de l'ombrelle que pour des fragments interradiaires. Les fragments interradiaires de nos méduses Z4B ne régénèrent jamais de manubrium, nous ne pouvons donc pas directement comparer nos résultats avec ceux de Schmid *et al.* (1976).
- D'après Schmid *et al.* (1976), l'initiation ou non de la régénération dépend de cellules venant de la zone de coupure qui s'accumuleraient en un point suite aux forces de tension exercées principalement par la mésoglée lors du remodelage. Notre modèle privilégie plutôt le rôle des fibres musculaires lisses formant un point de jonction suite au remodelage, qui avec un canal relié à un pool de cellules souches permet l'initiation de la régénération. Ainsi, dans notre modèle, les processus de remodelage et de recrutement des cellules sont découplés
- Schmid *et al.* (1976) se sont focalisés entièrement sur la réorganisation de la mésoglée, sans prendre en compte le fait que les muscles aussi sont réorganisés. Nous avons pu observer les réorganisations de la mésoglée par injection de gouttelettes de DiI. Nous avons également observé le fait que les fibres musculaires lisses sont bien réorganisées suite à la réduction de la zone de coupure et regagnent leur orientation radiaire.
- Contrairement à Schmid *et al.* (1976), nous n'avons pas observé d'accumulation de cellules dans les fragments A radiaires ou interradiaires. D'après nos observations, un canal radiaire est nécessaire à la régénération. Il est le lieu d'initiation de la prolifération et approvisionne la zone en régénération en cellules souches et différenciées. Le mode de régénération observé par Schmid *et al.* (1976) est peut-être mis en œuvre uniquement dans le cas de la régénération sur les fragments interradiaires, que nous n'avons pas pu observer.

Perspectives : Validation du modèle

Selon notre modèle, le point de jonction des fibres musculaires est central dans la régénération du manubrium. Sa formation se déroule en deux parties : le rassemblement des fibres interrompues en un point lors de la réduction de la zone de coupure, et le déplacement de ce point vers le centre. La deuxième partie est encore en phase de validation expérimentale. Des marquages à la phalloïdine, afin de comparer le comportement des fibres musculaires lors de la deuxième phase, dans des fragments régénérant le manubrium et ne le régénérant pas sont encore à réaliser. De plus différentes coupes parallèles et perpendiculaires à l'axe des fibres musculaires au cours du déplacement du point de jonction permettraient de mettre en évidence la présence ou l'absence d'une force de tension tirant le point de jonction vers le centre.

A plus long terme, la modélisation mathématique des fragments de méduses et du comportement des fibres lors du remodelage serait extrêmement informative. Il n'est pas encore possible d'imager le comportement des fibres musculaires sur des méduses vivantes. Un modèle mathématique réalisé à partir des données obtenues sur des méduses fixées permettrait d'avoir une bonne idée de leur dynamique. De plus, en identifiant les zones de tension causées par les mouvements des tissus, elle permettrait de valider notre hypothèse de la présence d'une force de tension musculaire tirant le point de jonction vers le centre. Les inhibiteurs de la myosine non musculaire comme la blebbistatin inhibant l'activité ATPase de la myosine (Kovács *et al.* 2004) et le ML-7 bloquant la MLCK (kinase phosphorylant la chaine légère régulatrice de la myosine non musculaire) (Connell 2006) peuvent aussi être informatifs. Cependant, ces inhibiteurs interfèrent aussi avec l'actomyosine nécessaire aux mouvements des cellules, et pas uniquement avec les fibres musculaires. Les forces de tension pourraient être directement étudiées par des découpes au laser de fibres musculaires sur des méduses transgéniques exprimant des protéines structurales fluorescentes (par exemple l'actine – via une lignée actin::lifeact-GFP). De telles lignées, ainsi qu'un protocole d'immobilisation des méduses sur une longue période, restent encore à développer.

CHAPITRE 2

Aspects moléculaires de la régénération du manubrium

Préface

Résumé du chapitre

En parallèle de la caractérisation au niveau cellulaire de la régénération du manubrium présentée dans le chapitre 1, j'ai généré un jeu de données transcriptomiques couvrant les premières 48h de la régénération. Le but était d'une part d'identifier des gènes marqueurs des différents types cellulaires du manubrium et de cartographier leur réapparition lors de la régénération, et d'autre part d'identifier des gènes régulant potentiellement le processus de re-patterning et l'initiation de la régénération (facteurs de transcription et voies de signalisation).

Comme la structure du manubrium et les types cellulaires le composant sont encore mal connus, une description précise du manubrium était préalablement nécessaire pour pouvoir comprendre les patrons d'expression des gènes. J'ai donc commencé mon étude par la description de la morphologie du manubrium par diverses techniques de microscopie, dont la localisation de marqueurs moléculaires déjà caractérisés. J'ai ainsi pu observer que le manubrium est régionalisé selon l'axe oral-aboral, la régionalisation étant visible aussi bien dans sa structure que dans les types cellulaires.

Le jeu de données transcriptomiques que j'ai généré est de bonne qualité et permettra de suivre le niveau d'expression d'un très grand nombre de gènes dans la région centrale de la méduse pendant la reformation du manubrium. Dans le contexte de cette thèse, j'ai focalisé mes analyses de ces données transcriptomiques sur deux aspects. D'une part, j'ai identifié et validé par ISH un jeu compréhensif de marqueurs des types cellulaires du manubrium : notamment les cellules nerveuses, les nématocytes, différentes cellules digestives et les cellules souches. Ces marqueurs m'ont permis de suivre la réapparition séquentielle des types cellulaires du manubrium au cours de la régénération. D'autre part, j'ai analysé le rétablissement du pôle oral du manubrium pendant la régénération en suivant l'expression de gènes conservés chez d'autres espèces. J'ai trouvé que les territoires oraux et digestifs étaient déjà distincts dès 48hpd et que les acteurs des voies Wnt, connus pour leur rôle dans le patterning oral-aboral chez les métazoaires, ont des dynamiques d'expression faisant d'eux de bons candidats pour les futures études fonctionnelles.

Le jeu de données transcriptomiques que j'ai généré représente ainsi une riche ressource pour les futures études de la régénération, et plus largement de la biologie du manubrium de *Clytia*. D'ailleurs, la comparaison entre la répartition des types cellulaires dans le manubrium et dans la cavité gastrique des polypes m'a permis de discuter les hypothèses d'homologie entre la forme polype des hydrozoaires et le manubrium de la méduse.

Contribution

J'ai réalisé les marquages combinés FISH, EdU et immunohistochimie ayant servi à la description du manubrium dans la première partie, après mise au point du protocole sur les méduses, d'après celui de FISH déjà utilisé dans l'équipe sur les larves planula et les gonades (Ruggiero 2015; Quiroga Artigas *et al.* 2018). Les colorations des méduses au rouge neutre, la

coloration ‘Periodic Acid Schiff’ (PAS), ainsi que les immunohistologies avec les neuropeptides ont été réalisées par Volker Hartenstein.

J’ai participé à la définition du design expérimental du jeu de données transcriptomiques avec Lucas Leclère, Chiara Sinigaglia et Evelyn Houliston. Afin de préparer les 36 échantillons pour l’analyse transcriptomique, j’ai disséqué les 1200 méduses. Je les ai lysé et ai extrait l’ARN avec l’aide de Lucas Leclère. La recherche et la sélection des gènes candidats ont été partagées avec Lucas Leclère. Les sondes utilisées pour l’ISH ont été synthétisées à partir des EST par Priscilla Freschu et Sandra Chevalier. Les ISH et les photos ont été faites par Priscilla Freschu, Sandra Chevalier et moi-même.

Publication future

L’analyse de ces données transcriptomiques fera l’objet du deuxième article issu de mes travaux de thèse. Cet article présentera la description du manubrium réalisée en collaboration avec Volker Hartenstein, ainsi que l’analyse des données transcriptomiques. Les points abordés seront la dynamique des gènes illustrés par la diversité des profils d’expression, la caractérisation des différents types cellulaires du manubrium et leur réapparition pendant la régénération, et l’implication de la voie Wnt/β-caténine pendant la régénération.

Avant de pouvoir écrire l’article, des analyses bio-informatiques et des expériences sont encore à réaliser. L’assemblage du transcriptome que j’ai utilisé est celui réalisé par la société de séquençage BGI, qui sépare les variants d’épissage. L’assemblage sera donc refait avant publication des données, et les analyses globales, comme l’analyse d’expression différentielle et le clustering des profils d’expression, seront faites sur le nouvel assemblage. Afin de valider les différents profils d’expression, des ISH des gènes représentant les différents profils seront réalisées sur les méduses en régénération. Concernant l’implication de la voie Wnt/β-caténine, les ISH des composants de la voie seront réalisées sur des méduses en régénération. Son implication sera testée grâce à des traitements pharmacologiques activant (alsterpaullone et azakenpaullone) et inhibant la voie Wnt/β-caténine (PKF118-310). Le RNAi est actuellement en cours développement dans l’équipe. Cette approche permettra de tester le rôle des différents ligands Wnt dans la régénération.

I. Introduction

Chez les animaux ayant une symétrie radiaire, comme un très grand nombre de cnidaires, l'axe oral-aboral est l'unique axe de symétrie. Le pôle oral de l'axe est défini par la présence de la bouche, présente chez presque tous les métazoaires, comprenant l'ouverture servant à manger et le début de la cavité digestive. Chen *et al.* (2017) supposent que celle-ci est apparue une seule fois au cours de l'évolution. Deux arguments sont en faveur de cette hypothèse : le fait que la bouche soit toujours formée à partir de l'association d'ectoderme oral et d'endoderme digestif, et l'expression des gènes conservés F*oxA* et O*tx2* au niveau de la bouche (Chen *et al.* 2017).

Chez *Clytia*, le pôle oral de la méduse est localisé à l'extrémité du manubrium. Si la régénération de l'axe oral-aboral a été étudiée en détail chez les modèles polypes de régénération, il y a actuellement très peu de données moléculaires sur la formation et la régénération du pôle oral chez la méduse. De plus, la structure, ainsi que la composition en types cellulaires du manubrium des méduses sont encore mal connus. Après avoir caractérisé les principales étapes de la régénération au niveau cellulaire, je me suis donc intéressée plus en détail à la structure du manubrium marquant le pôle oral de la méduse, et aux gènes impliqués dans la restauration de ce pôle oral.

L'introduction rassemble et résume les connaissances actuelles sur le manubrium des méduses. Elle est structurée en trois parties présentant la morphologie du manubrium, les différents types cellulaires le composant, et les gènes marquant sa polarité. La forme du manubrium étant différente chez les hydrozoaires, les scyphozoaires et les cubozoaires, les informations présentées dans cette section concernent principalement les hydrozoaires, sauf mention contraire (voir section III.1 de l'Introduction générale pour les caractéristiques des classes de cnidaires).

I.1. Morphologie du manubrium

Le système gastrovasculaire des méduses est composé de l'organe principal, le manubrium en position centrale sur la sous-ombrelle, d'un système de canaux radiaires et circulaires, ainsi que des gonades et des bulbes tentaculaires localisés sur ces derniers. La partie proximale des canaux radiaires s'ouvre directement sur le manubrium (Haeckel 1879).

Le manubrium regroupe la bouche, assurant la capture des proies, et l'estomac ayant pour fonction la digestion et l'absorption des nutriments. Le manubrium est séparé en trois zones selon l'axe oral-aboral : la zone orale à l'extrémité distale, la zone médiane et la zone stomacale à la base (Haeckel 1879; Bouillon 1966). Il peut être de taille et de forme variée selon les espèces (Fig.48). Chez certaines espèces, il sert à la reproduction sexuée et/ou asexuée, pouvant porter les gonades (ex. hydrozoaires anthoméduses *Podocoryne*, *Limnocnida tanganycae* (Bouillon 1956)) et/ou même être le lieu de bourgeonnement de nouvelles méduses (ex. hydrozoaires *Limnocnida tanganycae* (Bouillon 1956), *Raktea octopunctata, Sarsia*

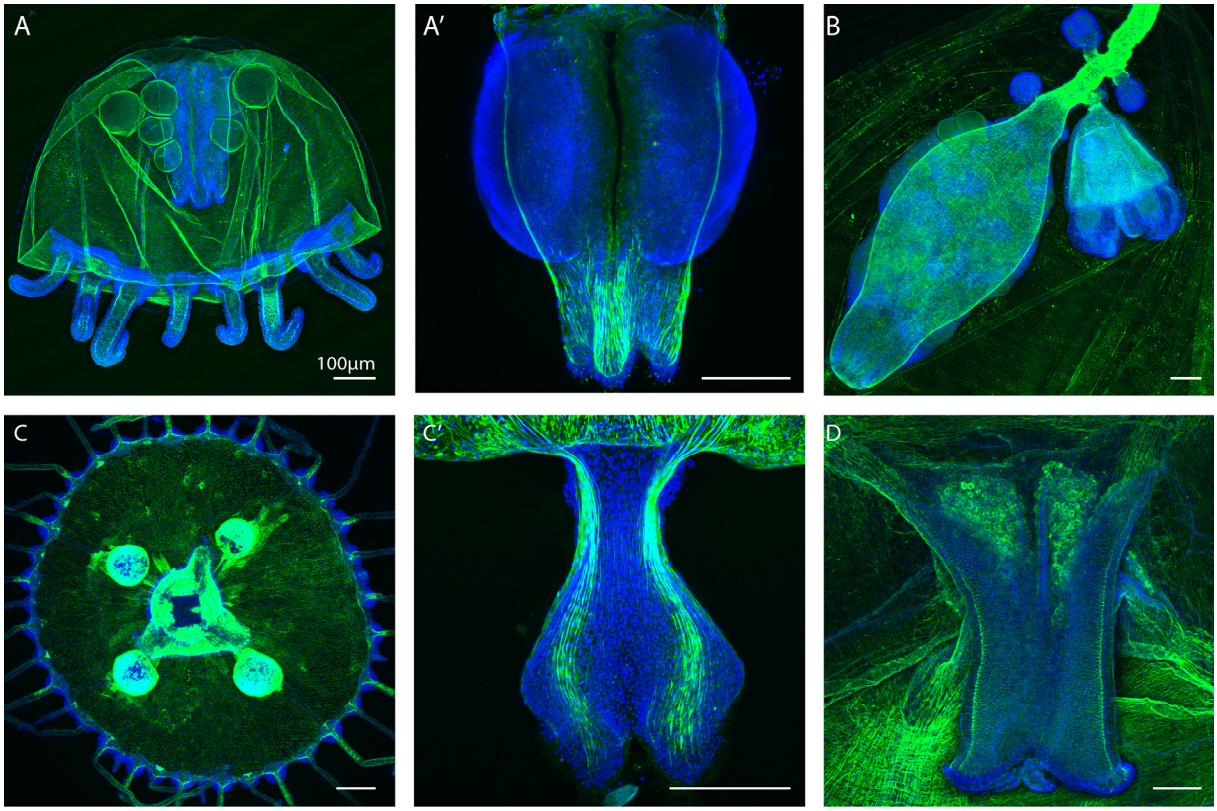


Figure 48 : Morphologie du manubrium de méduses hydrozoaires.
Manubrium de méduses hydrozoaires collectées dans le Gullmarsfjord à partir du Sven Lovén Centre for Marine Sciences (Kristineberg, Suède), marqués à la phalloïdine en vert et au hoechst en bleu. (A) et (A') *Podocoryne,* (B) *Sarsia* (C) et (C') *Obelia* (D) *Leukartiara*. (A) demi méduse avec le manubrium en vue latérale. (C) Méduse entière en vue orale. (A'), (B), (C') et (D) Manubrium en vue latérale, extrémité distale vers le bas.

A l'extrémité distale, la bouche est l'unique ouverture de la cavité gastrique. Elle peut prendre des formes variées, présenter des lobes, des tentacules ou des prolongements appelés bras oraux chez les scyphozoaires (Bouillon 1968), et est capable de mouvements pour capturer et immobiliser les proies (ex. hydrozoaire *Aglantha digitale* (Mackie 2003)). Celles-ci sont ensuite internalisées grâce aux mouvements péristaltiques du manubrium et aux battements des cils localisés le long de l'endoderme, puis digérées (Mackie 2003, 2004). Le manubrium peut se déformer et s'étendre pour ingérer les proies (observé entre autre chez les hydrozoaires *Liriope eurybia* et *Geryonia hastata* (Haeckel 1865))

La zone médiane est de taille variable. Elle est extrêmement courte chez *Limnocnida tanganycae* (Bouillon 1956), et peut-être très grande chez les méduses de la famille Geryoniidae entre autres (Haeckel 1865), projetant la partie orale en dehors de l'ombrelle. Chez *Clytia*, la zone médiane présente quatre arêtes (Jager *et al.* 2011) partant des quatre lobes de la bouche et se prolongeant jusqu'à l'insertion des canaux radiaires à la base.

A la base, entre les canaux radiaires, sont localisées quatre poches gastriques (Bouillon 1968). Chez le scyphozoaire *Aurelia aurita*, il s'agit d'extensions de la base du manubrium localisées entre les bras oraux, contenant des filaments gastriques, ces derniers étant absents chez les hydrozoaires (Brusca 2016). Ces poches ont aussi été décrites chez le scyphozoaire *Catostylus mosaicus* (Anderson 1996). La digestion a lieu à la base et dans la zone médiane (*Aglantha digitale* (Mackie 2003)). Chez *Limnocnida tanganycae*, le manubrium joue le rôle de glande digestive uniquement, les cellules absorbant les nutriments étant localisées principalement dans les canaux radiaires (Bouillon 1956).

Le manubrium de *Clytia* assure sa fonction même isolé de la méduse (voir Chapitre 1), cependant la cavité gastrique est continue avec les canaux gastrovasculaires (Bouillon 1968), permettant la répartition des produits de digestion dans la méduse. Des particules non digérées passent parfois dans les canaux radiaires et sont probablement digérées par les cellules endodermiques des canaux (Mackie 2003). Chez la méduse *Aglantha*, l'ingestion d'un petit crustacé dure quelques minutes et la digestion plus d'une heure (Mackie 2003).

Le manubrium est une structure avec deux fonctions, l'ingestion et la digestion, régionalisées selon l'axe oral-aboral, la bouche étant présente à l'extrémité orale, et l'estomac dans la zone médiane et la base.

I.2. Types cellulaires du manubrium

Le manubrium possède les types cellulaires nécessaires à ses deux fonctions. Il est composé de tissus d'origine ectodermique et endodermique. A l'heure actuelle aucune description systématique des types cellulaires du manubrium de *Clytia* n'a été réalisée.

I.2.1. Cellules épithéliales ectodermiques et gastrodermiques

L'ectoderme et l'endoderme du manubrium sont composés des cellules myoépithéliales typiques des cnidaires (voir section III.1.3 de l'Introduction générale). Les fibres sont organisées de façon longitudinale dans l'ectoderme et ont une orientation circulaire dans l'endoderme (ex. *Limnocnida tanganycae* (Hyman 1940; Bouillon 1956)). Les deux séries de muscles permettent les mouvements précis, nécessaires à l'alimentation. Ils ont été décrits chez l'hydrozoaire *Aglantha digitale* (Mackie 2003, 2004). Chez de nombreuses méduses, la capture d'une proie par les tentacules entraine la flexion du manubrium vers le bord de l'ombrelle correspondant, appelée 'pointing response' (Mackie & Singla 1975), et l'ouverture des lobes qui enveloppent la proie. Puis des mouvements péristaltiques sont générés, internalisant la proie. J'ai pu observer les mêmes types de mouvements du manubrium suite à la capture de proies chez *Clytia*.

Dans le gastroderme, les cellules myoépithéliales servent aussi à l'absorption des nutriments (Bouillon 1956; Brusca 2016). Elles sont localisées contre la mésoglée, parfois atteignant la cavité entre les cellules glandulaires (Fig.49). Les fibres musculaires circulaires sont localisées dans la partie basale des cellules. Dans la base du manubrium, les cellules myoépithéliales contiennent des inclusions cytoplasmiques digestives (Bouillon 1956). Assez peu d'informations sont disponibles à ce jour sur l'ingestion des nutriments chez les méduses.

Les cellules gastrodermiques circulantes identifiées chez *Clytia* (voir Chapitre 1) font également partie des cellules endodermiques capables d'absorber les nutriments. La capacité d'ingestion a été déterminée par l'absorption dans les cellules de microbilles fluorescentes. Ces cellules sont présentes dans l'endoderme du manubrium, des gonades et des bulbes tentaculaires. Une partie d'entre elles est reconnaissable après nourrissage des méduses à la couleur orange venant des artémias. Elles sont capables de se détacher de l'endoderme, de circuler dans les canaux gastrovasculaires et de se réintégrer dans l'endoderme d'un autre organe.

I.2.2. i-cells

Les i-cells et leurs dérivés ont été décrits dans le manubrium de certaines espèces de méduses hydrozoaires. Elles peuvent être identifiées grâce à des marqueurs moléculaires, tels que *Nanos1*, *Piwi*, *Vasa*, *PL10*. Chez la méduse *Pococoryne carnea*, les orthologues de *Piwi* et *Nanos1* (appelés *Cniwi* et *Nos1*) ont été détectés par ISH dans les gonades mâle et femelle, localisées sur le manubrium (Fig. 50.A) (Seipel *et al.* 2004a; Torras *et al.* 2004). Chez la méduse *Clytia*, des i-cells sont présentes dans l'ectoderme de la base du manubrium (Fig.50.B). *Piwi, Nanos1, Vasa* et *PL10* y sont exprimés, plus faiblement que dans les gonades (Leclère *et al.* 2012). A la différence de *Podocoryne*, les gonades sont séparées du manubrium. Les i-cells du manubrium et des gonades forment deux pools spatialement séparés. Même si les i-cells des gonades peuvent repeupler le manubrium en régénération (voir Chapitre 1), il est probable qu'en condition d'homéostasie les i-cells localisées dans les gonades servent principalement à

produire les cellules germinales, tandis que les i-cells du manubrium assurent surtout le renouvellement des différents types cellulaires.

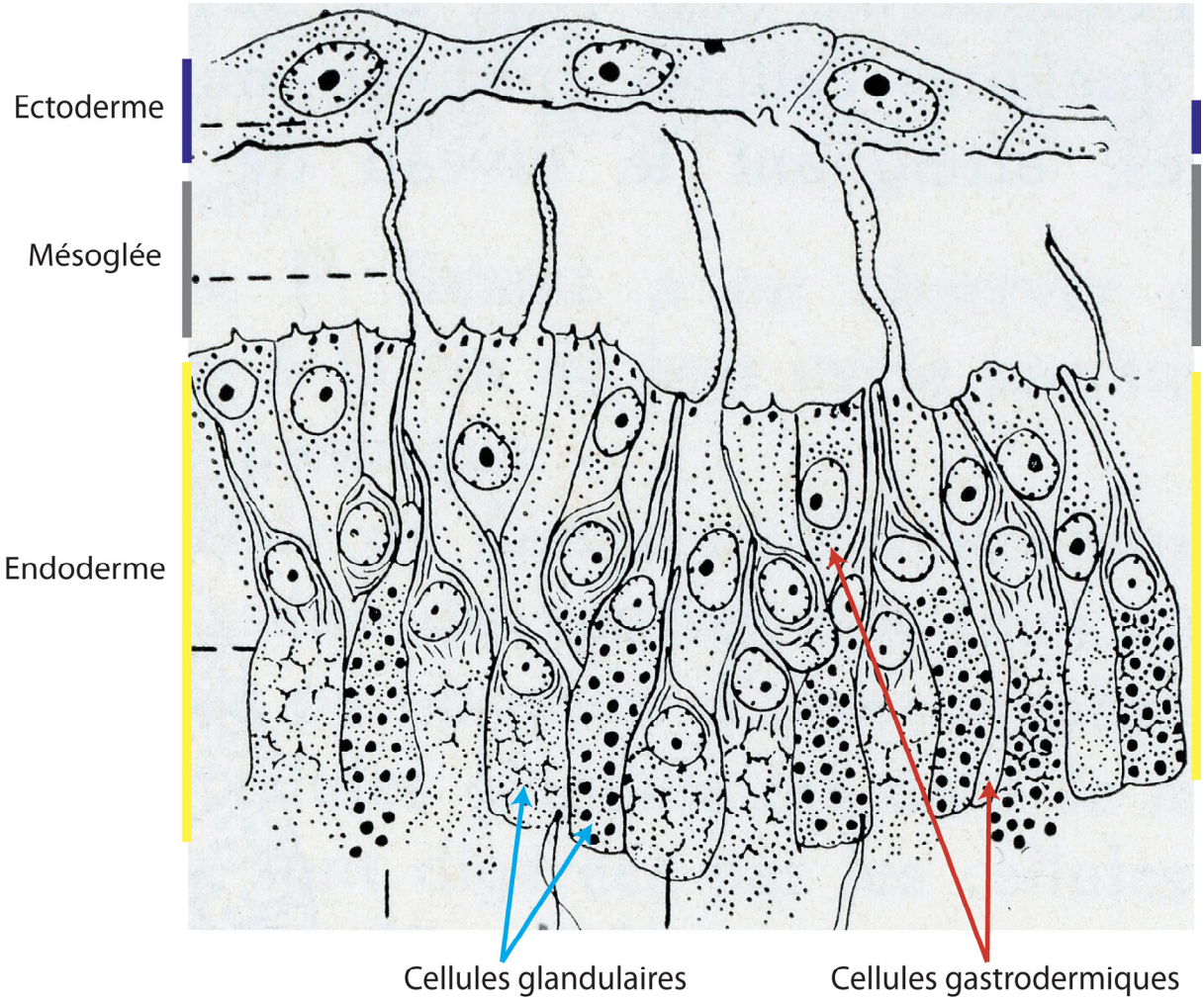


Figure 49 : Organisation cellulaire de la zone orale d'un manubrium de *Limnocnida tanganycae.*
Tiré de Bouillon (1956).

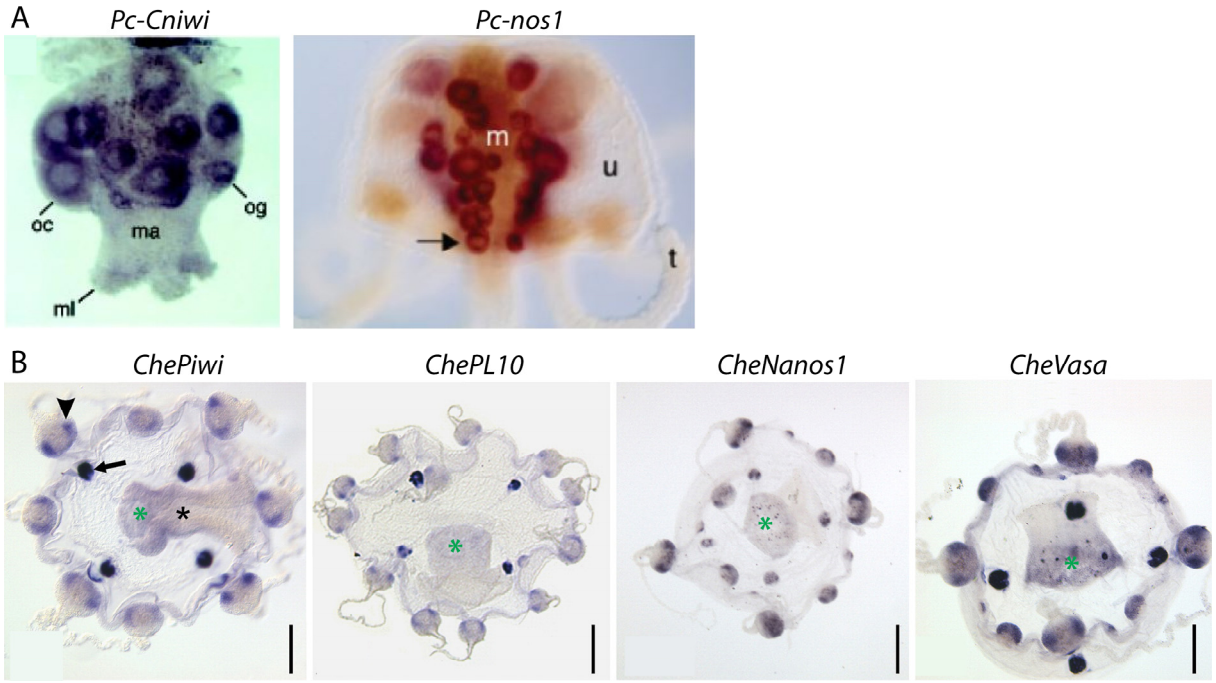


Figure 50 : Localisation des i-cells dans le manubrium de méduses hydrozoaires visualisées par ISH.
(A) Patrons d'expression de *Cniwi* dans le manubrium de *Podocoryne carnea* et de *nos1* dans la méduse entière. Abréviations : m et ma : manubrium, ml : lobes du manubrium, oc : ovocytes, og : ovogonies, u : ombrelle, t : tentacule.
Tiré de Torras *et al.* (2004) et de Seipel *et al.* (2004).
(B) Patrons d'expression de *ChePiwi*, *ChePL10*, *CheNanos1* et *CheVasa* obtenu par ISH chez la méduse *Clytia hemisphaerica*. L'astérisque verte indique la base du manubrium.
Adapté de Leclère *et al.* (2012).

I.2.3. Cellules nerveuses

Le système nerveux des cnidaires, principalement organisé en un réseau diffus, est composé de deux types de cellules nerveuses : les neurones sensoriels et les neurones ganglionnaires (review : (Rentzsch *et al.* 2017)). Les deux types possèdent du côté basal des prolongements appelés 'neurites', axones et dendrites ne pouvant pas être distingués (Rentzsch *et al.* 2019). Les synapses connectent les différents types de neurones entre eux ainsi qu'avec les cellules effectrices myoépithéliales et nématocytes (Westfall 1973). Chacun des deux types est formé de sous-populations exprimant des neuropeptides différents et ayant une distribution propre (Hansen *et al.* 2002; Kelava *et al.* 2015; Takahashi & Takeda 2015). Les nématocytes sont également considérés comme des cellules nerveuses (Galliot *et al.* 2009) mais seront détaillés dans la section suivante.

La neurotransmission chez les cnidaires est surtout peptidergique (Grimmelikhuijzen *et al.* 1996). Le neuropeptide le plus synthétisé contient à son extrémité C-terminale les acides aminés Arginine et Phenylalanine suivis d'une amidation (Arg-Phe-NH_2) et est couramment appelé RF-amide (Grimmelikhuijzen 1983, 1985; Grimmelikhuijzen & Spencer 1984). RF-amide est

présent dans toutes les familles de cnidaires (scyphozoaire : *Cyanea Lamarckii* (Moosler *et al.* 1997) ; hydrozoaires : *Polyorchis penicillatus* (Grimmelikhuijzen & Spencer 1984) et *Hydra magnipapillata* (Fujisawa 2008) ; anthozoaire : *Nematostella vectensis* (Anctil 2009)).

Le système nerveux du manubrium a été décrit chez quelques méduses hydrozoaires, scyphozoaires et cubozoaires. Il forme un réseau diffus de neurones synthétisant les peptides RF-amide ou FMRF-amide, localisé dans l'ectoderme (cubozoaire : *Tripedalia* (Eichinger & Satterlie 2014), hydrozoaires : *Polyorchis* (Grimmelikhuijzen & Spencer 1984; Lin *et al.* 2001) *Eirene sp (*Fig.51.A*), Sarsia tubulosa, Turritopsis nutricula, Cladonema radiatum* (Koizumi *et al.* 2015) *Podocoryne carnea* (Grimmelikhuijzen *et al.* 1991), scyphozoaires : *Chrysaora hysoscella, Cyanea capillata* et *Cyanea lamarckii* (Anderson *et al.* 1992)). Certains neurones synthétisent le peptide GLW-amide (*Eirene sp.* (Koizumi *et al.* 2015)), et/ou la vasopressin (*Turritopsis nutricula* (Koizumi *et al.* 2015)). La présence de neurones dans l'endoderme a été décrite chez l'hydrozoaire *Polyorchis* (Lin *et al.* 2001) et les scyphozoaires *Chrysaora hysoscella, Cyanea capillata* et *Cyanea lamarckii* (Anderson *et al.* 1992). Les fibres nerveuses sont orientées préférentiellement de façon longitudinale dans l'ectoderme.

Les cellules nerveuses du manubrium de *Clytia* synthétisant le peptide RF-amide ont été visualisées par immunohistochimie *(*Fig.51.B et C) (Jager *et al.* 2011). Comme décrit chez les autres méduses, celles-ci forment un réseau dans l'ectoderme, avec des fibres orientées longitudinalement. Le réseau est le plus dense au niveau des quatre arêtes du manubrium (Jager *et al.* 2011). Des cellules nerveuses exprimant PP1 - un des 10 précurseurs de neuropeptides identifiés par Takeda *et al.* (2018) chez *Clytia* et exprimé dans des cellules spécialisées de l'ectoderme de la gonade - sont également présentes dans l'ectoderme du manubrium (Fig.51.D) (Takeda *et al.* 2018).

Certains gènes impliqués dans la neurogenèse chez les bilatériens, comme les FT de la famille hélice-boucle-hélice (bHLH) (famille atonal et Achete-scute) et Sox, et les protéines à homéodomaine sont exprimés dans le manubrium de *Clytia*. *Sox10* est exprimé dans des cellules isolées de l'ectoderme du manubrium (Fig.51.E) (Jager *et al.* 2011). Trois arguments sont en faveur de leur identité neurale. Les cellules *Sox10*+ ont une morphologie polygonale, des neurites et n'ont pas de capsule donc ne sont pas des nématocytes. Leur distribution, plus dense au niveau des arêtes du manubrium, correspond à la distribution des cellules nerveuses exprimant le neuropeptide RF-amide. Enfin, la localisation des cellules *Sox10*+ dans la larve, dans la partie basale de l'ectoderme, correspond à celle de cellules nerveuses (Jager *et al.* 2011).

Parmi les protéines à homéodomaine, *orthopedia* (*otp*) est un marqueur de neurones chez les bilatériens (Tessmar-Raible 2007). Il est exprimé dans des cellules isolées de l'ectoderme des bulbes et du manubrium de *Clytia* (Fig.51.F) (Kraus *et al.* 2015). *Prdl-a* est exprimé dans une population de neurones dérivée des i-cells et localisée autour de l'hypostome de l'hydre (Gauchat *et al.* 1998). Chez *Clytia Prdl-a* est exprimé dans les neurones en différenciation localisés dans l'ectoderme des bulbes tentaculaires et l'ectoderme de la base du manubrium (Fig.51.G) (Ruggiero 2015).

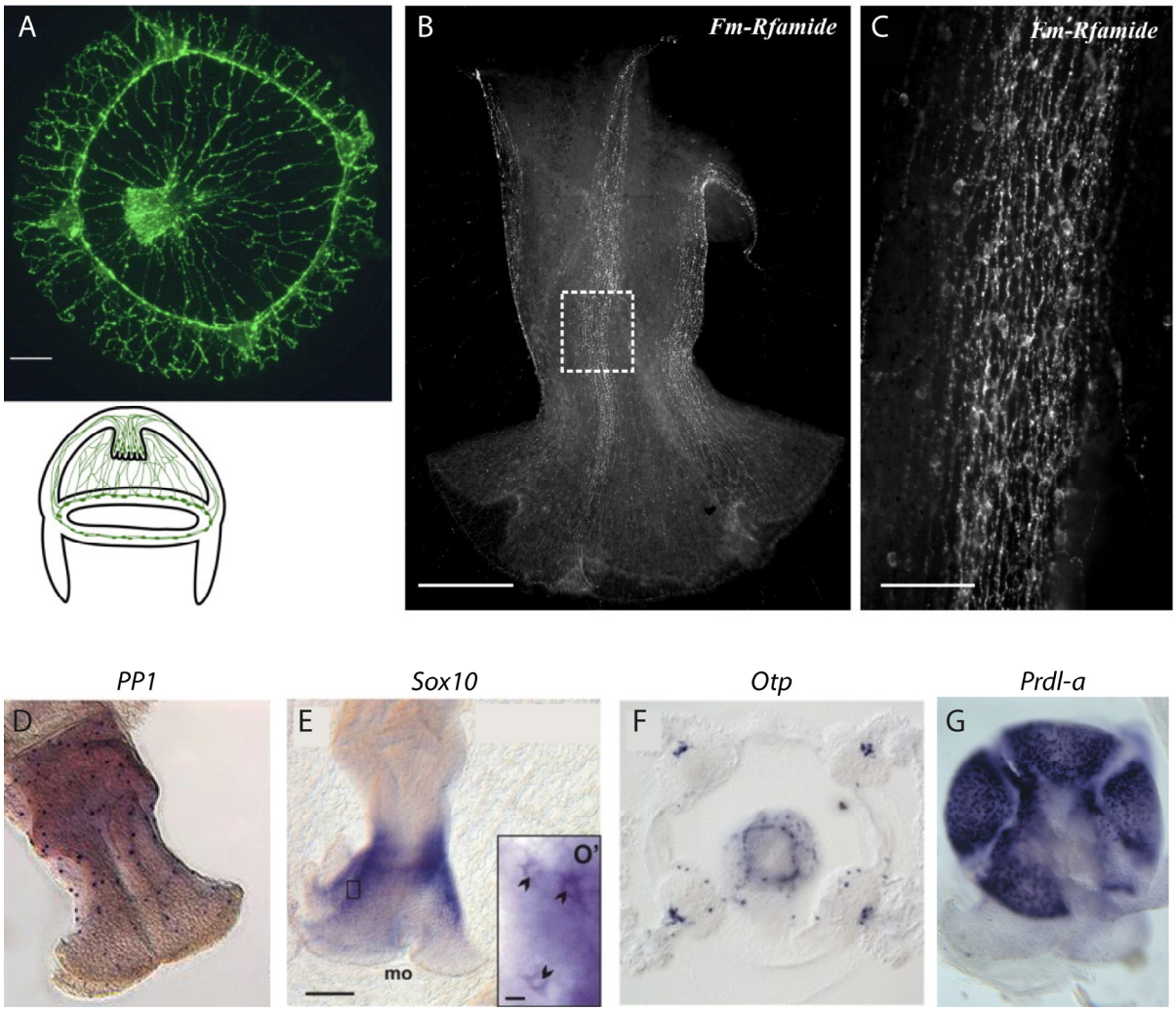


Figure 51 : Cellules nerveuses dans le manubrium de méduses hydrozoaires.
(A-C) Réseau nerveux visualisé par immunohistologie avec l'anticorps dirigé contre le neuropeptide RF-amide chez *Eirene sp*. (A) et *Clytia* (B-C). Manubrium en vue latérale, pole oral dirigé vers le bas.
Tiré de Koizumi *et al.* (2015) et de Jager *et al.* (2011).
(D-G) Patrons d'expression de *PP1*, *Sox10*, *Otp*, *Prdl-A* obtenus par ISH. Manubrium en vue latérale pour *PP1*, *Sox10* et *Prdl-A*, pole oral dirigé vers le bas ; vue orale pour *Otp*.
Tiré de Takeda *et al.* (2018); Jager *et al.* (2011); Kraus *et al.* (2015) et de Ruggiero (2015).

Chez l'hydre, les i-cells se différencient en précurseurs de cellules nerveuses (Davis 1974). L'expression de gènes impliqués dans la neurogenèse dans le manubrium de *Clytia* et la présence d'i-cells dans l'ectoderme semble indiquer que la différenciation en cellules nerveuses a lieu directement au niveau du manubrium.

I.2.4. Nématocytes

Les nématocytes sont les cellules urticantes caractéristiques des cnidaires, servant à la capture des proies et à la défense. Elles sont localisées principalement sur les tentacules, mais peuvent être présentes dans d'autres parties de la méduse. Chez le scyphozoaire *Cyanea capillata*, la distribution des nématocytes change avec le stade de développement. Au stade éphyrule, le manubrium est l'organe capturant les proies directement et hébergeant les nématocytes ; tandis que chez l'adulte les nématocytes sont présents surtout sur les tentacules (Higgins *et al.* 2008).

Chez *Clytia*, différents gènes impliqués dans la nématogenèse dans les bulbes tentaculaires sont exprimés à la base du manubrium. Il s'agit des gènes codant pour des minicollagen (mcoll) composant la paroi de la capsule du nematocyste (Kurz *et al.* 1991) *mcoll1* et *mcoll3*/4 (Fig.52.A) (Denker *et al.* 2008; Sinigaglia *et al.* 2018) et de la *nematogalectin* (Fig.52.B), un des composants du tubule (Hwang *et al.* 2010). Une zone de nématogenèse est donc très probablement présente à la base du manubrium.

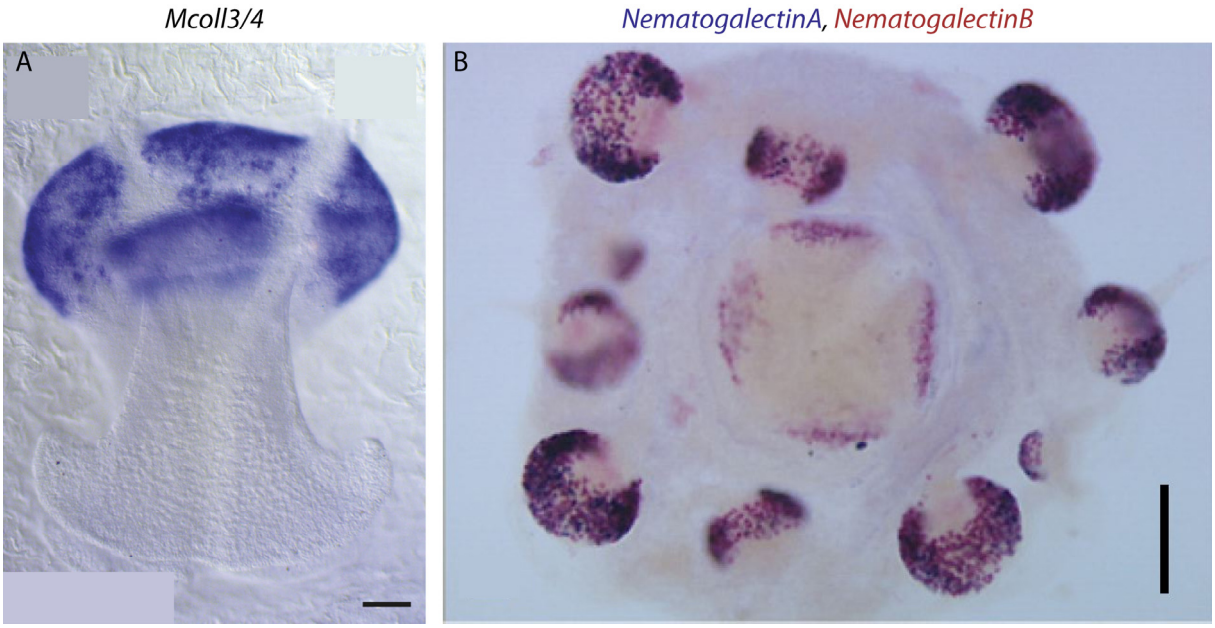


Figure 52 : Expression de gènes impliqués dans la nématogenèse dans le manubrium de *Clytia.*
(A) Patrons d'expression de *mcoll3/4* obtenu par ISH dans le manubrium de *Clytia e*n vue latérale.
Tiré de Sinigaglia *et al.* (2018).

(B) Patrons d'expression de *nematogalectinA et nematogalectinB* obtenus par ISH dans la méduse entière. Vue orale.
Tiré de Hwang *et al.* (2010).

I.2.5. Cellules glandulaires

Les cellules glandulaires sont localisées dans l'endoderme et sécrètent des enzymes digestives dans la cavité gastrique. Différents types couvrent les différentes régions du manubrium (Bouillon 1956, 1966). Ces dernières présentent un pédoncule et des flagelles en nombre variable (Bouillon 1956). Trois types de cellules glandulaires identifiées chez les hydrozoaires sont présents chez les méduses (Fig.53.A) (Bouillon 1966) :

- Deux types de cellules sécrétrices localisés dans la région hypostomale du polype et la région orale du manubrium de la méduse. Dans le manubrium, elles forment une couche glandulaire continue recouvrant les cellules myoépithéliales, qui adhèrent à la mésoglée (Fig.49, Fig.53.B et C) (Bouillon 1966).
    - Les **cellules glandulaires spumeuses** ayant une forme de massue ou de poire. Un pédoncule, dans lequel le noyau est localisé, les relie à la mésoglée. Les produits de sécrétion, d'aspect granuleux irrégulier, sont stockés dans de nombreuses vacuoles, qui se vident et se remplissent d'un coup. Ces cellules sécrètent surtout des mucopolysaccharides acides et peu d'enzymes (phosphatases alcalines et acides seulement) (Fig.53.A) (Bouillon 1956, 1966).
    - Les **cellules glandulaires sphéruleuses orales** ayant une forme cylindrique plus allongée que les cellules spumeuses, et un large pédoncule. Les enzymes sécrétées (phosphatases alcalines, acides, aminopeptidases, proteinases alcalines) sont stockées sous forme de gouttelettes rondes dans des vacuoles polygonales, qui sont expulsées au fur et à mesure (Fig.53.A) (Bouillon 1956, 1966).
- Les **cellules glandulaires sphéruleuses stomacales** localisées dans la région médiane et gastrique du manubrium (Fig.53.A). Elles sont plus grandes que les cellules glandulaires de la région orale, ont un flagelle et de larges vacuoles. Le noyau est aussi localisé dans le pédoncule. Seules les cellules avec des granules prêts à être sécrétés sont en contact avec la cavité gastrique. Ces cellules synthétisent de nombreuses enzymes (phosphatases alcalines, aminopeptidases, phosphatases acides, aliestérases, lipases, protéinases alcalines comme la trypsine). Leurs produits de sécrétion sont hétérogènes (Bouillon 1966).

Différentes enzymes ont été décrites dans le manubrium des méduses :

- L'**antistasin** est un inhibiteur de protéase. Il s'agit d'une enzyme à action anticoagulante, caractérisée initialement à partir des glandes salivaires de la sangsue mexicaine *Haementeria officinalis* (Tuszynskisb *et al.* 1987). Elle se trouve aussi dans les cellules glandulaires de l'hydre (Holstein *et al.* 1992; Hwang *et al.* 2007) et est exprimée dans les cellules glandulaires de la base du manubrium chez *Clytia*, ayant la morphologie de cellules glandulaires sphéruleuses (Fig.54.A) (Ruggiero 2015).

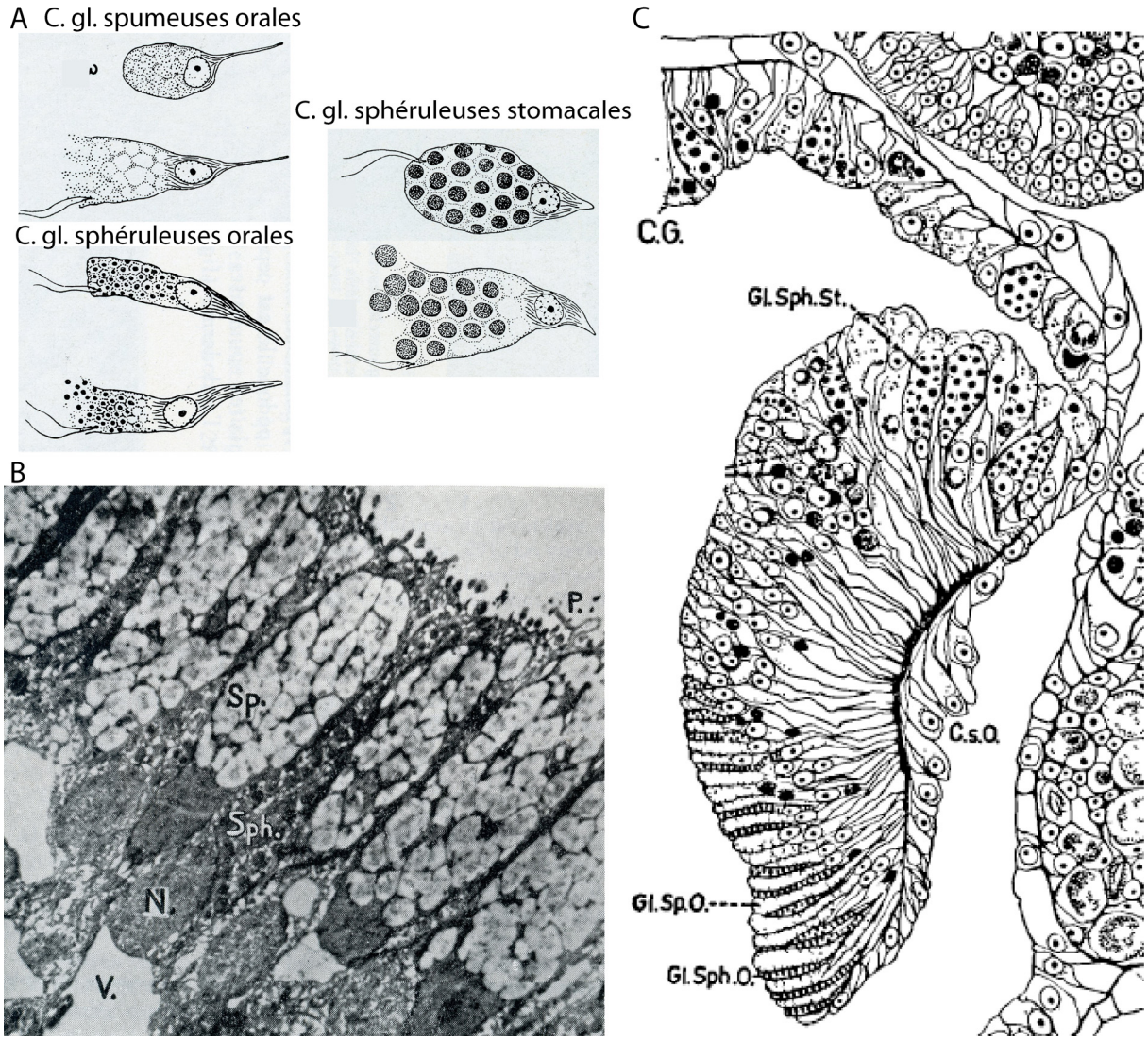


Figure 53 : Cellules glandulaires dans le manubrium des méduses.
(A) Représentation schématique des trois types de cellules glandulaires présentes dans le manubrium. C.gl. : cellules glandulaires.
Tiré de Bouillon (1956).
(B) Micrographie électronique de l'endoderme oral du manubrium de *Limnocnida tanganycae*. Abréviations : Sp. : cellule glandulaire spumeuse, Sph. : cellule glandulaire sphéruleuse, N. : noyau, V. Vacuole.
Tiré de (Bouillon 1956).
(C) Coupe radiaire d'une méduse *Eleutheria dichotoma* à travers le manubrium. Abréviations : C.G. : cellule glandulaire, C.s.O. : cavité sous-ombrellaire, Gl.Sp.O : cellule glandulaire spumeuse orale, Gl.Sph.O. : cellule glandulaire sphéruleuse orale, Gl.Sph.St : cellule glandulaire sphéruleuse stomacale.
Tiré de Bouillon (1966).

- **EPPT** est un tétrapeptide exprimé dans l'endoderme de l'extrémité de l'hypostome du polype et du manubrium de la méduse *Podocoryne carnea* (Fig.54.B) (Baader *et al.* 1995). L'ARNm code pour 63 répétitions en tandem du tétrapeptide 'glutamate-proline-proline-threonine'. Il est exprimé dans les cellules glandulaires sphéruleuses et des cellules ayant la morphologie de i-cells qui sont probablement les progéniteurs des cellules exprimant EPPT (Baader *et al.* 1995).
- **PMP1** est une metalloproteinase de la famille astacin-like identifiée chez *Podocoryne carnea* (Pan *et al.* 1998). Elle est exprimée dans les cellules endodermiques glandulaires du manubrium et dans les canaux radiaires (Fig.54.C et D). Son expression est induite par l'alimentation (Pan *et al.* 1998).
- Steinmetz *et al.* (2017) rapporte l'expression dans les cellules glandulaires d'*Aurelia aurita* de ***trypsin***, ***lipase pancréatique*** et ***chitinase***. Ces cellules sont localisées dans le gastroderme au niveau du tube de la bouche et dans les filaments gastriques (Fig.54.E) (Steinmetz *et al.* 2017).

I.3. Polarité du manubrium

Le manubrium possède un axe oral-aboral mis en évidence par des marqueurs de polarité conservés chez les cnidaires *FoxA*, *Brachyury* et *Wnt*.

I.3.1. Définition du territoire digestif par *FoxA*

FoxA est un FT de la famille forkhead exprimé dans l'endoderme du système digestif chez les cnidaires (*Nematostella vectensis* (Fritzenwanker *et al.* 2004; Steinmetz *et al.* 2017), Hydre (Martinez *et al.* 1997)) et les bilatériens (ex : *C. elegans* (Mango 2009), *Capitella teleta* (Boyle & Seaver 2008), *Strongylocentrotus purpuratus* (Oliveri *et al.* 2006)), ayant un rôle conservé dans la formation du système digestif. Avec *Otx* et *Brachyury*, *FoxA* est considéré comme faisant partie d'un programme génétique responsable de la formation de la bouche et du système digestif (Chen *et al.* 2017). Des études chez certains cnidaires ont révélé une corrélation entre le territoire exprimant *FoxA* et la localisation des cellules glandulaires et insulinergiques (Steinmetz *et al.* 2017). En effet, chez *Nematostella* et la méduse *Aurelia aurita*, ces cellules sont présentes uniquement dans les territoires exprimant *FoxA*, correspondant chez *Nematostella* au pharynx et aux filaments septés d'origine ectodermique, et chez *Aurelia* au tube de la bouche et aux filaments gastriques (Fig.55.A-D) (Kraus *et al.* 2015; Steinmetz *et al.* 2017). Chez la méduse *Clytia, FoxA* est exprimé dans l'endoderme du manubrium, à l'exception de la région orale (Fig.55.E) (Kraus *et al.* 2015; Steinmetz *et al.* 2017). Les cellules glandulaires n'ont pour l'instant pas été caractérisées.

I.3.2. *Brachyury* comme marqueur du pôle oral

Brachyury est un FT t-box ayant un rôle conservé dans la différenciation du mésoderme chez les vertébrés (Technau 2001). Chez de nombreux invertébrés dont les cnidaires, *Brachyury* est

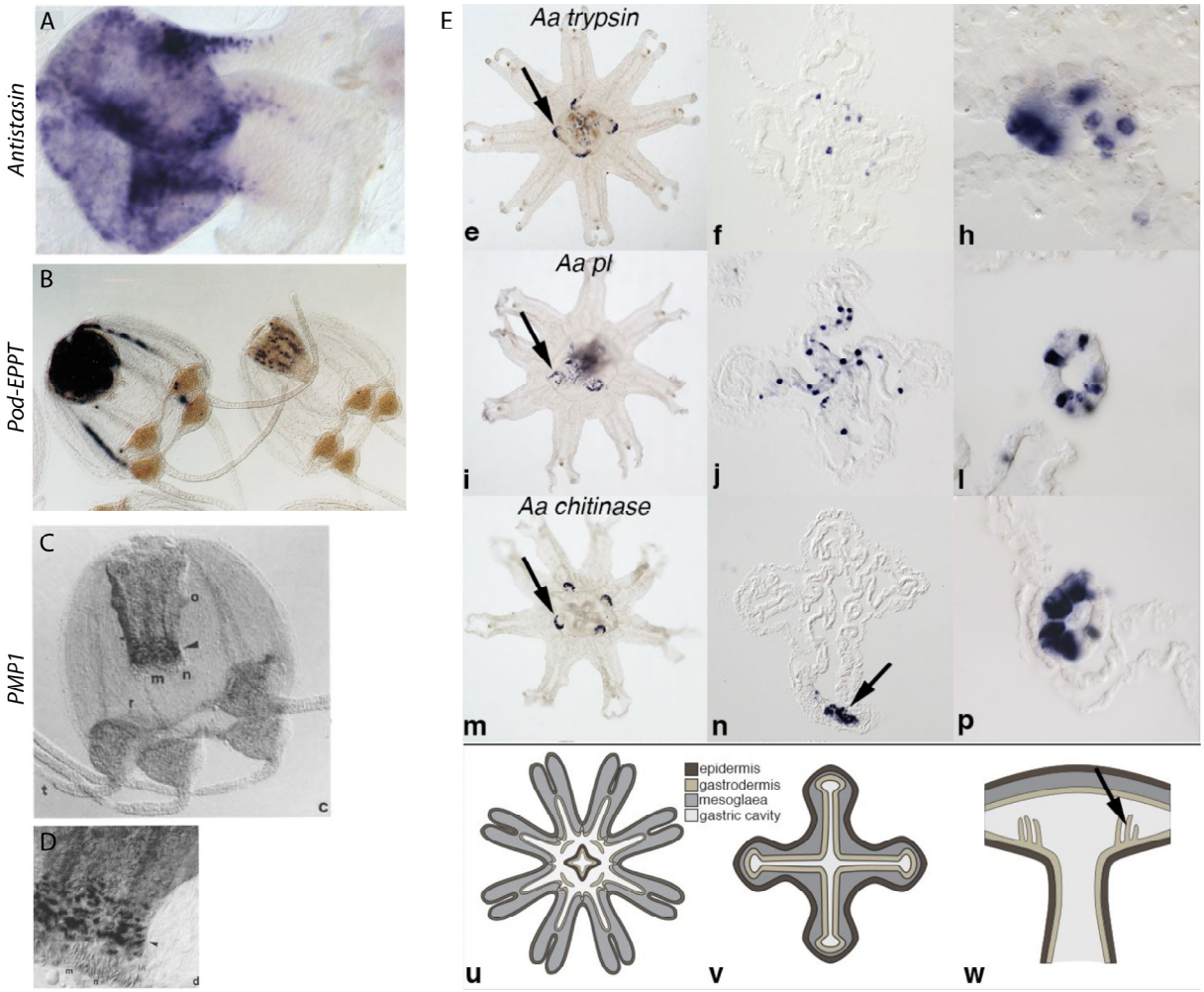


Figure 54 : Expression d'enzymes digestives dans le manubrium de méduses visualisée par ISH.

(A-D) Patrons d'expression de l'*antistasin* chez *Clytia*, et de *Pod-EPPT et PMP1* chez *Podocoryne carnea*. Manubrium (A et D) et méduses entières (B et C) en vue latérale.
Tiré de Ruggiero (2015) ; (Baader *et al.* (1995) ; Pan *et al.* (1998).
(E) Patrons d'expression des enzymes digestives trypsin (e-h), lipase pancréatique (i-l) et chitinase (m-p) chez l'éphyrule d'*Aurelia aurita*. (u-w) Schéma des structures. (e, i, m, u) Ephyrule entière. (f, j, n, v) Coupe transversale à travers le tube de la bouche. (h,l,p, w) Filaments gastriques.
Tiré de Steinmetz *et al.* (2017).

exprimé autour du blastopore, ce qui suggère une fonction ancestrale de *Brachyury* dans la spécification de ce dernier (Technau 2001). Chez les cnidaires, les orthologues de *Brachyury* sont exprimés au pôle oral chez le polype adulte et la régénération (*Nematostella* (Scholz & Technau 2003), Hydre (Technau & Bode 1999), *Podocoryne carnea* (Spring *et al.* 2002)). De plus, un des orthologues de *Brachyury* chez l'hydre, *HyBra1*, est un des premiers gènes exprimé au pôle oral pendant la régénération, et n'est pas exprimé dans les mutants reg-16 ne régénérant pas le pôle oral (Achermann & Sugiyama 1985; Technau & Bode 1999). Ces patrons d'expression sont cohérents avec l'hypothèse d'un rôle de *Brachyury* dans la spécification du territoire oral (Technau 2001). Sa fonction se serait étendue à la spécification du système digestif chez les bilatériens, ainsi que du mésoderme (mésoderme caudal viscéral chez les polychaetes, insectes et hémichordés, mésoderme axial chez les vertébrés) (Technau 2001). *Brachyury* est exprimé à l'extrémité du manubrium chez les méduses *Clytia*, *Aurelia aurita* et *Podocoryne carnea* (Fig.55.F-H) (Spring *et al.* 2002; Kraus *et al.* 2015).

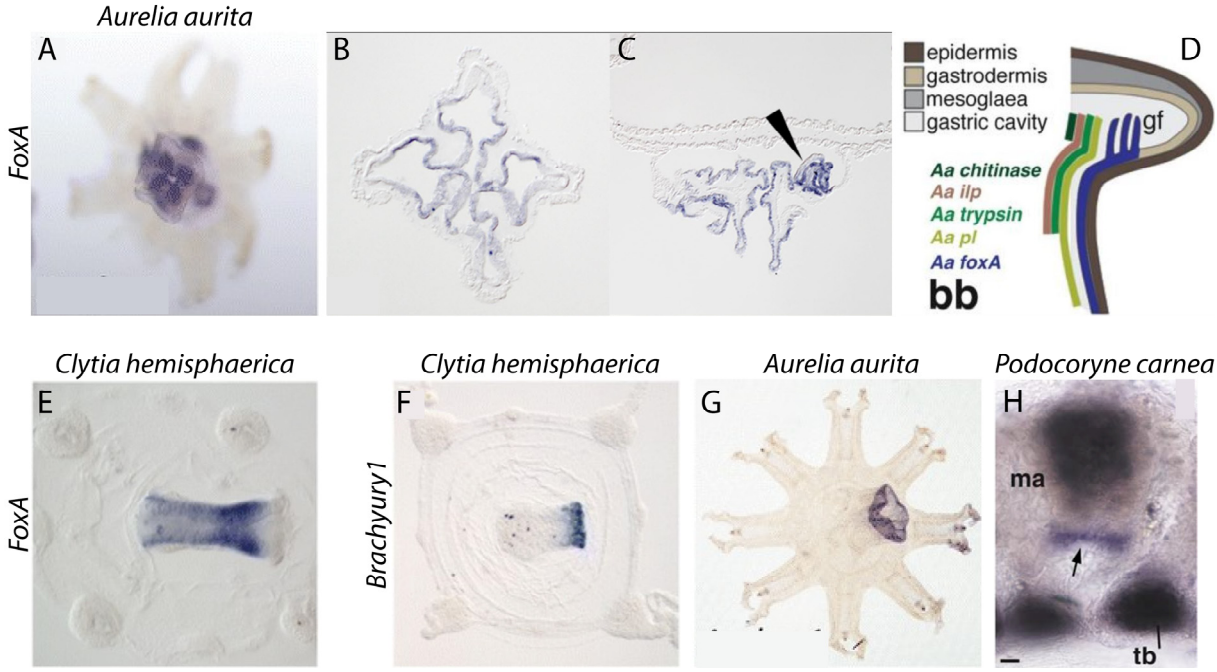


Figure 55 : Expression de facteurs de transcription dans le manubrium de méduses visualisée par ISH.
(A-C) Patrons d'expression de *FoxA* chez l'éphyrule d'*Aurelia aurita.* (A) Ephyrule entière. (B) Coupe transversale à travers le tube de la bouche. (C) Filaments gastriques.
(D) Schéma des domaines d'expression de foxA et des enzymes digestives dans la cavité gastrique de l'éphyrule. Abbréviation : gf : filaments gastriques.
Tiré de Steinmetz *et al.* (2017).
(E) Patron d'expression de *FoxA* chez *Clytia*. Manubrium en vue latérale.
Tiré de Kraus *et al.* (2015)
(F - H) Patrons d'expression *Brachyury1* chez l'éphyrule d'*Aurelia aurita, Clytia* et *Podocoryne carnea.* Manubrium en vue latérale. Abréviations : ma : manubrium, tb : bulbe tentaculaire.
Tiré de Kraus *et al.* (2015) et de Spring *et al.* (2002).

I.3.3. La voie Wnt/β-caténine dans le manubrium

Les protéines Wnt sont spécifiques des métazoaires. Chez les deutérostomes 11 à 19 ligands *Wnt* ont été décrits, répartis en 12 sous familles. De nombreux ligands *Wnt* sont présents dans les génomes des cnidaires. En effet, *Aurelia aurita*, *Morbakka virulenta*, *Nemopilema nomurai* et *Nematostella vectensis* possèdent entre 12 et 15 ligands *Wnt* (Kusserow *et al.* 2005; Putnam *et al.* 2007; Kim *et al.* 2018; Khalturin *et al.* 2019). Les analyses phylogénétiques indiquent que la diversification majeure des *Wnt* a eu lieu avant l'ancêtre commun entre les cnidaires et les bilatériens, qui possédait au moins 11 des sous-familles de gènes *Wnt* (Kusserow *et al.* 2005; Condamine 2018).

La voie Wnt/β-caténine a pour rôle conservé le contrôle du patterning de l'axe du corps primaire (Niehrs 2010). Chez les bilatériens, la voie Wnt/β-caténine régule la formation du pôle postérieur avec pour la plupart des deutérostomes l'expression de ligands *Wnt* au pôle postérieur et l'expression d'inhibiteur au côté antérieur (review : (Petersen & Reddien 2009b)). Tandis que chez les cnidaires les ligands *Wnt* sont exprimés de façon polarisée le long de l'axe oral-aboral (Hydre (Lengfeld *et al.* 2009), *Nematostella* (Kusserow *et al.* 2005), *Clytia* (Momose *et al.* 2008)).

L'expression des ligands *Wnt* chez les méduses a été caractérisée chez l'hydrozoaire *Clytia* et le scyphozoaire *Aurelia aurita* (Condamine 2018). 12 gènes *Wnt* sont présents chez *Clytia*, 9 sont exprimés dans le manubrium. 13 sont présents chez Aurelia, 10 sont exprimés dans le manubrium. Les patrons d'expression sont variés, couvrant différents territoires selon l'axe proximo-distal de l'ectoderme et l'endoderme. Les manubriums de *Clytia* et *d'Aurélia* présentent une symétrie tétraradiaire, visible au côté oral par la présence de quatre lobes se prolongeant par quatre arêtes au niveau de la colonne. Chez *Aurelia*, certains *Wnt* sont exprimés au niveau des quatres lobes ou dans l'endoderme des sillons formés dans le prolongement des lobes, leur donnant une symétrie tétraradiaire (Condamine 2018). Seule l'expression des *Wnt* dans le manubrium de *Clytia* sera détaillée ici (Fig.56.A).

Dans l'ectoderme de la partie la plus distale sont exprimés *Wnt1*, *Wnt1b*, *Wnt3* et *Wnt6*. L'expression de *Wnt1* et *Wnt1b* est restreinte à l'extrémité des lobes, tandis que le territoire de *Wnt3* et *Wnt6* est plus étendu mais reste confiné à la partie orale. *Wnt4* est exprimé dans l'ectoderme entre la région orale et la colonne. *Wnt2* est exprimé dans l'endoderme et l'ectoderme dans la partie proximale (base et colonne). Quant à *Wnt5b*, *Wnt11b* et *WntA*, ils sont exprimés dans tout l'endoderme (Condamine 2018).

Quatre récepteurs Fzl (Frizzled) ont été décrits chez *Clytia* (Fig.56.B). Trois d'entre eux présentent une expression échelonnée le long du manubrium. Le récepteur *Che-Fzl III* est exprimé dans la colonne du manubrium dans l'endoderme (Momose & Houliston 2007; Condamine 2018). *Che-Fzl I* est exprimé dans la base et la colonne, potentiellement dans l'ectoderme et l'endoderme. *Che-Fzl II* est exprimé dans l'endoderme à la base. L'expression de *Che-Fzl IV* est moins claire, il s'agit soit de cellules dispersées dans l'endoderme, soit de marquage aspécifique (Condamine 2018).

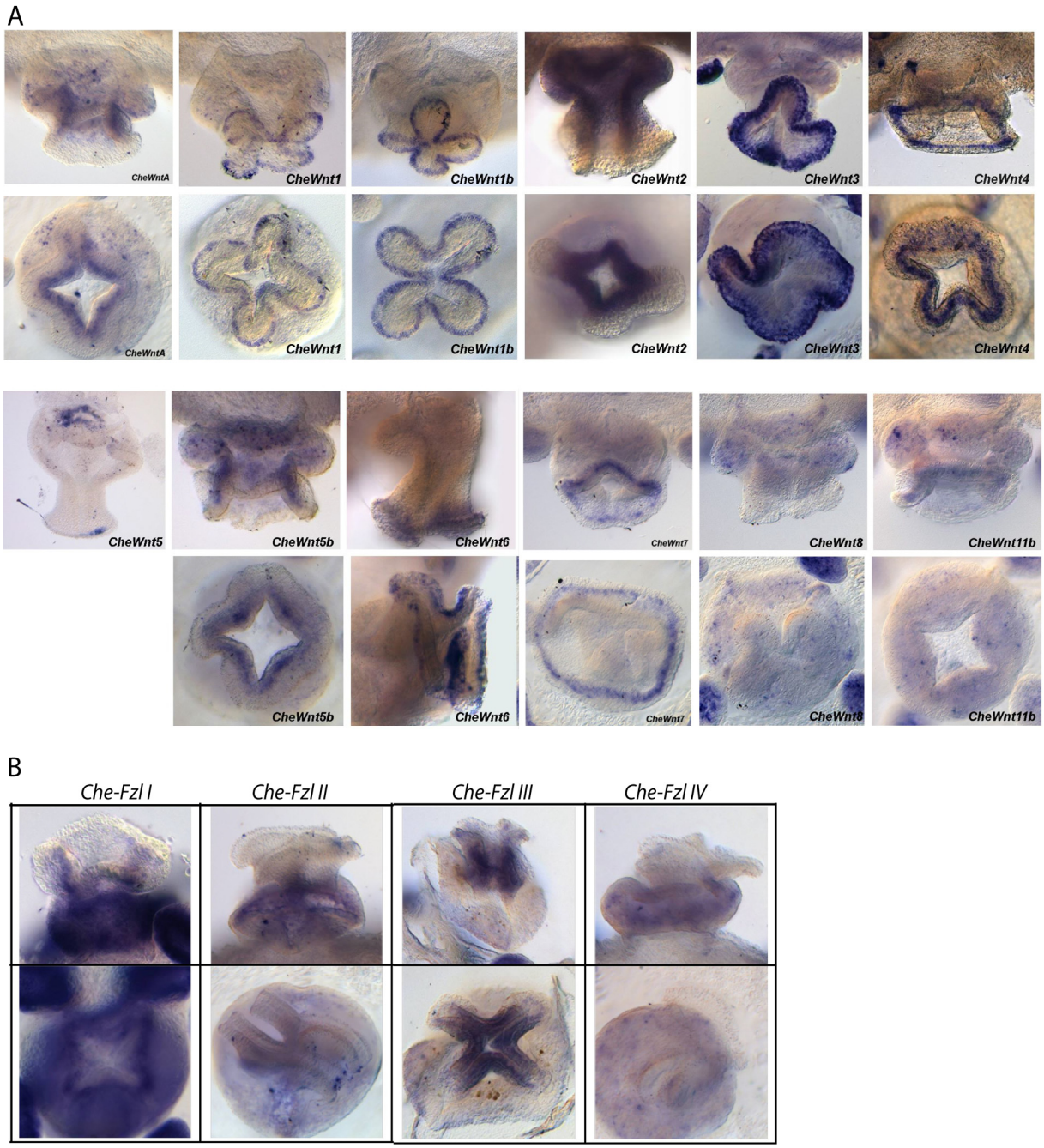


Figure 56 : Expression des *Wnt* et des *Fzl* dans le manubrium de *Clytia* visualisée par ISH.
(A) Patrons d'expression des 12 ligands Wnt dans le manubrium de *Clytia*. Vue latérale, pôle oral vers le bas et vue latérale.
(B) Patrons d'expression des quatre récepteurs Fzl dans le manubrium de *Clytia*. Vue latérale, pôle oral vers le haut et vue latérale.
Tiré de Condamine (2018).

I.4. Homologie des structures de la méduse et du polype

Afin de pouvoir comparer les données d'expression de gènes obtenues chez *Clytia* avec les informations connues chez les polypes, il est important de savoir à quelle partie du polype le manubrium des méduses, situé au pôle oral, est homologue. Le pôle oral des polypes est composé de l'hypostome, formé d'une zone distale portant la bouche et d'une zone proximale entourée par l'anneau de tentacules. Trois théories s'opposent concernant l'homologie entre les structures du polype et celles de la méduse.

Dans les livres de biologie animale, la méduse est souvent présentée comme un polype à l'envers (Korschelt & Heider 1893). Dans ce scénario, l'axe oral-aboral est fortement rétréci. Cette comparaison est basée uniquement sur des similarités morphologiques, notamment entre les tentacules oraux du polype et ceux de la méduse.

Une autre théorie basée sur des études réalisées chez des hydrozoaires a été proposée par Allman et Hadzi, (Allman 1871; Hadzi 1909). L'ombrelle serait dérivée, non pas d'un aplatissement du corps du polype, mais d'une fusion de rudiments de tentacules et d'un élargissement de l'hypostome (Fig.57.a). L'homologie entre l'ombrelle de la méduse et les tentacules du polype est soutenue par les expériences récentes de Kraus *et al.* (2015). Ils ont déterminé que des marqueurs de l'endoderme et de l'ectoderme des tentacules des polypes sont exprimés respectivement dans l'endoderme et l'ectoderme de la sous-ombrelle. Cependant, certaines données obtenues sont en défaveur de l'élargissement de l'hypostome puisque des marqueurs du pôle oral du polype sont exprimés uniquement au niveau du manubrium des méduses (Fig.57.b) (Kraus *et al.* 2015).

Selon Kraus *et al.* (2015), une troisième théorie suppose l'homologie entre le polype entier et le manubrium des méduses. Elle a été proposée par Huxley (1859), et Metchnikoff (1886). Huxley nomme même le manubrium « polypite ». La question de l'origine de l'ombrelle reste ouverte. Selon Huxley, l'ombrelle serait une structure nouvelle sans homologie avec le polype (Huxley 1859). Alors que pour Metchnikoff (1886), l'ombrelle serait dérivée d'un réseau de stolons modifiés (Metchnikoff 1886).

Ces trois théories semblent s'accorder sur l'homologie entre le pôle oral du polype et celui de la méduse, marqué par l'ouverture de la cavité digestive portée respectivement par l'hypostome ou le manubrium.

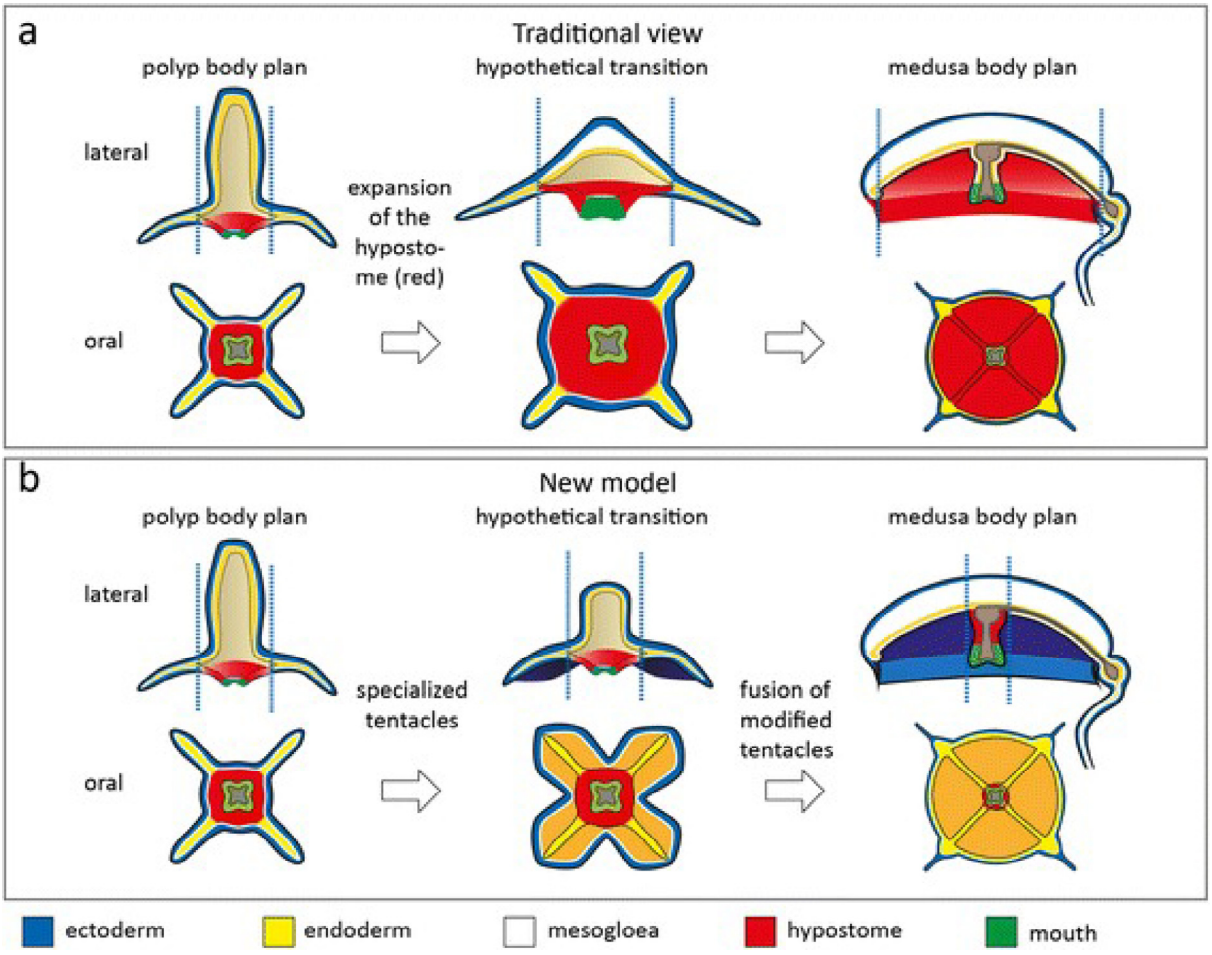


Figure 57 : Deux modèles d'homologie entre les structures de méduses et celles de polypes.
(a) Modèle d'Allman (1971) et Hadzi (1909).
(b) Modèle de Kraus *et al.* (2015).
Tiré de Kraus *et al.* (2015).

I.5 Objectifs du chapitre 2

Il y a actuellement assez peu d'informations sur le manubrium des méduses, et particulièrement sur celui de *Clytia*. Plus particulièrement, une description de sa structure et des différents types cellulaires est manquante. Cette description est nécessaire pour comprendre la dynamique des gènes pendant la régénération. Avant d'analyser les données transcriptomiques, j'ai donc réalisé une description morphologique du manubrium de *Clytia*, pour pouvoir comprendre les patrons d'expression des gènes. La description a été faite avec des marqueurs bien établis au laboratoire.

Je me suis ensuite intéressée aux gènes impliqués dans la régénération en identifiant des gènes candidats grâce aux données transcriptomiques générées. Dans un premier temps j'ai analysé la dynamique des gènes pendant la régénération, pour établir une liste de gènes potentiellement impliqués dans différentes phases de régénération. A partir de ces listes, j'ai 1) identifié des marqueurs des différents types cellulaires et ainsi étudié leur réapparition pendant la régénération ; et 2) analysé quelques voies de signalisation et FT candidats pour un rôle dans le rétablissement du pôle oral pendant la régénération.

L'analyse des données transcriptomiques est encore incomplète. J'ai pour l'instant utilisé une approche de gènes candidats. Une analyse globale non biaisée reste à faire. Le clustering des différents profils d'expression permettrait de savoir si certaines familles de gènes ont une dynamique préférentielle pendant la régénération, et si certaines phases de la régénération sont enrichies en gènes *Clytia*-spécifiques. De plus, la caractérisation spatiale des profils d'expression par ISH pour d'avantage de gènes sera nécessaire afin de couvrir les différents profils et ainsi finaliser la validation des données transcriptomiques.

II. Matériel et méthodes

II. 1. Immunohistologie et marquage des cellules en prolifération par incorporation d'EdU

Les méduses utilisées pour les expériences ainsi que les protocoles d'immunohistologie, coloration à la phalloïdine, marquage des cellules en prolifération par incorporation de l'EdU sont détaillés dans la section "matériel et méthodes" de l'article du chapitre 1.

Les cellules nerveuses, nématocytes, cils et flagelles ont été visualisés avec l'anticorps monoclonal anti-tubuline tyrosylée (appelé YL1/2) (rat, Thermofischer). Les neurones synthétisant le peptide RF-amide ont été visualisés avec l'anticorps anti FMRF-amide (lapin, Immunostar); et les neurones synthétisant les peptides PRP-amide et PRA-amide avec les anticorps polyclonaux anti-PRPamide et anti-PRAamide (lapin, Takeda 2018).

II.2. Histologie

Les marquages histologiques Hématoxyline-Eosine (HE) et la réaction PAS ont été réalisés sur des méduses fixées avec de la PFA 4% dans un tampon contenant de 0,1M d'hepes, 50mM d'EGTA, 10mM de MgSO4 et 0,8M de maltose. La coloration HE a été réalisée selon le protocole d'Alié *et al.* (2018) utilisé chez *Polyandrocarpa zoritensis*. Les méduses ont été deshydratées par des concentrations croissantes d'éthanol et de butanol puis inclues dans la paraffine. Les sections de 5-6µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome à main puis colorées à l'HE. Les méduses ont été incubées 3 min dans l'Hématoxyline M (hematoxylin Solution, Mayer's; Sigma–Aldrich), lavées 10 min à l'eau du robinet, colorées 15 sec dans la solution d'Eosine Y (1g d'Eosin Y en poudre dans 20 mL d'eau mq et 80 mL d'EtOH 95%), puis rincée avec l'ethanol 95%, déshydratées et montées.

Pour la réaction PAS, les méduses ont été déparaffinées et réhydratées, oxydées pendant 5 min dans la solution à 0,5% d'acide périodique puis rincées à l'eau distillée. Elles ont ensuite été placées dans le réactif de Schiff pendant 15 min et rincées à l'eau du robinet pendant 5 min. Puis elles ont été colorées à l'hématoxyline pendant 1 min, rincées à l'eau du robinet pendant 5 min, deshydratées et montées.

Les photos des coupes histologiques ont été prises sur le microscope Zeiss Axio Imager 2.

II.3. Design expérimental du transcriptome

Les échantillons ont été préparés à partir de méduses de la souche Z4B (femelles), de 11 à 12 jours, d'une taille entre 4 et 5mm, avec 12 bulbes tentaculaires. Elles étaient affamées pendant 24h avant dissection. Les échantillons sont de trois types différents : des méduses entières après ablation du manubrium (appelés MdEJ), des zones centrales allant jusqu'aux gonades non inclues, après ablation du manubrium ou non (appelées MdCA) et des méduses entières pour

lesquelles une portion de l'ombrelle proche du manubrium a été ôtée (appelés UdEJ) (Fig.58). Les dissections ont été réalisées sur des boîtes de pétri avec un fond d'agarose 2% dans de l'eau de mer artificielle (sel de la mer Rouge, salinité 37°/.. (Red sea salt, RedSea) filtrée et avec antibiotiques (penicilline et streptomycine 1/1000, concentration stock : 10 000 unités de penicilline et 10 mg de streptomycine /mL). Les ablations du manubrium et d'une portion de l'ombrelle ont été réalisées en perçant un trou traversant la sous-ombrelle, la mésoglée et l'exombrelle, respectivement au centre de l'ombrelle ou à côté du manubrium entre les canaux radiaires, avec un cône de P200 (Sorenson, BioScience). Les méduses ont ensuite été laissées à régénérer dans l'eau de mer filtrée avec antibiotiques à 18°C. Pour chaque type d'échantillon, les temps suivants ont été préparés : méduse non disséquée (nd), 0hpd, 6hpd, 12hpd, 24hpd et 48hpd. Chaque temps a été réalisé en duplicat, deux en triplicat (MdEJ 0hpd et 24hpd), faisant un total de 36 échantillons. De nombreuses méduses ont été combinées par échantillon. Le nombre de méduses par échantillon, sont indiqués dans le tableau 1 (en annexe du chapitre).

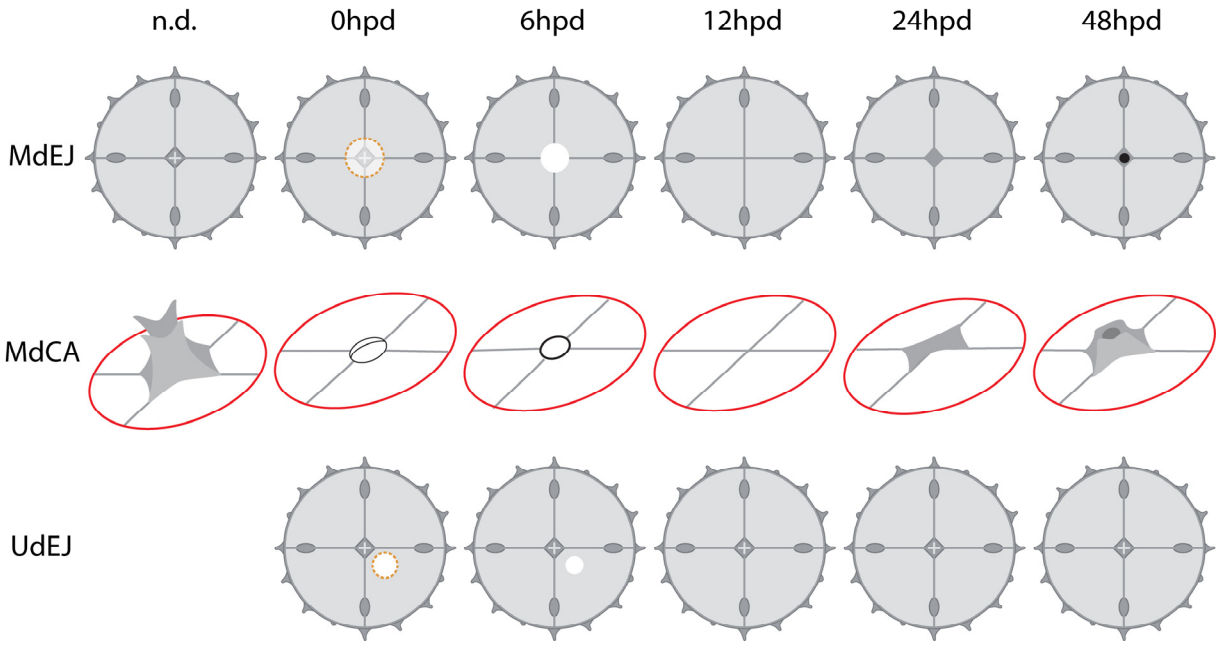


Figure 58 : Design expérimental du transcriptome.
Schémas des échantillons collectés. Le cercle jaune indique la zone ôtée par la dissection, le cercle rouge la zone collectée pour les zones centrales.

II.4. Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait avec le kit RNAqueous-micro kit (ambion) en suivant le protocole indiqué. Juste avant la lyse avec le tampon de lyse du kit, les tentacules des échantillons de méduses entières (MdEJ et UdEJ) ont été coupés, et les zones centrales des échantillons MdCA ont été isolées par une découpe avec des ciseaux ophtalmologiques (Fine Science Tool, référence 15000). La zone coupée est indiquée dans la figure 58. Les méduses ont été plongées dans le

tampon de lyse par groupe de cinq. Elles ont ensuite été congelées à l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN. L'extraction a été suivie immédiatement par un traitement à la DNaseI (Q1 DNase, Promega) pendant 20min à 37°C. Puis l'ARN a été purifié grâce au kit RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) en suivant le protocole du kit. L'élution finale a été faite dans 25µL d'eau mq. La qualité de l'ARN a été vérifiée par le 'Agilent 2100 Bioanalyzer'. Les valeurs de quantité d'ARN extraite, ainsi que le ratio 28S/18S renseignant sur la qualité sont indiquées dans le tableau 1 (en annexe du chapitre). L'ARN a été stocké à -80°C avant le séquençage.

II.5. Séquençage, assemblage et contrôle de la qualité des échantillons

Les échantillons ont été séquencés par la société BGI grâce à la technologie BGISEQ-500 (Mortazavi *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009). Le séquençage a été réalisé en single reads d'une longueur de 50pb et a généré environ 24 millions de reads par échantillon. Les analyses bioinformatiques présentées dans ce paragraphe ont été faites par BGI. Tout d'abord les reads contenant la séquence de l'adapteur, ou plus de 10% de bases inconnues, ou les reads de basse qualité (définis par BGI comme les reads contenant 50% de bases avec qualité de séquençage inférieure à 5) ont été ôtés (au maximum 0,5% du nombre total de reads). Les reads ont ensuite été alignés sur le transcriptome de référence dont l'assemblage a été fait grâce au génome (Leclère *et al.* 2019) par HISAT (Kim *et al.* 2015)/Bowtie2 (Langmead *et al.* 2009). L'expression a été quantifiée par le package RSEM (Li & Dewey 2011). Le nombre de reads par gène est exprimé en FPKM, correspondant au nombre de fragments alignés sur le gène d'intérêt par million de reads et rapporté à la taille du gène d'intérêt. Puis le coefficient de corrélation entre les valeurs d'expression des gènes entre les échantillons a été calculé et une matrice de corrélation a été réalisée. Un arbre de regroupement (cluster tree) a été réalisé en calculant les distances entre échantillons par algorithme de Sumof Squares of deviation. Une analyse en composantes principales (ACP), permettant de visualiser la variation entre les échantillons selon les quatre variables principales, a également été réalisée. Noiseq (Sonia Tarazona *et al.* 2011) a été utilisé pour identifier des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons.

II.6. Recherche de gènes d'intérêt

La société BGI fournit également une analyse d'expression différentielle. Cependant, elle a été faite à partir de l'assemblage du transcriptome séparant les variants d'épissage, ce qui peut générer des résultats faux positifs. J'ai donc recherché les gènes d'intérêt ayant une expression dynamique pendant la régénération à partir des données d'expression par échantillon en FPKM fournies par BGI. Les valeurs d'expression des gènes ont été calculées en additionnant celles des différents variants d'épissage. En comparant les données d'expression au cours de la régénération, j'ai pu identifier différents types de profil d'expression. Les gènes sélectionnés pour la validation des profils par ISH sont des gènes candidats connus chez *Clytia*, ou des gènes non caractérisés identifiés par blast réciproque sur les plateformes NCBI et MARIMBA (Marine Invertebrate Models Database http://marimba.obs-

vlfr.fr/organism/Clytia/hemisphaerica) et détermination des domaines protéiques par PFAM. La liste des gènes sélectionnés est présentée dans les tableaux 2 à 4 (en annexe du chapitre).

II.7. ISH colorimétrique et fluorescente

Toutes les ISH ont été réalisées selon le protocole décrit par Sinigaglia *et al.* (2018) sur des méduses âgées de deux semaines, d'une taille entre 4 et 6 mm. Les sondes utilisées ont été synthétisées à partir de clones d' 'expressed sequence tag' (EST). Après repiquage des clones sur du milieu LB Agar avec de l'ampicilline, puis culture liquide en milieu LB à 37°C pendant une nuit, les plasmides sont extraits avec le kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). L'ADN extrait est ensuite envoyé pour séquençage chez Beckman Coulter Genomics. Selon le sens d'insertion de la séquence, le plasmide est digéré avec l'enzyme de digestion SmaI ou NotI, puis transcrit avec la polymérase T7 ou SP6. La digoxygénine est attachée aux sondes pendant la transcription. Deux étapes de purification après la digestion et après la transcription sont réalisées respectivement avec les kits Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) et illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare Life Sciences). Les sondes sont stockées à -20°C dans 50% de formamide déionisé. La liste des sondes utilisées est présentée dans les tableaux 2 et 3 (en annexe du chapitre).

Le protocole de FISH et FISH-EdU est détaillé dans la section "matériel et méthodes" de l'article du chapitre 1. Les sondes utilisées sont les mêmes que pour l'ISH colorimétrique. Pour le marquage FISH-YL, la FISH a été réalisée, suivie de l'immunohistologie et le marquage des noyaux au hoechst 33258.

Les photos d'ISH colorimétrique ont été prises sur le microscope Zeiss Axio Imager 2. Les photos en fluorescence ont été prises avec le microscope confocal Leica Sp8. Les projections de l'intensité maximale des z-stack ont été réalisées avec ImageJ. Certaines photos ont été éclaircies avec ImageJ et Adobe Photoshop CS6.

III. Résultats

III.1. Description du manubrium de *Clytia*

Dans la littérature, le manubrium des méduses est séparé en trois parties : la zone orale à l'extrémité distale, la zone médiane et la zone stomacale à la base. Nous avons déterminé que ces trois zones sont aussi représentées dans le manubrium de *Clytia* (Fig.59.A). La zone orale est la plus distale du manubrium. Elle comprend les quatre lobes, extrêmement mobiles, permettant de diriger les proies vers la cavité. La zone médiane est la portion de manubrium ressemblant à une colonne, présentant bien dans le prolongement des lobes, les quatre arêtes décrites par Jager *et al.* (2011). L'estomac est présent à la base. Il est composé de quatre renflements, localisés entre les canaux radiaires, formant quatre poches gastriques. Les cellules accolées à la sous-ombrelle constituent un plancher servant d'assise au manubrium. Une coloration au rouge neutre, réalisée par Volker Hartenstein, montre que les cellules ont une morphologie différente en fonction des zones, indiquant une composition en cellules variée, particulièrement dans l'endoderme (Fig.59.B).

Un marquage à la phalloïdine du manubrium de *Clytia*, nous a permis de visualiser les fibres musculaires de l'ectoderme et de l'endoderme, orientées respectivement de façon longitudinale et circulaire (Fig.59.C). Les fibres longitudinales des cellules ectodermiques ont été détectées sur toute la longueur du manubrium, à l'exception de la partie la plus distale où sont concentrés les nématocytes. Au niveau de la base, elles sont en continuité avec ceux de la sous-ombrelle.

Les mouvements du manubrium sont coordonnés par un réseau nerveux, présent dans l'ectoderme et l'endoderme. Certaines cellules nerveuses ainsi que les neurites sont visibles par immunohistochimie avec l'anticorps anti-tubuline-alpha-tyrosylée YL1/2 (Fig.60.A). Le réseau est présent dans tout l'ectoderme du manubrium et a une densité plus importante au niveau des quatre arêtes, comme décrit par Jager *et al.* (2011). Les fibres nerveuses ont une orientation préférentielle longitudinale. Des cellules peptidergiques, visualisées par immunohistologie avec des anticorps dirigés contre les peptides RF-amide, PRP-amide et PRA-amide (Volker Hartenstein, données non publiées) ou par FISH pour les cellules synthétisant RF-amide (Fig.60.A), sont également présents dans l'ectoderme.

Un réseau nerveux marqué par l'anticorps YL1/2 est également présent dans l'endoderme (Fig.59.D). La plupart des cellules nerveuses endodermiques ont la morphologie de neurones sensoriels (un prolongement apical dirigé vers la cavité). Parmi les peptides testés par Volker Hartenstein (RF-amide, PRP-amide et PRA-amide), seul PRP-amide est présent dans l'endoderme. Les neurones synthétisant PRP-amide ne sont pas visibles avec l'anticorps YL1/2, et sont principalement concentrés à la limite entre la zone orale et la colonne (Fig.59.E). Quelques cellules dispersées sont présentes à la base.

L'ectoderme de la base du manubrium héberge des populations de cellules variées, dont les i-cells (voir Chapitre 1). Ces cellules exprimant *Nanos1* sont concentrées au niveau des renflements des poches gastriques. Quelques-unes sont dispersées dans l'ectoderme de la colonne (Fig.60.A). Certaines cellules exprimant *Nanos1* à la base du manubrium sont également marquées par l'anticorps YL1/2. *Nanos1* étant exprimé dans les i-cells et l'anticorps YL1/2 marquant les cellules nerveuses, il s'agit potentiellement de précurseurs de cellules neurales ou de nématocytes (Fig.60.A).

De nombreuses cellules du manubrium incorporent l'EdU après 1h d'incubation, indiquant un cycle cellulaire rapide (voir Chapitre 1). La prolifération est surtout concentrée à la base, dans l'ectoderme, dans la même zone que les cellules exprimant *Nanos1* (Fig.60.B). Un double marquage combinant FISH *Nanos1* et EdU montre que certaines des cellules en prolifération sont des i-cells (Fig.60.B). On retrouve aussi des cellules marquées à l'EdU dans l'ectoderme de la colonne, ainsi qu'en moindre nombre dans l'endoderme de la base et de la colonne. Les lobes en contiennent très peu.

La base du manubrium de *Clytia* est connue pour être une zone de nématogenèse (voir introduction de ce chapitre). En effet, des gènes impliqués dans la différenciation des nématocytes y sont exprimés (Denker 2008, Hwang 2010). De plus des capsules immatures sont visibles par immunohistologie avec l'anticorps YL1/2. Les capsules de nématocytes matures, visibles avec l'anticorps YL1/2 et par microscopie DIC sont réparties dans tout l'ectoderme du manubrium, et concentrées au niveau des lobes (Fig.60.C).

Concernant les cellules endodermiques, elles sont caractérisées par un noyau positionné dans la zone basale des cellules, et des vacuoles en région apicale. Elles sont de différents types en fonction de leur position dans le manubrium. Deux types ont été identifiés. Les cellules glandulaires sont visibles dans les lobes du manubrium et la colonne grâce à une coloration avec la réaction de PAS colorant les cellules contenant des polysaccharides (Fig.60.D). La microscopie électronique à transmission permet d'identifier les deux types de cellules glandulaires décrits par Bouillon (1956, 1966) au niveau de la colonne : les cellules glandulaires spumeuses et sphéruleuses, reconnaissables à leurs vacuoles (Fig.60.E). Les cellules glandulaires de la base ne sont pas marquées par la coloration PAS, mais sont bien visibles en microscopie électronique (Fig.60.E). Le deuxième type de cellules endodermique est présent à la base et dans la partie proximale de la colonne. Il s'agit de grosses cellules fortement marquées à la phalloïdine (Fig.60.F). Elles contiennent de nombreuses vacuoles et sont parfois multinucléées. Elles s'intercalent avec des cellules faiblement marquées à la phalloïdine. En microscopie électronique à transmission, les cellules glandulaires de la base alternent avec des cellules contenant des inclusions dans le cytoplasme (Fig.60.F). Leur distribution à la base du manubrium est la même que celle des cellules marquées à la phalloïdine, il s'agit probablement de la même population de cellules. Elles pourraient être les cellules digestives absorbant les nutriments. Cette population des cellules inclue les cellules gastrodermiques circulantes caractérisées dans le chapitre 1 (voir aussi introduction du chapitre 2), capables d'ingérer des microbilles fluorescentes et de circuler à travers tout le système gastrovasculaire.

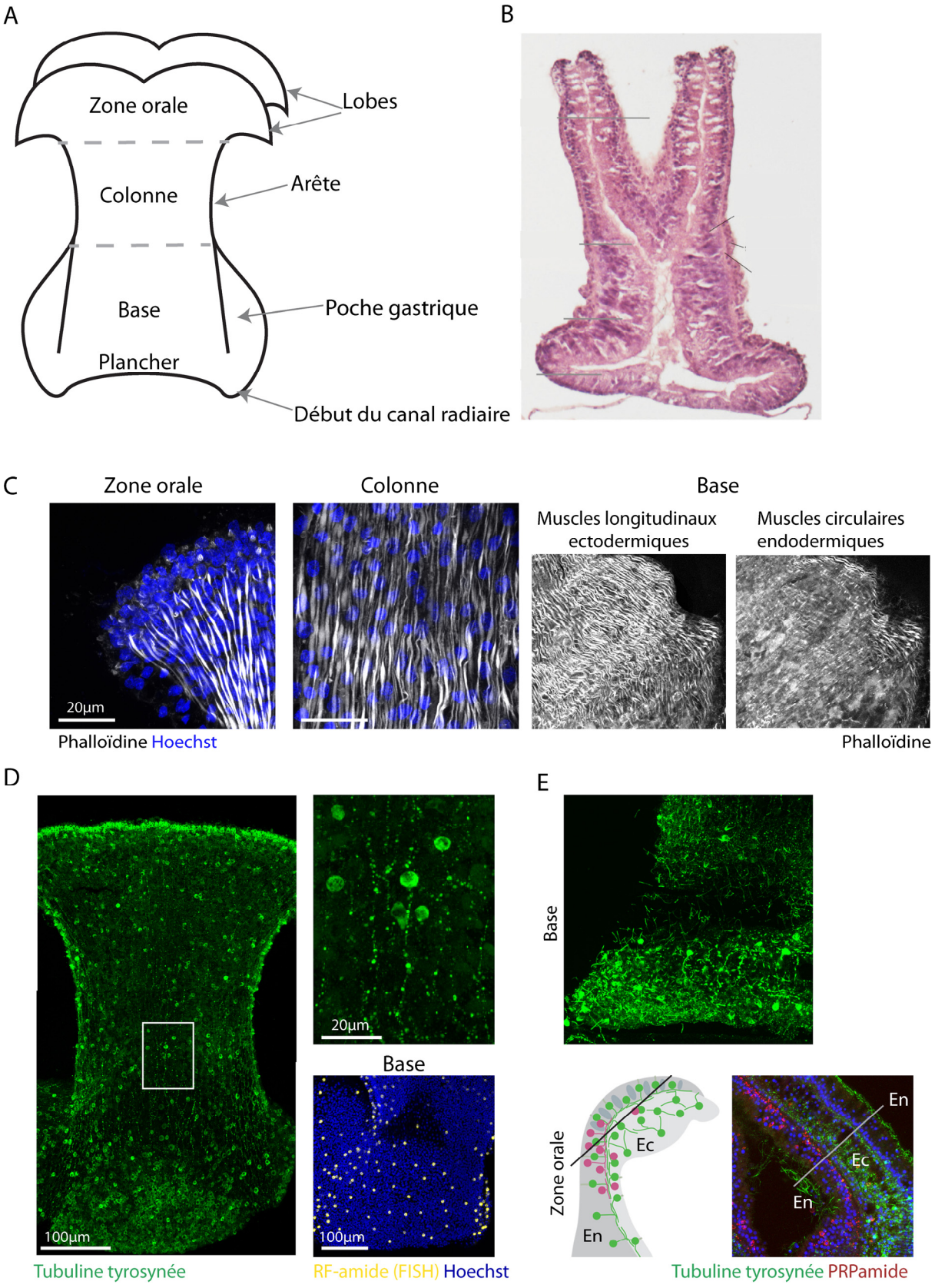


Figure 59 : Morphologie du manubrium et réseau nerveux.
(Légende sur la page suivante)

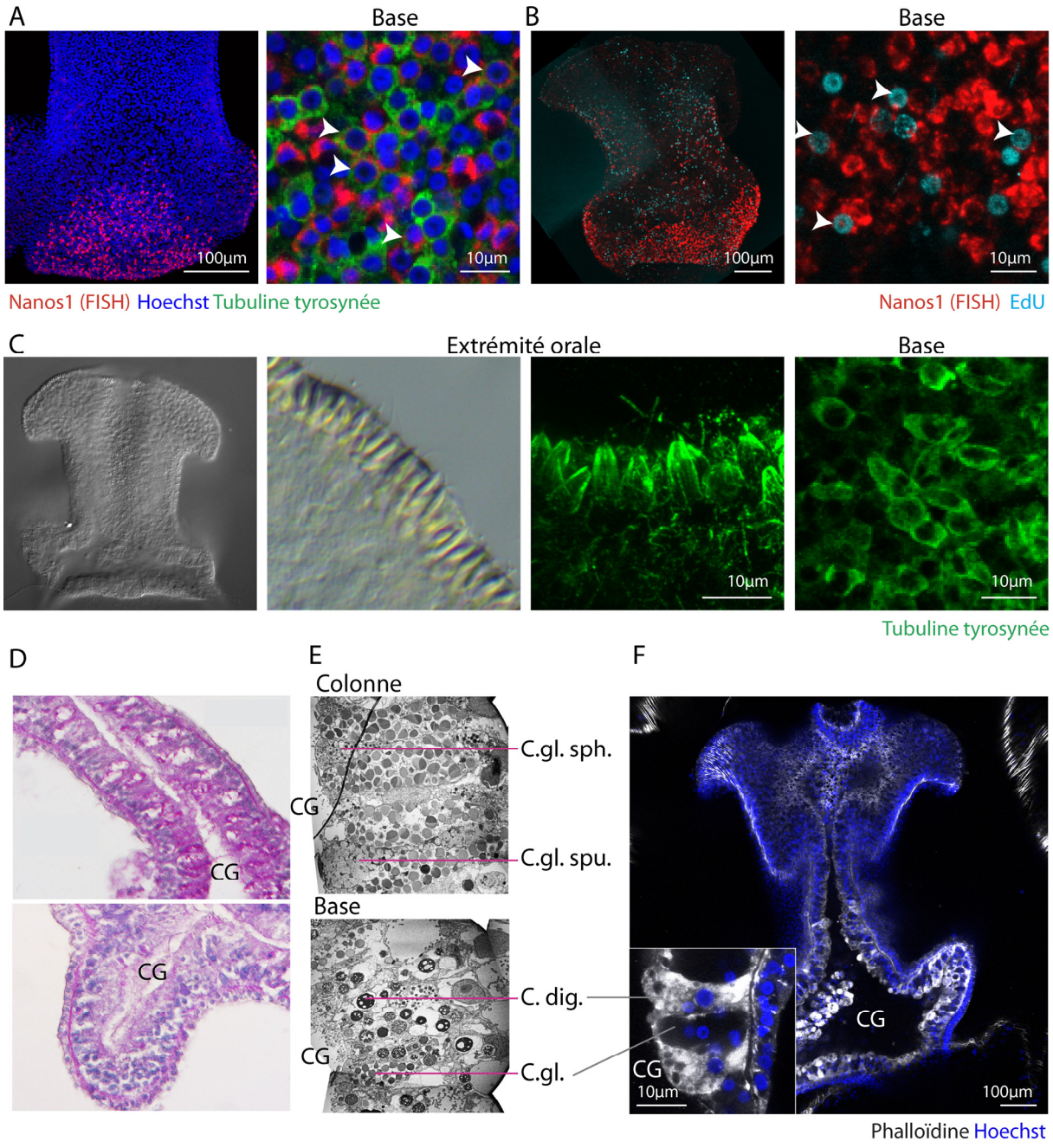


Figure 60 : Types cellulaires du manubrium.
(Légende sur la page suivante)

Figure 59 : Morphologie du manubrium et réseau nerveux (légende).
(A) Schéma du manubrium de *Clytia*. Vue latérale, pole oral vers le haut.
(B) Coupe histologique d'un manubrium colorée à l'hématoxyline éosine. Expérience et photo : Volker Hartenstein.
(C) Fibres musculaires du manubrium visualisées par coloration à la phalloïdine en blanc. Vue latérale, pôle oral vers le haut. Coloration et photos de la base : Volker Hartenstein.
(D) Réseau nerveux ectodermique du manubrium visualisé par immunohistologie avec l'anticorps YL1/2 en vert et par FISH grâce à l'expression de PP5 codant pour des peptides RF-amide (Takeda *et al.* 2017) en jaune.
(E) Réseau nerveux endodermique visualisé par immunohistologie avec l'anticorps YL1/2 en vert et PRP-amide en rouge. Marquage et photos : Volker Hartenstein.

Figure 60 : Types cellulaires du manubrium (légende)
(A) I-cells visualisées par FISH grâce à l'expression de *Nanos1* couplée à une immunohistologie avec l'anticorps YL1/2.
(B) I-cells visualisées par FISH grâce à l'expression de *Nanos1* couplée à un marquage EdU.
(C) Manubrium observé en microscopie DIC, permettant d'observer les capsules. Capsules de nématocytes matures et en formation, respectivement à l'extrémité et à la base du manubrium visualisées par immunohistologie grâce à l'anticorps YL1/2.
(D) Coupe histologique d'un manubrium colorée à l'hématoxyline éosine. Expérience et photo : Volker Hartenstein.
(E) Coupes de manubrium observées en microscopie électronique à transmission. Abbréviations : C.gl. sph. : cellule glandulaire sphéruleuse, C.gl. spu. : cellule glandulaire spumeuse, C.dig. : cellule digestive. Expérience et photo : Volker Hartenstein.
(F) Marquage à la phalloïdine d'un manubrium.
Abbréviation : CG : cavité gastrique.
Pour toutes les photos, manubrium en vue latérale, pole oral vers le haut.

La séparation entre les types de cellules glandulaires et digestive n'est pas stricte chez les hydrozoaires, puisque chez l'hydre, les cellules glandulaires de type 'zymogen' sont capables d'ingérer des nutriments (Holstein *et al.* 1992). Des cellules ayant les deux fonctions peuvent être présentes dans le manubrium de *Clytia*.

III.2. Données transcriptomiques

Un jeu de données transcriptomiques a été généré au cours de la régénération du manubrium, d'une part pour comprendre la reconstruction de la structure en terme de contribution des différents types cellulaires, et d'autre part pour identifier des gènes candidats régulateurs de différentes étapes du processus (remodelage et régénération, voir Chapitre 1).

III.2.1. Design expérimental

Les échantillons ont été choisis de manière à couvrir les principales premières étapes de la régénération du manubrium. Les données d'expression dans la méduse non disséquée (n.d.) ayant le manubrium intact, permettent d'identifier les types cellulaires présents grâce à des marqueurs déjà connus chez *Clytia* ou chez d'autres cnidaires. Au temps 0hpd, le manubrium vient d'être ôté (Fig.58). Le trou dans l'ombrelle causé par la dissection est grand ouvert, la cicatrisation n'a pas encore eu lieu. Des gènes exprimés dans la méduse n.d. et absents au temps 0hpd sont spécifiques du manubrium. A 6hpd, l'étape de remodelage est en cours. Le trou de l'ombrelle est en partie refermé grâce au câble d'actomyosin (voir Chapitre 1). Après 12h, le trou est refermé. Les quatre canaux radiaires sont connectés au centre de l'ombrelle. La comparaison de ces différents échantillons (0hpd, 6hpd et 12hpd) permet d'identifier des gènes impliqués dans le remodelage et l'initiation de la régénération. Jusqu'à 12h, l'apport de cellules vers la zone centrale est très faible. A 24hpd, des cellules se sont accumulées à la jonction des canaux radiaires, formant un primordium plat. Après 48hpd, le primordium s'est épaissi, la cavité gastrique est formée et la bouche est ouverte (voir Chapitre 1). Des variations d'expression à 24h et 48h sont liées à la formation et à la régionalisation du primordium.

J'ai préparé trois types d'échantillons pour chacun des temps (Fig.58) :

- Des méduses entières après ablation du manubrium (MdEJ) permettant potentiellement d'observer la réponse systémique de la méduse à l'ablation du manubrium, l'expression de certains gènes pouvant être affectée aussi en dehors de la zone centrale.

- Des zones centrales allant jusqu'aux gonades non incluses (MdCA) pour observer les variations locales d'expression des gènes. Ces échantillons contiennent, en plus du manubrium ou du primordium, uniquement des tissus de la zone centrale de la sous-ombrelle, les quatre canaux radiaires, et l'exombrelle. Ils ne contiennent pas d'organe autre que le manubrium entier ou en régénération. Ils permettent donc d'observer des variations d'expression de gènes au niveau de la zone centrale, qui seraient masquées par une forte expression dans d'autres zones de la méduse.

- Des méduses entières après dissection de l'ombrelle (UdEJ) afin de distinguer les variations d'expression dues au remodelage et à la régénération.

III.2.2. Qualité des échantillons

Le séquençage des 36 échantillons a généré 24 136 770 reads bruts en moyenne par échantillon. Après élimination des reads de basse qualité ou contenant l'adaptateur, 24 083 207 reads ont été conservés, soit plus de 99,7%. 85,79% ont pu être mappés sur le transcriptome de référence (pour les détails de chaque échantillon, voir tableau 5, en annexe du chapitre).

Les coefficients de corrélation entre les valeurs d'expression des gènes entre les échantillons ont été calculés par BGI et sont représentés sous forme de matrice (Fig.61). Pour une question de lisibilité, seuls les échantillons MdCA et MDEJ sont présentés ici. Les réplicats par temps et type d'échantillon ont bien un meilleur coefficient de corrélation entre eux (coefficient supérieur à 0,988) qu'avec les échantillons de temps et types différents. De plus, les coefficients de corrélation entre échantillons de méduses entières MdEJ et UdEJ de temps différents sont supérieurs à 0,9. A partir des coefficients de corrélation, des distances entre les échantillons ont été calculées, permettant la construction d'un arbre de regroupement rapprochant les échantillons dont l'expression des gènes est la plus similaire (Fig.62). Comme observé avec la matrice de corrélation, les réplicats sont regroupés ensembles dans un même cluster ne contenant qu'eux, à l'exception de UdEJ 0hpd et 6hpd. Le clustering sépare les échantillons en deux catégories bien distinctes : les zones centrales et les méduses entières. Parmi les zones centrales, les deux échantillons n.d. contenant le manubrium sont les plus différents. Un même cluster regroupe les stades de remodelage 0hpd, 6hpd, 12hpd, un autre les stades de régénération 24h et 48hpd. Les branches groupant les échantillons sont plus courtes entre les méduses entières qu'entre les zones centrales, indiquant que les échantillons de méduses entières MdEJ et UdEJ sont plus proches entre eux que les zones centrales MdCA entre elles. Parmi les échantillons de méduses entières, trois groupes sont formés. Le plus divergeant regroupe les stades tardifs MdEJ 24hpd et 48hpd et UdEJ 48hpd. Les deux autres associent les stades de remodelage après ablation du manubrium (MdEJ 0hpd, 6hpd et 12hpd) et les échantillons de méduses avec manubrium (MdEJ n.d., UdEJ 0hpd, 6hpd, 12hpd et 24hpd), à l'exception de UdEJ 48hpd (Fig.62).

L'analyse en composantes principales sépare les échantillons de la même façon que le clustering et la matrice de corrélation. Les composants 1 et 2, expliquant 90% de la variance entre les échantillons, séparent les zones centrales des méduses entières (Fig.63). Ils sont suffisants pour disperser les zones centrales, mais pas pour les méduses entières. Concernant les zones centrales, les stades de remodelage sont encore une fois séparés des stades de régénération. Les composants 3 et 4 expliquent 5,5% de la variance. Ils séparent les échantillons selon le temps de régénération. Les points les plus proches donc ayant donc le plus de similarité en terme d'expression de gènes sont bien les réplicats (Fig.64).

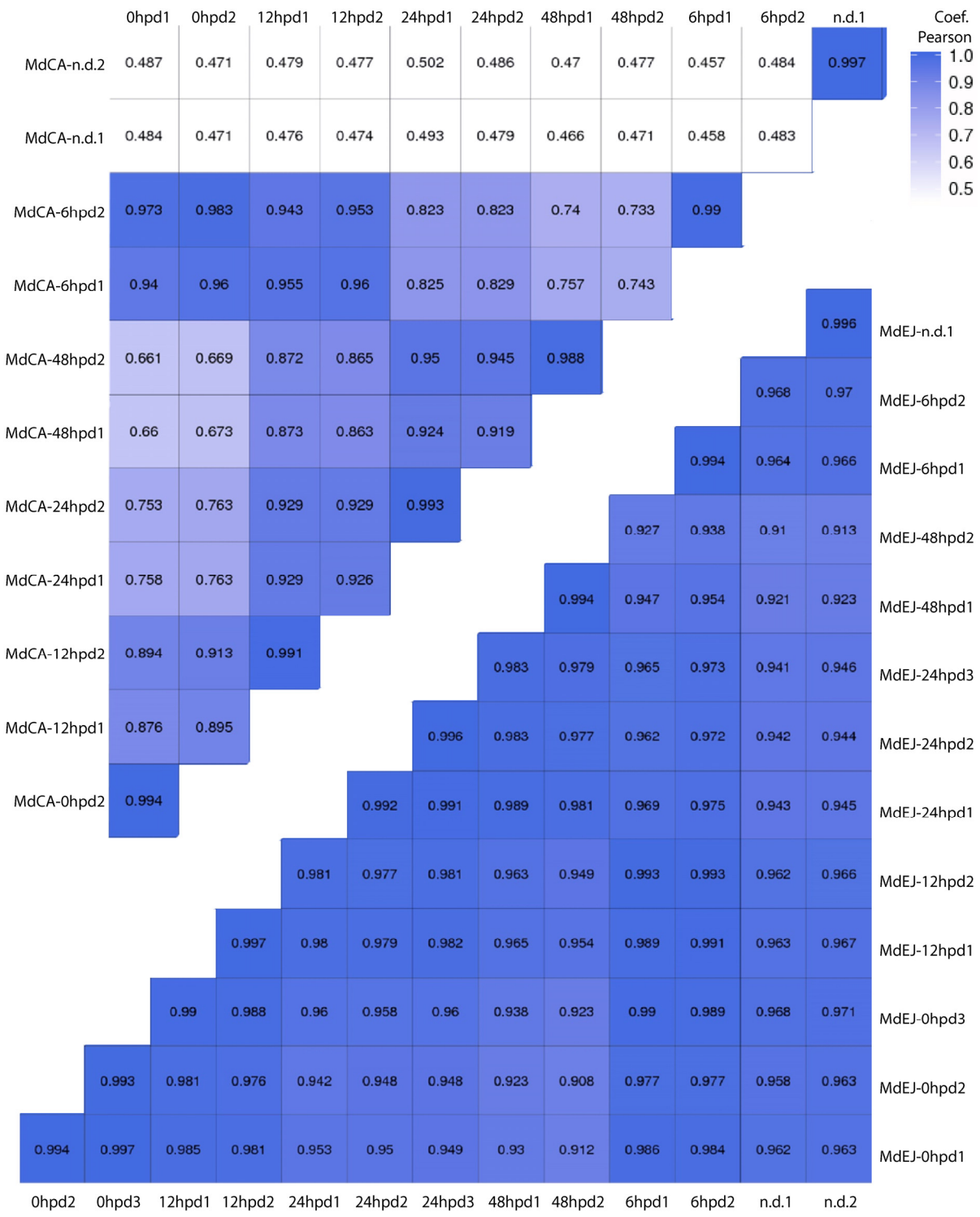


Figure 61 : Matrice de corrélation entre les échantillons MdCA et les échantillons MdEJ.
Matrice créée à partir du coefficient de corrélation de Pearson.

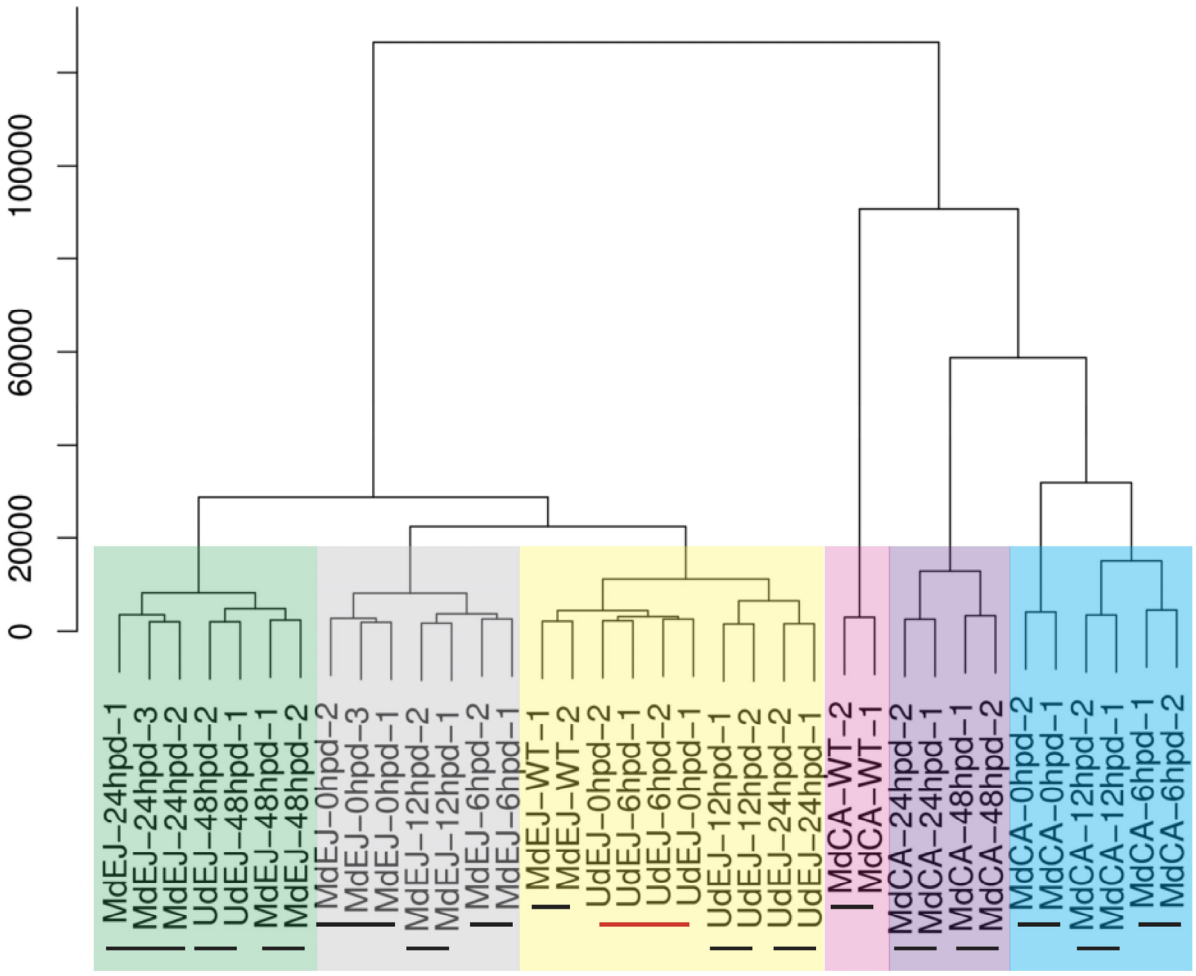


Figure 62 : Représentation des similarités entre les échantillons sous forme d'un arbre de regroupement.
Les clusters regroupant les réplicats sont indiqués par un trait noir, celui contenant deux types d'échantillon par un trait rouge. L'arbre est calibré, l'axe représente la hauteur des branches.

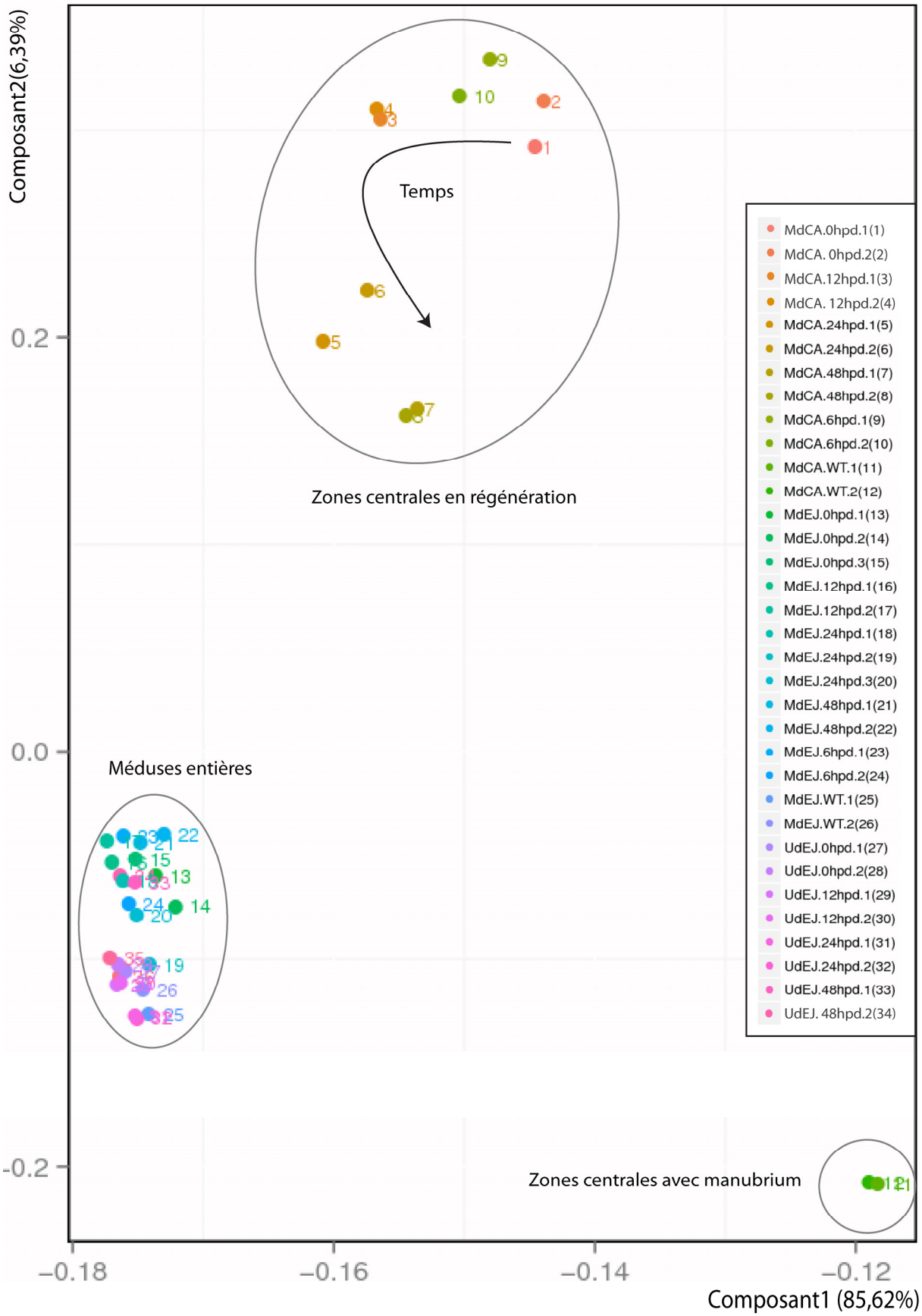


Figure 63. Composants 1 et 2 de l'APC.

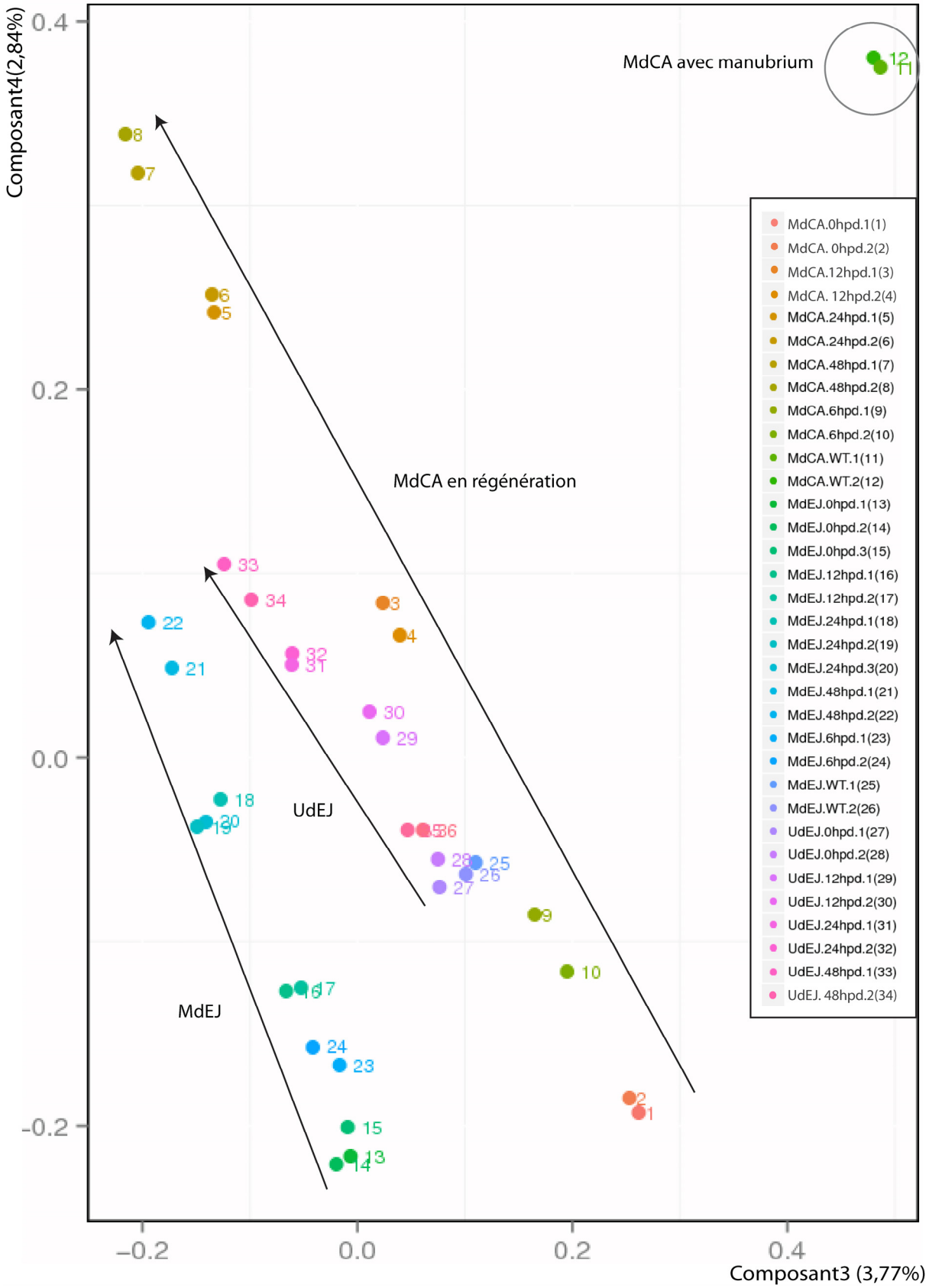


Figure 64. Composants 3 et 4 de l'APC.

La matrice de corrélation, l'arbre de regroupement et l'analyse en composante principale indiquent que les données sont de bonne qualité, les réplicats étant dans les trois cas plus similaires entre eux qu'avec les autres échantillons en termes de données d'expression des gènes. De plus, la séparation entre les échantillons de méduses entières (MdEJ et UdEJ) et les zones centrales laisse supposer que, dans les méduses entières, les variations d'expression des gènes seraient plus faibles dans les échantillons MdEJ que MdCA. Effectivement, l'analyse d'expression différentielle réalisée par BGI montre que le nombre de transcrits différentiellement exprimés est beaucoup plus important dans les échantillons comportant uniquement la zone en régénération (MdCA) que dans les échantillons MdEJ et UdEJ contenant les méduses entières. Par exemple dans les zones centrales, entre les conditions 0hpd et 48hpd, 747 gènes sont downrégulés et 2024 sont uprégulés, tandis que dans les méduses entières, seuls 538 gènes downrégulés sont détectés et 502 uprégulés. Les échantillons de zone centrale sont donc beaucoup plus informatifs que les méduses entières. Dans le reste du chapitre, seules les zones centrales seront prises en considération (Fig.65).

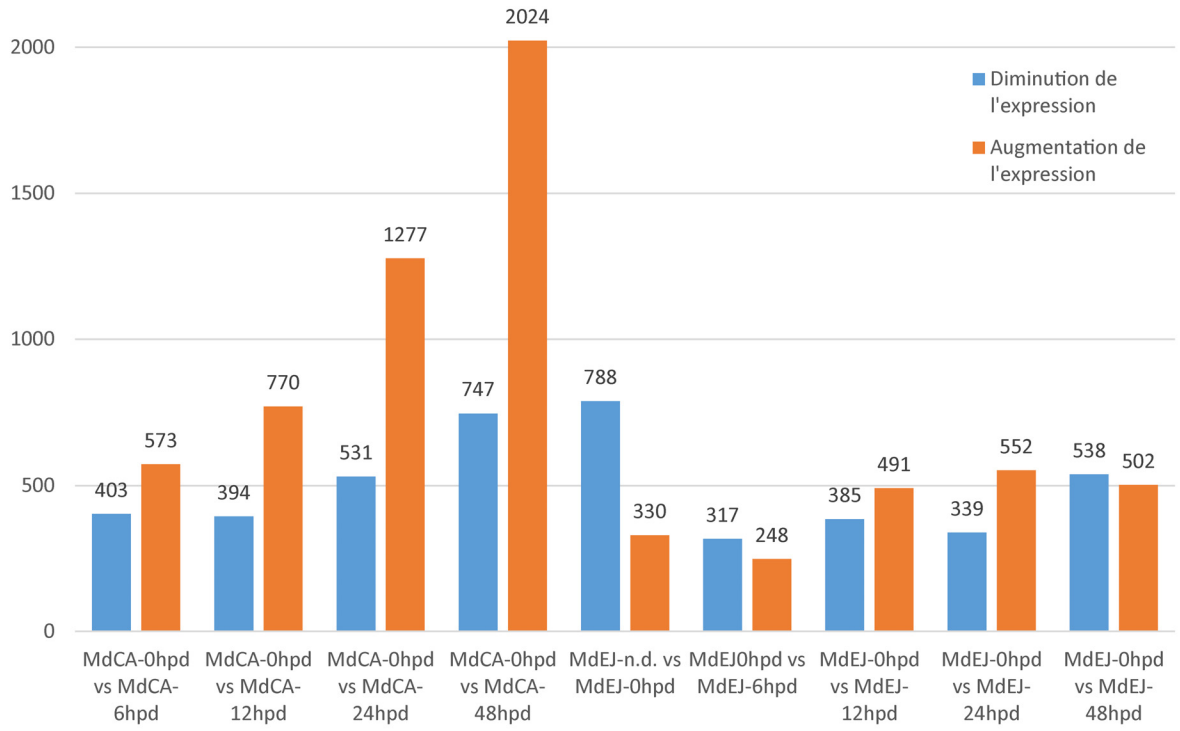


Figure 65 : Nombre de gènes différentiellement régulés d'après l'analyse BGI.

III.3. Dynamique des gènes au cours de la régénération

Dans les zones centrales, de nombreux gènes ont une expression dynamique au cours de la régénération. Je n'ai pas eu le temps de réaliser de clustering des gènes par type de profil. Cependant, par comparaison des valeurs d'expression entre les différents temps, j'ai pu identifier différents profils d'expression au cours de la régénération ainsi que quelques gènes correspondant à ces profils. Il s'agit entre autres de protéines structurales, de gènes impliqués

dans le contrôle du cycle cellulaire et de composants de voies de signalisation. Le but de cette section est de donner un aperçu de la variété des profils d'expression et des catégories de gènes ayant une expression dynamique.

J'ai séparé les profils en trois classes et différentes sous-classes en fonction de deux composantes : tout d'abord la variation entre les échantillons n.d. (avec manubrium) et les échantillons 0hpd, due uniquement à la perte du manubrium, puis la variation au cours de la régénération correspondant à l'activation ou la répression de gènes. Entre les échantillons n.d. et 0hpd, seules trois variations sont possibles : l'expression du gène peut diminuer, augmenter ou rester stable. En revanche au cours de la régénération, j'ai identifié de nombreux profils différents. L'expression des gènes augmente ou diminue à différents temps de la régénération, l'activation ou la répression pouvant être continue ou temporaire.

J'ai sélectionné des gènes appartenant aux différents profils par une approche de gènes candidats avec l'aide de Lucas Leclère. Sandra Chevalier a réalisé les ISH dans des méduses non disséquées afin de déterminer les domaines d'expression de ces gènes. Une attention particulière a été portée aux patrons d'expression dans le manubrium.

Parmi les gènes exprimés dans le manubrium, dont l'expression diminue au moins de moitié après ablation, j'ai choisi de détailler les patrons d'expression par ISH de *Myc2*, la *nucleostemin*, *innexinA*, *smoothened*, et une *catalase-like* (Fig.66).

- *Myc* est un FT contrôlant de nombreux processus cellulaires dont l'apoptose, la prolifération et la différenciation (review : (Eilers & Eisenman 2008; Conacci-Sorrell *et al.* 2014)). Deux homologues, *myc* et *myc2*, ont été identifiés chez l'hydre, exprimés dans les i-cells (Hartl *et al.* 2010, 2014). Chez *Clytia*, l'orthologue de *myc2*, détecté par ISH, présente un marquage diffus à la base du manubrium et un fort marquage dans les ovocytes. Pendant la régénération, son expression augmente dès 6hpd.

- La nucleostemin est une protéine localisée dans le nucléole des cellules souches ayant un rôle dans la protection du génome (review : (Tsai 2014)). Chez *Clytia*, l'ARNm codant pour la *nucleostemin* est présent dans l'ectoderme du manubrium. Le marquage ISH est plus intense à la base, où les cellules souches sont présentes, devient plus diffus dans la colonne, et est absent de l'extrémité orale. La *nucleostemin* est également exprimée dans l'ectoderme des bulbes tentaculaires et dans les gonades. Comme dans le manubrium, le marquage dans les bulbes est le plus fort dans la zone proximale où les cellules souches sont présentes, et devient plus diffus vers l'extrémité distale. L'intensité du marquage dans l'ectoderme empêche de conclure sur l'expression dans l'endoderme. Un marquage diffus est aussi présent au niveau du canal circulaire. Les données transcriptomiques indiquent une augmentation progressive de l'expression de la *nucleostemin* dès 12hpd (en l'absence de test statistique, l'augmentation entre 0hpd et 6hpd est considérée comme nulle).

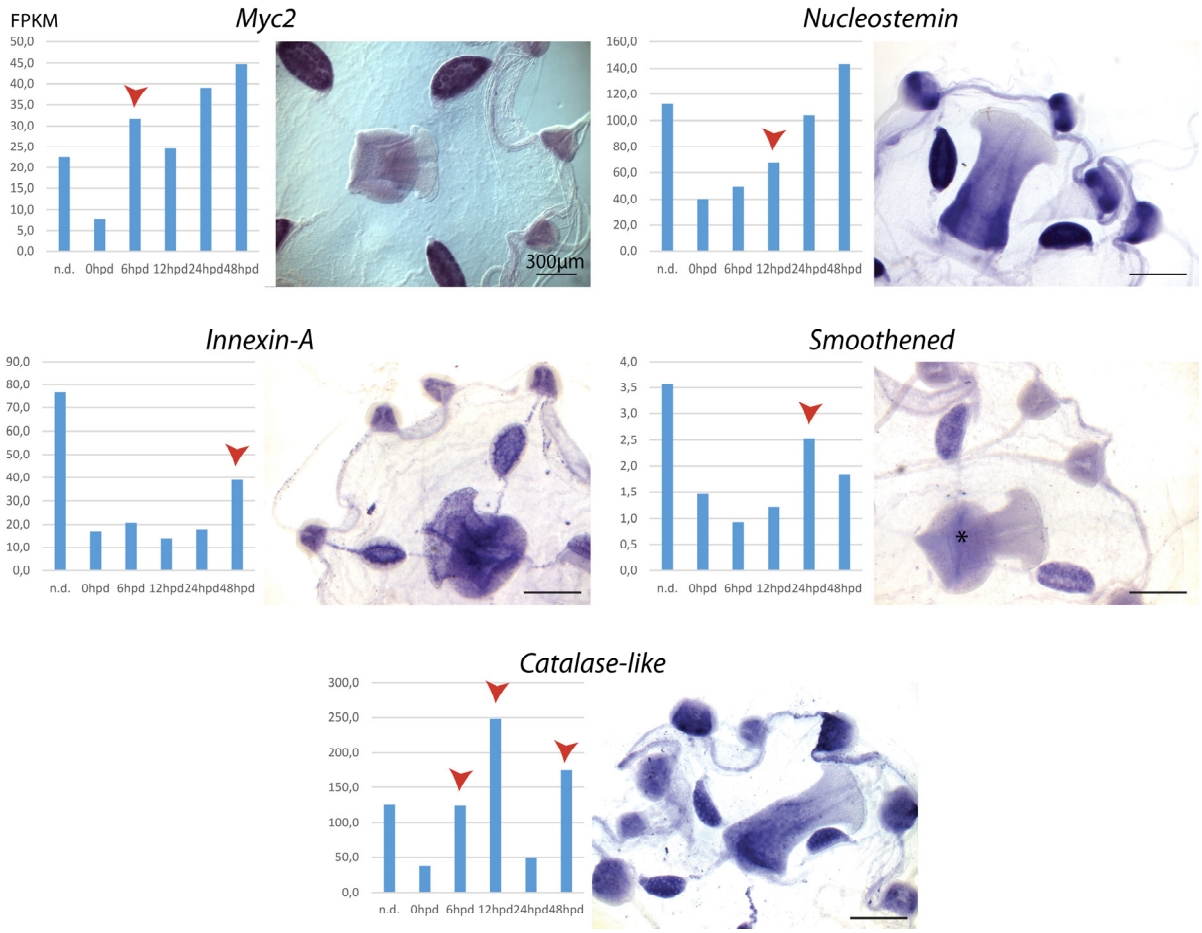


Figure 66 : Profil d'expression au cours de la régénération et patron d'expression dans la méduse non disséquée de gènes dont l'expression diminue après ablation.
Pour chaque gène (*Myc2*, la *nucleostemin*, *innexinA*, *smoothened*, et *catalase-like)*, profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM), et patron d'expression obtenu par ISH dans les méduses non disséquées en vue orale avec le manubrium en vue latérale. Les flèches rouges indiquent les variations d'expression principales, les astérisques indiquent un marquage aspécifique.

- Les innexines sont des protéines composant les jonctions gap chez les invertébrés. Chez l'hydre *innexin2* est exprimé dans les jonctions gap de cellules nerveuses au niveau du pédoncule (Takaku *et al.* 2014). Chez *Clytia*, trois innexines ont un profil d'expression dynamique au cours de la régénération. *InnexinA* correspond au profil 'diminution après dissection'. L'ISH révèle une expression dans tout l'endoderme du manubrium, à l'exception de l'extrémité distale. Des cellules exprimant *InnexinA* sont également visibles dans l'endoderme des bulbes tentaculaires, des gonades, des canaux radiaires et du canal circulaire. La densité de cellules exprimant *InnexinA* est plus faible dans le canal circulaire que le canal radiaire. D'après les données transcriptomiques, son expression augmente à partir de 48hpd.
- La voie Hedgehog est connue pour jouer un rôle dans le développement et la régénération (review : (Singh *et al.* 2015)). Son activation est médiée par le récepteur transmembranaire *Smoothened*. Chez *Clytia*, *Smoothened* est exprimé faiblement au niveau du plancher endodermique du manubrium, ainsi que plus fortement dans les ovocytes. Le signal dans les bulbes tentaculaires est probablement du bruit de fond. *Smoothened* a été sélectionné pour son profil d'expression augmentant à 24hpd, puis diminuant à 48hpd.
- La catalase est une enzyme antioxydante permettant la dégradation du peroxide d'hydrogène. Chez *Clytia*, *catalase-like* est exprimée dans des cellules endodermiques dispersées à la base du manubrium et dans la moitié proximale de la colonne. Elle est aussi exprimée dans l'endoderme des gonades et des bulbes tentaculaires, ainsi que dans des groupes de cellules dans les canaux radiaires et le canal circulaire. La distribution des cellules exprimant *catalase-like* rappelle celle des cellules gastrodermiques (voir Chapitre 1). Les données transcriptomiques indiquent une expression très dynamique au cours de la régénération. En effet, son expression atteint les niveaux d'avant dissection à 6hpd, double à 12hpd, comparé à l'expression dans le manubrium non disséqué, puis diminue à 24hpd et atteint à nouveau un niveau d'expression similaire à la méduse non disséquée à 48hpd. L'expression de *catalase-like* augmente également dans les échantillons UdEJ à 48hpd.

L'ISH révèle que les gènes sélectionnés pour leur profil d'expression présentant une diminution de l'expression après dissection sont bien exprimés dans le manubrium (Fig.66). Le marquage diffus dans le cas de *smoothened* est probablement dû au niveau d'expression inférieur à 4 FPKM dans la zone centrale n.d., comparé à un niveau d'expression compris entre 75 et 130 pour *catalase-like*, *innexinA* et *nucleostemin*. Il est possible d'identifier les gènes spécifiques du manubrium à partir des données transcriptomiques, en sélectionnant ceux dont l'expression tombe à zéro après dissection dans les échantillons MdEJ. Une augmentation de l'expression au cours de la régénération peut correspondre à la réapparition de types cellulaires.

Concernant les gènes dont l'expression dans la zone centrale n'est pas affectée par la dissection, je présente ici quatre exemples : *galaxin*, *musashi*, *STMyoA*, *innexinC et RepSeqU* (Fig.67).

- La galaxin est une protéine soluble présente dans la matrice organique de l'exosquelette des coraux et impliquée dans la calcification (Fukuda *et al.* 2003; Reyes-Bermudez *et al.* 2009). Chez *Clytia*, la *galaxin* présente un marquage diffus à la base et dans la colonne du manubrium. En revanche, elle est exprimée fortement dans l'endoderme des bulbes et du canal circulaire, et présente un marquage plus diffus dans les gonades, les canaux radiaires et la base et la colonne du manubrium. D'après les données transcriptomiques, la *galaxin* est très peu exprimée dans la zone centrale (13,1 et 15,1 FPKM dans les échantillons MdCA-n.d.), cependant son expression dépasse 500 FPKM dès 6hpd (757,0 et 516,8 FPKM) et continue à augmenter ensuite. Son expression augmente aussi fortement à partir de 6hpd dans les échantillons de méduses entières MdEJ et UdEJ, indiquant une réponse à la blessure non nécessairement liée à la régénération.

- *Musashi* code pour une protéine se liant à l'ARN impliquée dans le contrôle des cellules souches (Okano *et al.* 2002). Chez *Clytia*, *Musashi* est exprimé à la base du manubrium ainsi que dans les gonades et l'ectoderme des bulbes tentaculaires. Son domaine d'expression correspond à celui des marqueurs de cellules souches *Nanos1* et *Piwi*. Les données transcriptomiques indiquent une augmentation progressive de son expression à partir de 24hpd.

- Deux myosines II dites 'musculaires' ont été caractérisées chez *Clytia* (Steinmetz *et al.* 2012), *STmyhc-a* et *STmyhc-b*. L'ISH révèle une expression de *Stmyhc-a* au niveau des arêtes du manubrium, ainsi que dans les muscles striés, le vélum, la partie distale des bulbes et les tentacules. D'après les données transcriptomiques son expression diminue fortement à 6hpd, puis augmente à 48hpd.

- *InnexinC* est exprimée dans l'ectoderme du manubrium, dans toutes les cellules de la base et de la colonne. Dans la partie distale, les cellules exprimant *InnexinC* forment un réseau continu. *InnexinC* est également exprimée dans la sous-ombrelle, ainsi que dans les ovocytes et l'ectoderme des bulbes tentaculaires. Les données transcriptomiques indiquent que son expression double à 6hpd, puis retourne aux niveaux d'avant dissection à 24hpd.

- *RepSeqU* est un gène codant pour une protéine avec des répétitions d'acides aminés. Il a été choisi pour son profil d'expression dans le transcriptome. Il s'agit d'un gène non exprimé dans la zone centrale non disséquée (0,0 et 0,1 FPKM), dont l'expression dans la zone centrale ne varie pas pendant la régénération. Dans la méduse entière non disséquée et à 0hpd, son niveau d'expression reste très faible (1,4 et 1,6 FPKM dans les méduses n.d., et entre 1,8 et 2,8 FPKM à 0hpd). Le marquage diffus observé par ISH est probablement du bruit de fond. En revanche son expression augmente dans la méduse entière (mais pas dans la zone centrale), à partir de 12hpd, atteignant 64,3 et 46,0 FPKM à 48hpd. L'expression augmente également à partir de 12hpd dans les échantillons UdEJ. Il s'agit donc d'un gène, non exprimé dans la méduse, dont l'expression augmente en réponse à une blessure dans la partie périphérique de l'ombrelle et pas nécessairement à la zone de coupure.

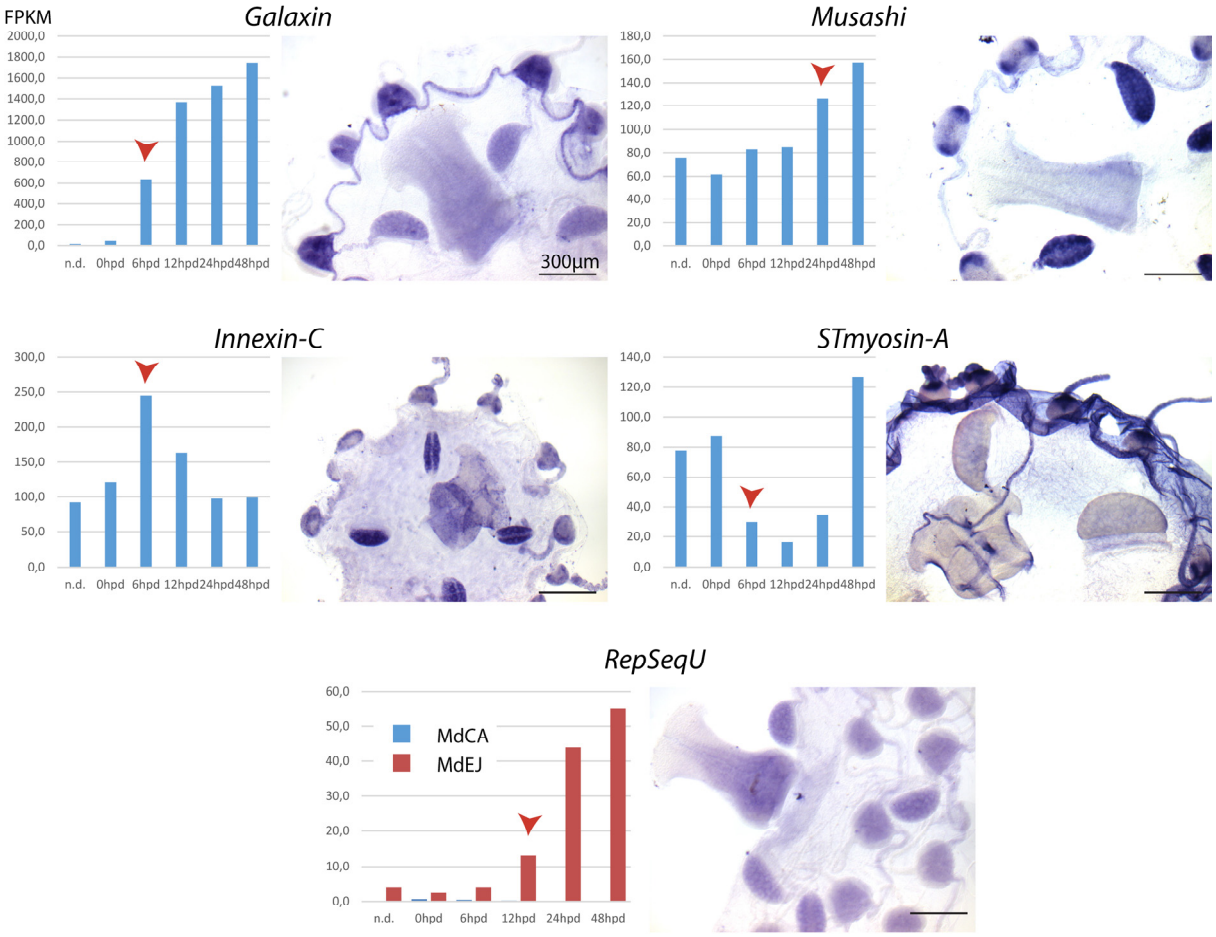


Figure 67 : Profil d'expression au cours de la régénération et patron d'expression dans la méduse non disséquée de gènes dont l'expression reste stable après ablation.
Pour chaque gène (*galaxin*, *musashi*, *STMyoA*, *innexinC, et RepSeqU)*, profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM), et patron d'expression obtenu par ISH dans les méduses non disséquées en vue orale avec le manubrium en vue latérale. Les flèches rouges indiquent les variations d'expression principales, les astérisques indiquent un marquage aspécifique.

La catégorie dont l'expression reste stable après dissection regroupe des gènes structuraux exprimés dans l'ombrelle et le manubrium, comme *InnexinC* et *Stmyo-A*, et des gènes non exprimés dans l'ombrelle comme *Musashi* et *Galaxin*. Le fait que l'expression reste stable après dissection n'exclue pas une expression dans le manubrium.

TPM-A, *TPM-B*, la *fibrilinB*, *Hedgehog1*, *l'innexinC* et *SubU-col4* font partie des gènes dont l'expression dans les données transcriptomiques augmente après ablation du manubrium (Fig.68).

- Les tropomyosin sont des protéines se liant à l'actine dans les cellules musculaires et non musculaires. Deux ont été sélectionnées. Parmi elles, l'ISH révèle que *TPM-B* est exprimée fortement dans des cellules isolées des muscles striés, et de façon diffuse dans le reste de l'ombrelle et la base du manubrium. Son expression dans les données transcriptomiques des échantillons MdCA-n.d. étant de 2,2 et 1,6 FPKM, il s'agit probablement de bruit de fond. Les données transcriptomiques indiquent qu'après l'augmentation suite à la dissection, son expression diminue dès 6hpd, jusqu'à disparaitre à 48hpd.

- *TPM-A* est exprimé fortement dans l'ectoderme du manubrium avec une expression plus marquée au niveau des arêtes. Le marquage ISH est également visible dans la sous-ombrelle, l'ectoderme distal des bulbes tentaculaires, et les tentacules. D'après les données transcriptomiques, son expression diminue dès 6hpd et atteint les mêmes niveaux qu'avant dissection à 12hpd. La diminution de l'expression de *TPM-A* et *TPM-B* est également visible dans les méduses entières MdEJ et UdEJ.

- La fibrilin est une protéine structurale formant un réseau de fibrilles dans la mésoglée des méduses hydrozoaires (*Podocoryne carnea* (Reber-Müller *et al.* 1995), *Polyorchis penicillatus* (Megill 2005)). Chez *Clytia*, la *fibrilin-B* est exprimée dans des cellules isolées de l'endoderme de la sousombrelle, plus fortement dans la zone périphérique. Elle est également exprimée dans des cellules endodermiques à la base des bulbes tentaculaires et des gonades. Les données transcriptomiques indiquent la diminution de son expression à partir de 12hpd.

- *Hedgehog1* (*hh1*) est le ligand de la voie du même nom. Il est exprimé dans les ovocytes et présente un marquage diffus dans l'endoderme du manubrium et des bulbes tentaculaires qui pourrait être du bruit de fond au vu de son faible niveau d'expression dans la zone centrale. D'après les données transcriptomiques, *hh1* a un profil très dynamique. Son expression augmente très fortement 6hpd, diminue à 12hpd, et augmente à nouveau à 48hpd.

- Les collagènes sont un des composants de la mésoglée des méduses. Chez *Clytia*, quatre ont été identifiés à partir des données transcriptomiques. L'ISH révèle que *SubU-col4* est exprimé dans toute la sous-ombrelle et présente un marquage plus fort à la base des organes. Dans les données transcriptomiques, son expression par rapport au temps 0hpd double à 12hpd dans les échantillons MdCA, MdEJ et UdEJ.

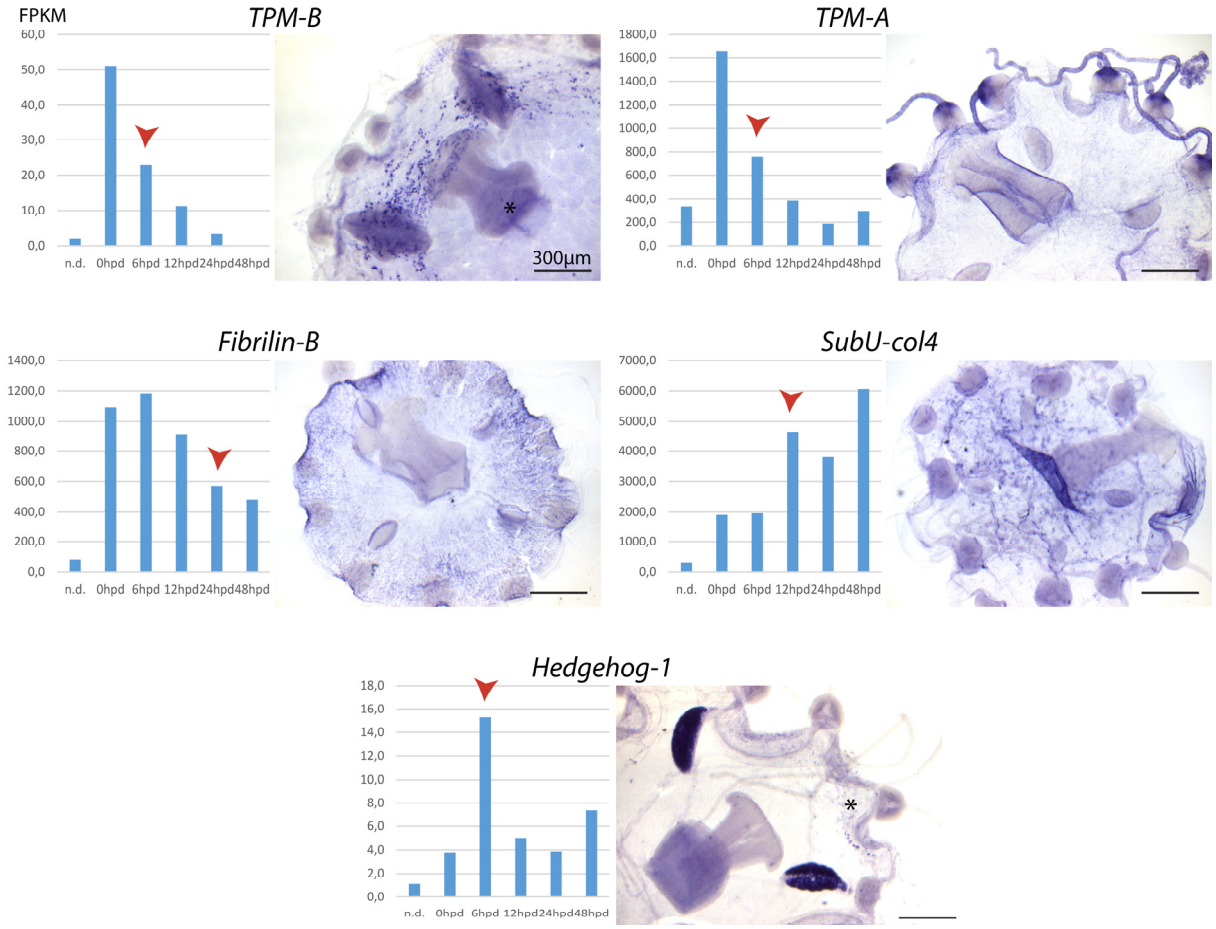


Figure 68 : Profil d'expression au cours de la régénération et patron d'expression dans la méduse non disséquée de gènes dont l'expression augmente après ablation.
Pour chaque gène (*fibrilinB*, *Hedgehog1*, *l'innexinC* et *SubU-col4)*, profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM), et patron d'expression obtenu par ISH dans les méduses non disséquées en vue orale avec le manubrium en vue latérale. Les flèches rouges indiquent les variations principales, les astérisques indiquent un marquage aspécifique.

La catégorie de gènes dont l'expression augmente après ablation du manubrium contient des gènes structuraux, ainsi que des composants de voies de signalisation (ex. hh). L'ISH révèle que les gènes structuraux sont exprimés dans l'ombrelle. Ceci est cohérent avec le système de calcul des valeurs d'expression. En effet les valeurs d'expression sont données en FPKM, donc en fonction du nombre total de fragments de l'échantillon. Un gène dont l'expression augmente après ablation du manubrium est le plus souvent un gène exprimé dans l'ombrelle dont la proportion par rapport au nombre total de gènes augmente.

III.4. Types cellulaires et différenciation pendant la régénération

Un type de profil a attiré mon attention : l'expression d'un gène dans la zone centrale non disséquée disparaissant après ablation, suivie d'une augmentation de l'expression au cours de la régénération. Ce profil peut correspondre à la réapparition de types cellulaires pendant la régénération. De nombreux gènes suivent ce profil, avec une augmentation de l'expression à divers temps de régénération, ce qui indique potentiellement une réapparition séquentielle des types cellulaires. Je me suis donc intéressée aux types cellulaires présents dans le manubrium et à leur retour pendant la régénération, en me focalisant particulièrement sur les i-cells et leurs dérivés caractérisés chez l'hydre (nématocytes, cellules glandulaires et cellules nerveuses) car il est possible de les suivre par immunohistologie et de nombreux marqueurs sont connus chez *Clytia* et/ou chez les cnidaires. Le terme marqueur est utilisé ici pour un gène exprimé spécifiquement dans un type cellulaire donné ou un territoire donné. Pour chaque type cellulaire présenté dans cette section, j'ai suivi leur réapparition pendant la régénération par immunohistologie. Ceci m'a permis d'identifier le profil d'expression correspondant le plus probablement à la réapparition du type cellulaire. Puis j'ai recherché des marqueurs parmi les données transcriptomiques correspondant à ce profil et/ou observé le profil d'expression suivi par des marqueurs connus du type cellulaire. Enfin, avec l'aide de Sandra Chevalier et Priscilla Freschu, j'ai réalisé les ISH de quelques marqueurs au cours de la régénération afin de déterminer leur localisation et de valider les profils d'expression obtenus par les données transcriptomiques.

III.4.1. i-cells

La dynamique des i-cells pendant la régénération du manubrium a été caractérisée (voir Chapitre 1). Je les ai suivies par ISH grâce aux marqueurs *Nanos1* et *Piwi*. Celles-ci sont présentes à la base du manubrium dans l'ectoderme, dans la zone de prolifération. Une partie des cellules *Nanos1*+ est capable d'incorporer l'EdU suite à une incubation d'une heure, indiquant un cycle cellulaire rapide (Fig.60). Au cours de la régénération, quelques i-cells sont présentes dans les canaux à 6h et 12hpd. Leur nombre augmente fortement à partir de 24hpd (voir Chapitre 1).

Quatre marqueurs de i-cells sont caractérisés chez *Clytia* : *Nanos1*, *Piwi*, *Vasa*, *PL10* (Fig.50) (Leclère *et al.* 2012). D'après les données transcriptomiques, ces quatre gènes sont exprimés dans le manubrium, *Nanos1* plus faiblement (Fig.69). Suite à l'ablation du manubrium, l'expression de *Nanos1* disparait, tandis que celle de *Piwi* diminue de moitié. L'ablation du

manubrium a peu d'effet sur l'expression de *Vasa* et *PL10*, indiquant que ceux-ci sont aussi exprimés dans l'ombrelle ou les canaux radiaires. Leur expression est dynamique au cours de la régénération. *PL10* augmente dès 6h, *Nanos1*, *Piwi* et *Vasa* au bout de 24hpd. Les données transcriptomiques pour *Nanos1* et *Piwi* indiquent une augmentation du nombre d'i-cells dans la zone centrale en régénération à partir de 24h, et sont donc bien cohérentes avec les patrons d'ISH observés précédemment (voir Chapitre 1).

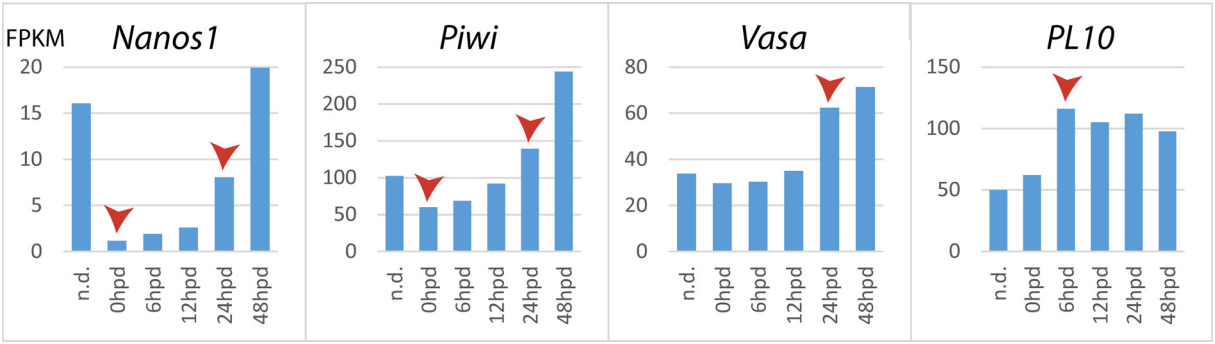


Figure 69 : Variation de l'expression des marqueurs d'i-cells au cours de la régénération. (A) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des marqueurs d'i-cells. Les flèches rouges indiquent les variations principales.

III.4.2. Ovocytes

Des ovocytes sont présents dans le primordium et les canaux radiaires pendant la régénération. Ils sont visibles entre autres par immunohistologie avec l'anticorps YL1/2, ou encore par ISH avec des marqueurs de lignée germinale (Fig.70.A et B). En effet, certaines cellules exprimant *Nanos1* dans le primordium à 24h ont la taille de petits ovocytes (entre 15 et 20µm de diamètre) (Fig.70.A). Leur nombre augmente à 48h et elles sont visibles également dans les canaux radiaires. L'immunohistologie permet de mieux visualiser l'organisation des tissus que l'ISH. Les ovocytes, marqués avec l'anticorps YL1/2 sont visibles à 48hpd dans la cavité du primordium, puis semblent s'intégrer dans l'endoderme à 72h (Fig.70.B).

Des marqueurs d'ovocytes ont été décrits chez *Clytia*. Parmi les quatre groupes de GFP identifiées chez *Clytia* (Leclère *et al.* 2019), les quatre paralogues '*GFP2'* sont exprimés uniquement dans les ovocytes et les bulbes tentaculaires (Fourrage *et al.* 2014). Mos1 est une kinase activant la voie MAPK régulant la maturation des ovocytes chez les métazoaires, elle est bien présente dans les ovocytes de *Clytia* (Amiel *et al.* 2009). *Poc1* chez *Clytia* est nécessaire à la fonction du centriole dans les ovocytes, et est exprimé fortement chez la femelle dans les ovocytes en cours de maturation et faiblement à la base des bulbes tentaculaires (Fourrage *et al.* 2010). *Thyn1* a été identifié comme un marqueur de la lignée germinale, avec une expression bien restreinte aux gonades chez la méduse par Ruggiero (2015). Enfin, *Boule-like1b* est également exprimé uniquement dans les ovocytes (Ruggiero 2015).

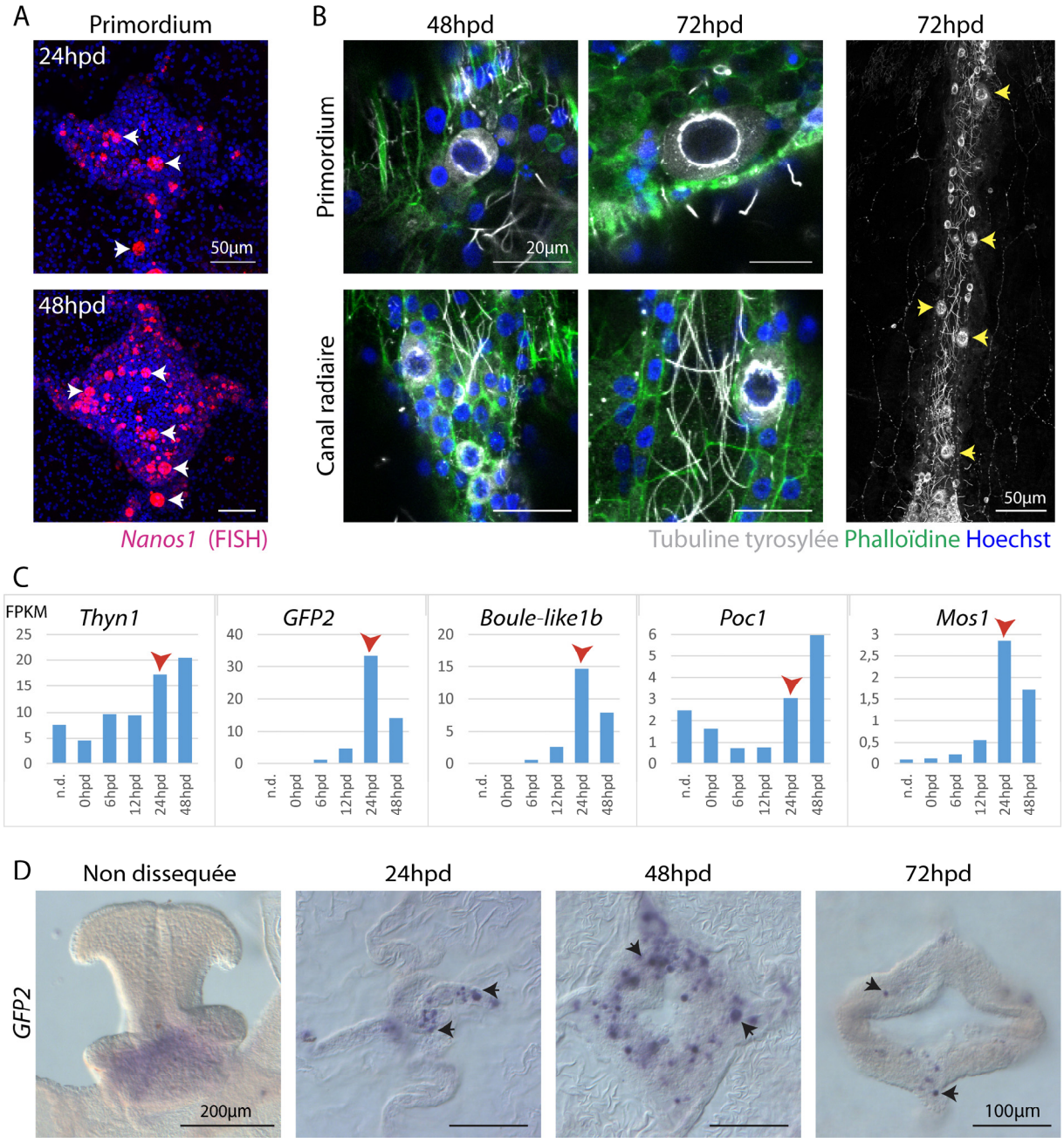


Figure 70 : Présence d'ovocytes dans le manubrium en régénération.
(A) Cellules souches et ovocytes dans le primordium visualisés par FISH *Nanos1*. Les flèches blanches indiquent les ovocytes.
(B) Ovocytes dans le primordium et les canaux radiaires 48hpd et 72hpd visualisés par immunohistologie avec l'anticorps dirigé contre la tubuline tyrosylée. Côté des canaux radiaires le plus proche du manubrium vers le haut. Les flèches jaunes indiquent les ovocytes.
(C) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des marqueurs d'ovocytes. Les flèches rouges indiquent les variations principales.
(D) Patrons d'expression de *GFP2* obtenus par ISH dans le manubrium de méduses non disséquées en vue latérale et en régénération 24hpd, 48hpd et 72hpd (vue orale). Les flèches indiquent les cellules *GFP2*+ dans les manubriums en régénération.

D'après les données transcriptomiques, ces gènes ne sont pas (*GFP2*, *Boule-like1b* et *Mos1*) ou peu (*Thyn1*, *Poc1*) exprimés dans le manubrium (Fig.70.C). *Thyn1* et *Poc1* sont toujours exprimés après ablation du manubrium, ils sont donc probablement exprimés dans des cellules présentes dans les canaux radiaires. Leur expression étant spécifique des ovocytes, il y a peu de chances qu'ils soient exprimés dans l'ombrelle. L'expression des marqueurs augmente faiblement à 12hpd (à l'exception de *Poc1*), puis fortement à 24hpd, indiquant la présence d'ovocytes dans la zone centrale.

Les données transcriptomiques sont bien en accord avec les patrons d'expression de *GFP2* par ISH. Les cellules exprimant *GFP2* sont absentes dans la majorité des manubriums non disséqués (13/17). A 24hpd, des cellules *GFP*+ sont présentes dans le primordium et les canaux radiaires en nombre variable dans 7/16 méduses. Elles sont présentes en très grand nombre dans toutes les méduses à 48hpd, puis leur nombre diminue à 72hpd.

III.4.3. Cellules nerveuses

Les cellules nerveuses sont un type cellulaire important du manubrium, coordonnant les mouvements pour attraper et digérer les proies. L'anticorps YL1/2 permet de visualiser le réseau nerveux du manubrium et du primordium en régénération (données non montrées). A 24hpd, des neurones sont déjà présents, formant un réseau en continuité avec celui de la sous-ombrelle. Le réseau se densifie pendant les étapes plus tardives de la régénération et s'organise, les fibres acquérant leur orientation longitudinale à partir de 72hpd.

Différents marqueurs de cellules nerveuses ont été identifiés dans le transcriptome, parmi les gènes dont l'expression augmente à 24hpd ou 48hp. Il s'agit de marqueurs dont l'expression dans le manubrium de *Clytia* est déjà connue : *Sox10* (Jager *et al.* 2011), *Otp* (Kraus *et al.* 2015), *Prdl-a* (Ruggiero 2015), *PP1* (Takeda *et al.* 2018) et *PP5* (Ruggiero 2015) ; ainsi que la *neurogenin*, un marqueur de destin neural (Kageyama *et al.* 2005).

D'après les données transcriptomiques, *Sox10* et *otp* sont fortement exprimés dans le manubrium, *Prdl-a*, *Otp* et *PP1* plus faiblement (Fig.71.A). Après ablation du manubrium l'expression des facteurs de transcription et de *PP1* diminue très fortement, indiquant que ceux-ci sont exprimés majoritairement dans le manubrium. Puis l'expression de *Sox10*, *Prdl-a* et *Otp* commence à augmenter à 24hpd, celle de la *neurogenin* et *PP1* à 48hpd. La neurogenèse commence donc à 24hpd, les neurones différenciés exprimant *PP1* apparaissent après 48h.

Le peptide PP5, précurseur du neuropeptide RF-amide (Takeda *et al.* 2018) présente des variations d'expression relativement faibles au cours de la régénération, comparées aux autre marqueurs (Fig.71.A). Un test statistique est nécessaire afin de savoir si elles sont significatives. *PP5* est fortement exprimé dans le manubrium non disséqué et son expression relative augmente après ablation du manubrium. *PP5* est exprimé entre autres dans des cellules isolées du manubrium et de la sous-ombrelle, identifiées comme étant des neurones ganglionnaires (Ruggiero 2015). L'augmentation de l'expression dans la zone centrale de la méduse après ablation est donc probablement due à sa forte expression dans la sous-ombrelle.

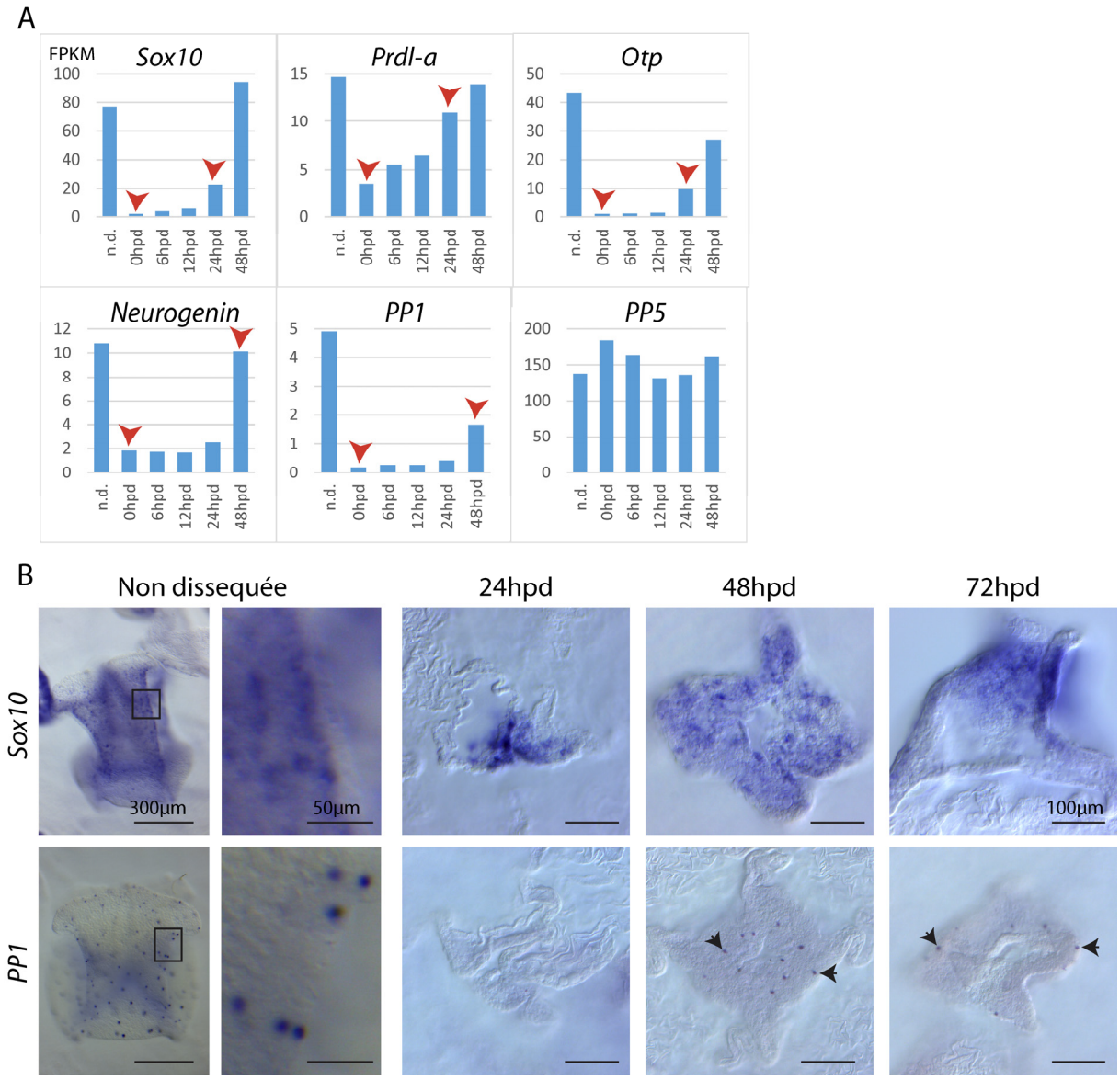


Figure 71 : Neurogenèse au cours de la régénération
(A) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des marqueurs de neurogenèse et de cellules nerveuses différenciées. Les flèches rouges indiquent les variations principales.
(B) Patrons d'expression de *Sox10* et *PP1* obtenus par ISH dans le manubrium de méduses non disséquées en vue latérale et en régénération 24hpd, 48hpd (vue orale) et 72hpd (vue latérale pour *Sox10*, vue orale pour *PP1*). Les flèches indiquent les cellules *PP1*+ dans les manubriums en régénération.

Pendant la régénération, l'expression de *PP5* diminue, puis augmente à 48hpd, correspondant probablement à la différenciation des neurones produisant le peptide RF-amide dans le manubrium régénéré.

Le facteur de transcription *Sox10* et le peptide *PP1* ont été choisi pour valider ces données par ISH. Comme décrit par Jager *et al.* (2010), *Sox10* est exprimé dans des cellules dispersées de l'ectoderme du manubrium, au niveau de la zone centrale (Fig.71.B). Le patron d'expression de PP1 est également conforme à celui observé par Takeda *et al.* (2018), *PP1* étant exprimé dans des cellules isolées de l'ectoderme. L'expression de *Sox10* est visible après 24h dans le primordium. L'expression est dispersée dans l'ectoderme du primordium jusqu'à 72hpd, où elle est restreinte à la zone centrale. Concernant PP1, les cellules exprimant PP1 sont absentes des primordiums à 24hpd. Elles apparaissent à 48hpd et leur nombre augmente à 72hpd. Les patrons d'expression obtenus par ISH sont conformes aux profils d'expression issus des données transcriptomiques.

III.4.4. Nématocytes

Les nématocytes du manubrium sont localisés principalement au niveau de la bouche, certains sont dispersés dans l'ectoderme de la zone centrale. Ils sont visibles par microscopie DIC, ou par immunohistologie avec l'anticorps YL1/2 marquant les capsules des nématocystes (Fig.60.C). Au cours de la régénération, des capsules sont visibles au centre du primordium dès 24hpd (Fig.72.A). Leur nombre augmente au cours de la régénération. Elles sont majoritairement localisées autour de l'ouverture de la cavité gastrovasculaire (Fig.72.A).

Chez *Clytia*, différents gènes impliqués dans la nématogenèse dans les bulbes tentaculaires sont exprimés à la base du manubrium. Il s'agit de *mcoll1* et *mcoll3/4* (Denker *et al.* 2008) composant la paroi de la capsule du nematocyste (Kurz *et al.* 1991), de la *nematogalectin*, un des composants du tubule (Hwang *et al.* 2010), ainsi que *Prdl-b* (Ruggiero 2015), connu pour être exprimé dans les nématoblastes en division et en migration chez l'hydre (Gauchat *et al.* 1998). Une zone de nématogenèse est très probablement présente à la base du manubrium (Fig.5.A-B). Ces gènes font partie de ceux dont l'expression augmente à 48hpd ou n'a pas encore commencé à augmenter à 48hpd. J'ai également suivi l'expression de *Dkk3* et *NOWA*, connus pour être respectivement exprimés dans les étapes précoces et tardives de la nématogenèse dans le bulbe de *Clytia* (Denker *et al.* 2008).

Dans les données transcriptomiques, les marqueurs de nématogenèse suivent le même profil d'expression (Fig.72.B). Ils sont exprimés dans le manubrium non disséqué, très fortement pour *mcoll3/4a*, *mcoll1*, *Dkk3* et la *nématogalectin*, plus faiblement pour *NOWA* et *Prdl*-b. Leur expression diminue très fortement après ablation du manubrium, seul *mcoll1,* qui était le plus fortement exprimé reste faiblement exprimé. L'expression des deux *mcoll*, qui sont les gènes les plus fortement exprimés dans le manubrium non disséqué commence à augmenter à 48hpd, indiquant un début de nématogenèse. Les autres marqueurs restent proches de zéro. Ces données indiquent que même si quelques nématocytes sont présents dans le primordium dès 24hpd, la nématogenèse ne commence qu'après 48h.

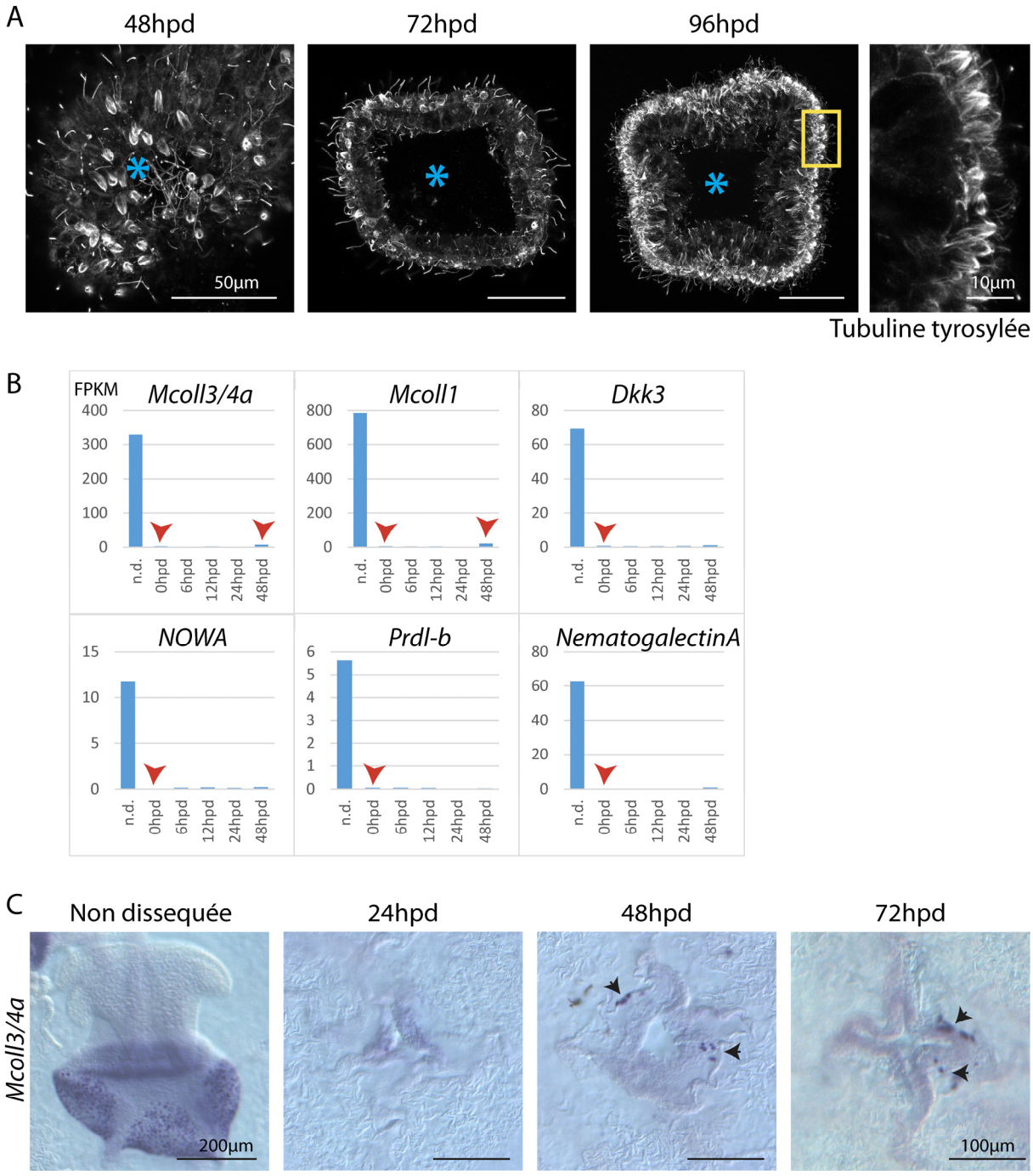


Figure 72 : Nématogenèse au cours de la régénération
(A) Nématocytes visualisés par immunohistologie avec l'anticorps dirigé contre la tubuline tyrosylée à l'extrémité orale du primordium en régénération 48hpd, 72hpd et 96hpd en vue orale. L'astérisque indique l'ouverture de la cavité gastrique.
(B) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des marqueurs de nématogenèse. Les flèches rouges indiquent les variations principales.
(C) Patrons d'expression de *mcoll3/4* obtenus par ISH dans le manubrium de méduses non disséquées en vue latérale et en régénération 24hpd, 48hpd et 72hpd (vue orale). Les flèches indiquent les cellules *mcoll3/4*+ dans les manubriums en régénération.

Mcoll3/4 a été choisi comme marqueur des nématocytes en différenciation pour valider ces données. Le patron d'expression de *mcoll3/4* dans l'ectoderme des quatre poches gastriques est conforme au profil d'expression observé par Denker *et al.* (2008) et Sinigaglia *et al.* (2017). *Mcoll4/3* est absent du primordium à 24hpd. A partir de 48hpd, des cellules exprimant *mcoll3/4* sont présentes dans la moitié des méduses observées à la base du primordium entre les canaux radiaires, au niveau des futures poches gastriques, indiquant que la nématogenèse a effectivement commencée. A 72hpd, toutes les méduses ont bien des cellules exprimant *mcoll3/4* en nombre plus important qu'à 48hpd. De façon intéressante, les cellules *mcoll3/4+* sont rarement présentes dans les quatre poches gastriques à la fois à 48hpd et 72hpd. Encore une fois, l'ISH est cohérente avec les données du transcriptome.

III.4.5. Cellules gastrodermiques glandulaires et digestives

Deux types de cellules endodermiques sont présents dans le manubrium de *Clytia* : des cellules glandulaires responsables de la sécrétion d'enzymes (avec différents sous-types, voir section I.2.5 de l'introduction du chapitre) et des cellules digestives absorbant les nutriments. Dans le manubrium de *Clytia*, les cellules digestives sont visibles par coloration à la phalloïdine, et reconnaissables à leur grande taille, leur forme allongée, et la présence de vacuoles (Fig.60.F). Elles sont présentes au niveau de la partie centrale du manubrium et de la base. Pendant la régénération, elles sont visibles à partir de 72hpd, bien intégrées dans l'épithélium du gastroderme (Fig.73.A).

J'ai utilisé les enzymes digestives comme marqueurs de cellules glandulaires différenciées que j'ai identifiées parmi les gènes ayant le profil d'expression suivant : une très forte expression dans le manubrium, disparaissant après ablation, et une augmentation de l'expression à partir de 48hpd. Différents produits de sécrétion de cellules glandulaires déjà caractérisés chez les cnidaires suivent ce profil (Fig.73.B). Certains sont déjà connues pour être exprimées dans le manubrium de *Clytia*, comme *l'antistasin* (Ruggiero 2015), ou celui de *Podocoryne* comme *PMP1* (Pan *et al.* 1998) et *EPPT* (Baader *et al.* 1995). D'autres ont été caractérisés uniquement chez les polypes comme la *chitinase*, présente dans le gastroderme de nombreux polypes, à l'exception d'*Hydractinia* (Jeuniaux 1962; Klug *et al.* 1984; Mali *et al.* 2004; Steinmetz *et al.* 2017). D'autres enzymes digestives non caractérisées sont présentes dans le transcriptome, comme des *peptidases*, des *lipases* et des *metalloproteinases*.

D'après les données transcriptomiques, ces enzymes digestives suivent un même profil d'expression au cours de la régénération (Fig.73.B). Elles sont exprimées très fortement dans le manubrium non disséqué (entre 91 et 7437 FPKM). Toutes les enzymes, à l'exception de *CTRL-1*, *antistasin*, *acidic-mammalian-chitinase-like* (*AMCh-like*), *catepsinL1* et *carboxypeptidaseB* sont exprimées exclusivement dans la zone centrale et leur expression disparait presque après ablation du manubrium. Leur expression augmente faiblement à 48hpd mais reste très éloignée des niveaux du manubrium non disséqué. Seule la *catepsin-L1* commence à augmenter à 24hpd.

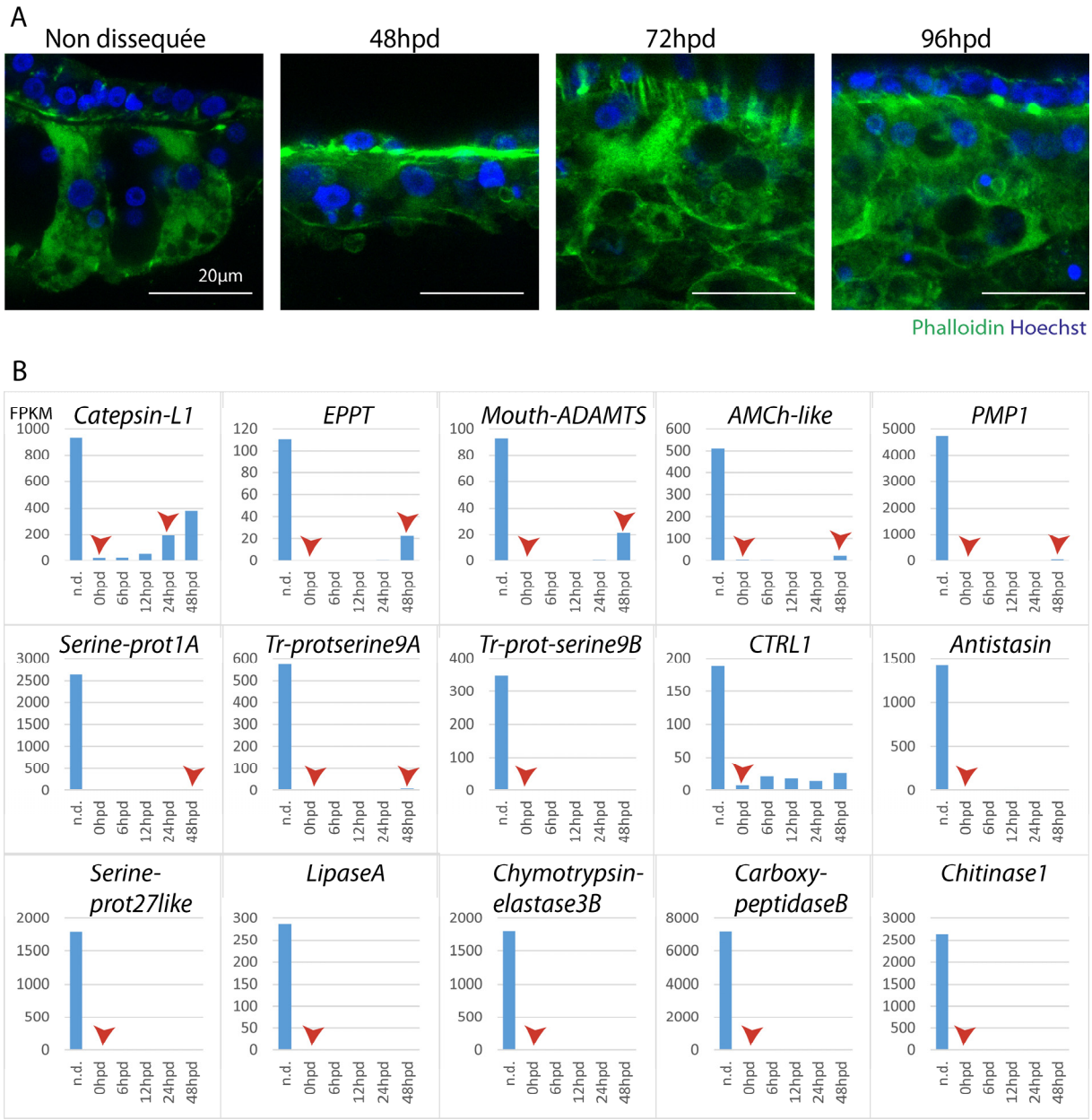


Figure 73. Cellules endodermiques digestives et diversité des enzymes digestives.
(A) Cellules endodermiques visualisées par un marquage à la phalloïdine (en vert) au niveau de la base du manubrium non disséqué et de l'endoderme du primordium en régénération 48hpd, 72hpd et 96hpd. Noyaux colorés au hoechst en bleu. Cavité digestive vers le bas.
(B) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des enzymes digestives. Les flèches rouges indiquent les variations principales.

Les enzymes digestives sélectionnées ont des patrons d'expression très variés dans le manubrium non disséqué (Fig.74.A). Elles sont exprimées dans des grosses cellules de l'endoderme, avec des territoires bien distincts, révélant la présence de nombreuses populations de cellules glandulaires coexistant dans l'endoderme du manubrium. *MouthADAMTS*, et *AMCh-like* sont exprimés à l'extrémité orale du manubrium, *AMCh-like* étant exprimé également à la base dans la continuité des canaux radiaires. Les cellules bordant l'extrémité orale ne sont pas marquées. *Tr-prot-serine9A* est exprimé au niveau de la partie centrale. *Serine–prot1A*, *Tr-prot-serine9B*, *serine prot-27l*, la *chymotrypsin elastase 3B*, *l'antistasin*, la *lipase*, la *carboxypeptidase*B et la *catepsin*-L1 sont exprimés à la base du manubrium (soit sur les poches gastriques, soit en dehors, soit les deux), ainsi que dans la partie centrale le long des arêtes. L'expression de la *chitinase1* est restreinte à la base du manubrium, au niveau des quatre poches gastriques. La *carboxypeptidaseB*, *AMCh-like* et la *catepsin-L1* sont également exprimés dans l'endoderme de la gonade, à proximité du canal radiaire pour la *carboxypeptidaseB* et *AMCh-like*, dans tout l'endoderme pour la *catepsin-L1,* qui est également exprimée dans l'endoderme des bulbes tentaculaires et dans le canal circulaire. Quelques cellules isolées exprimant la *serine prot-27like*, *serine-prot1a* sont présentes dans les bulbes tentaculaires.

Les gènes étudiés sont exprimés dans des cellules isolées du gastroderme, indiquant que les cellules qui les expriment sont probablement des cellules glandulaires ; avec une réserve cependant sur la *catepsin-L1* et *mouth-ADAMTS. Mouth-ADAMTS* est exprimé dans une ligne de cellules à l'extrémité orale du manubrium, ces cellules sont plus petites que les cellules glandulaires exprimant par exemple la *chymotrypsin-elastase3B* ou la *serine-prot1a* (Fig.74.A). Quant à la *catepsin-L1*, elle est exprimée dans des cellules endodermiques du manubrium, des gonades et des bulbes tentaculaires, ainsi que dans les canaux radiaires et le canal circulaire. De plus, les données transcriptomiques indiquent que ces cellules réapparaissent au bout de 24hpd dans le primordium en régénération, ce qui est 24 à 48h plus tôt que les cellules exprimant les enzymes digestives (Fig.73.B). Les cellules exprimant la *catepsin-L1* sont potentiellement des cellules digestives.

L'expression de trois enzymes a été suivie par ISH au cours de la régénération : la *carboxypeptidaseB*, la *chitinase1*, et la *catepsin-L1* (Fig.74.B). Comme prédit à partir des données transcriptomiques, la *carboxypeptidaseB* et la *chitinase1* ne sont pas exprimées dans le primordium à 24h et 48hpd. La *carboxypeptidaseB* et la *chitinase1* sont visibles à 72hpd dans l'endoderme de la partie aborale, correspondant aux futures poches gastriques. En revanche la *catepsin-L1* est exprimée fortement dans l'endoderme du primordium dès 24hpd. L'expression est maintenue à 48hpd dans tout l'endoderme et est restreinte à l'endoderme de la base et la partie aborale du tube à 72hpd.

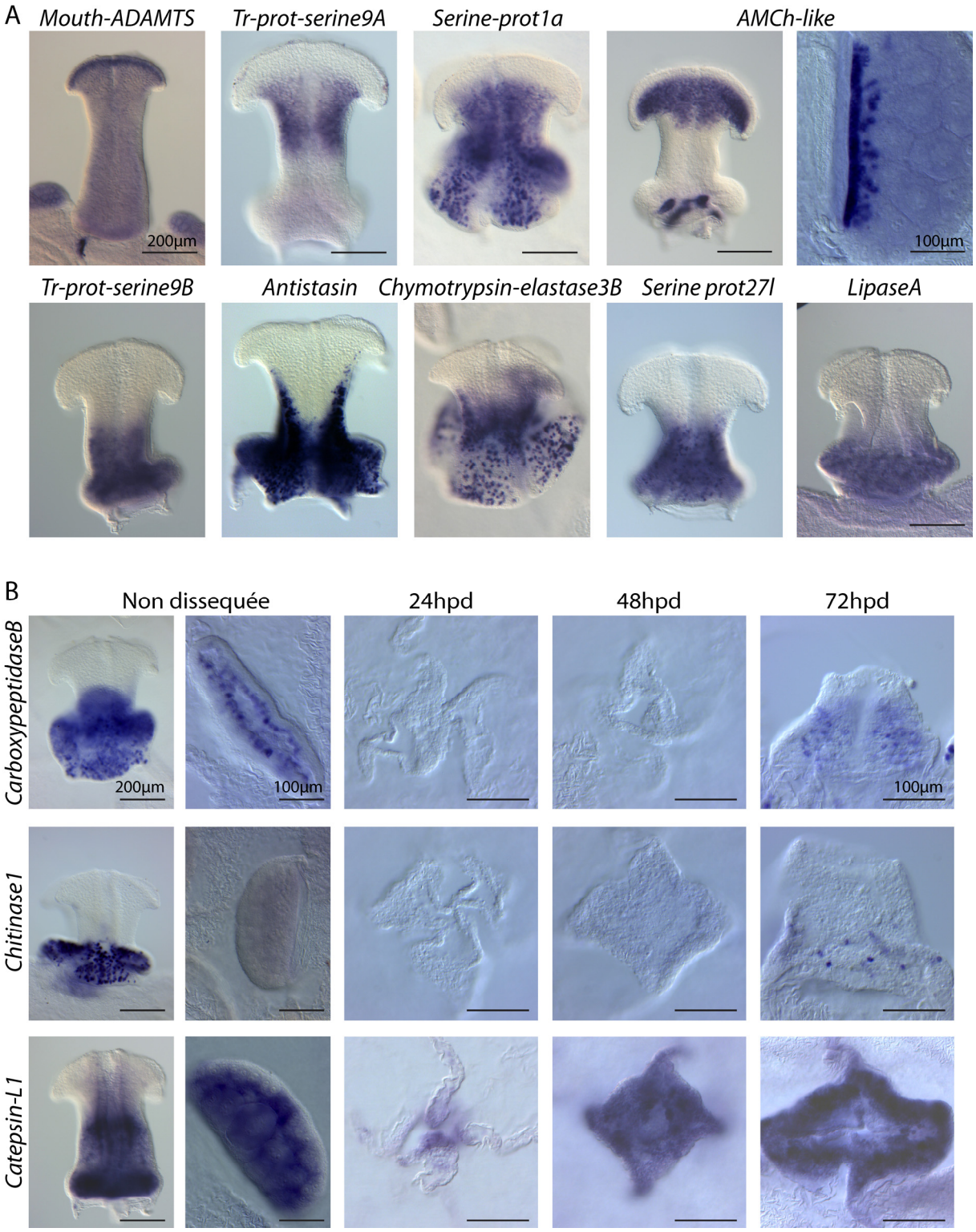


Figure 74 : Localisation des cellules glandulaires dans le manubrium non disséqué et au cours de la régénération.

(A) Patrons d'expression des enzymes digestives obtenus par ISH dans le manubrium de méduses non disséquées en vue latérale et dans la gonade pour *AMCh-like*.

(B) Patrons d'expression des gènes *CarboxypeptidaseB, Chitinase1* et *Catepsin-L1* obtenus par ISH dans le manubrium en vue latérale et les gonades de méduses non disséquées, et dans les zones centrales en régénération 24hpd, 48hpd (vue orale) et 72hpd (vue latérale pour *CarboxypeptidaseB,* et *Chitinase1,* vue orale pour *Catepsin-L1*).

III.4.6. Autres types cellulaires

Certains gènes ont un profil d'expression similaire à celui des cellules glandulaires, ayant une très forte expression dans le manubrium (entre 90 et 7500 FPKM) puis disparaissant complètement après ablation, l'expression augmentant ensuite tardivement pendant la régénération. C'est le cas de la *Rhamnospondin* et de deux gènes avec des séquences répétées appelés *RepSeqX* et *RepSeqY* (Fig.75.A).

La rhamnospondin est une protéine sécrétée ayant été caractérisée chez *Hydractinia symbiolongicarpus* (Schwarz *et al.* 2007). Deux rhamnospondin ont été décrites, elles contiennent un peptide signal, un domaine riche en sérine, huit domaines répétés de type thrombospondin (TSR) et un domaine L-rhamnose-binding (RBL). Elles sont exprimées à l'extrémité de l'hypostome du polype et codent pour des récepteurs putatifs de la réponse immunitaire (Schwarz *et al.* 2007). Un blast vers le transcriptome en utilisant les deux séquences partielles de *rhamnospondin* d'*Hydractinia* (ABD95939.1 et ADV92627.1) a permis d'identifier neuf gènes codant pour des protéines contenant des domaines thrombospondin ou 'galactose binding' (Fig.75.B). Huit de ces neuf protéines sont exprimées fortement dans le manubrium non disséqué. Le gène ayant le plus de similarités avec la *rhamnospondin d'Hydractinia* a été étudié par ISH (correspondant aux identifiants XLOC_041155 et XLOC_041151).

Chez *Clytia*, les cellules exprimant la *rhamnospondin* forment une unique ligne de cellules à l'extrémité de l'endoderme du manubrium (Fig.75.C). Au cours de la régénération, ces cellules réapparaissent à l'extrémité la plus orale du manubrium à 72hpd.

Concernant les deux gènes *RepSeqX* et *RepSeq*Y, leurs séquences ont certaines caractéristiques de précurseurs de peptides, même si cette identité reste à confirmer. En effet, ils contiennent un peptide signal du côté N-terminal, ainsi que des répétitions de courtes séquences comportant une glycine en position C-terminale pouvant être convertie en groupement amide (Fig.76.A). Entre les séquences sont intercalés des sites potentiels de clivage acide ou basique. Leur domaine d'expression, visualisé par ISH, est restreint à la partie orale du manubrium (Fig.76.B). *RepSeqX* est exprimé très fortement dans une ligne de cellules proches de l'extrémité du manubrium et dans des cellules isolées de l'extrémité à la partie centrale. *RepSeqY* a un territoire plus restreint, il est exprimé dans toutes les cellules bordant l'extrémité du manubrium. Les cellules forment ensuite un réseau jusqu'à la limite de la partie centrale. *RepSeqY* est également exprimé le long du canal circulaire.

Au cours de la régénération, *RepSeqX* est absent du primordium à 24hpd. Les cellules exprimant *RepSeqX* apparaissent à 48hpd autour de l'ouverture de la cavité gastrique, place qu'elles conservent à 72hpd.

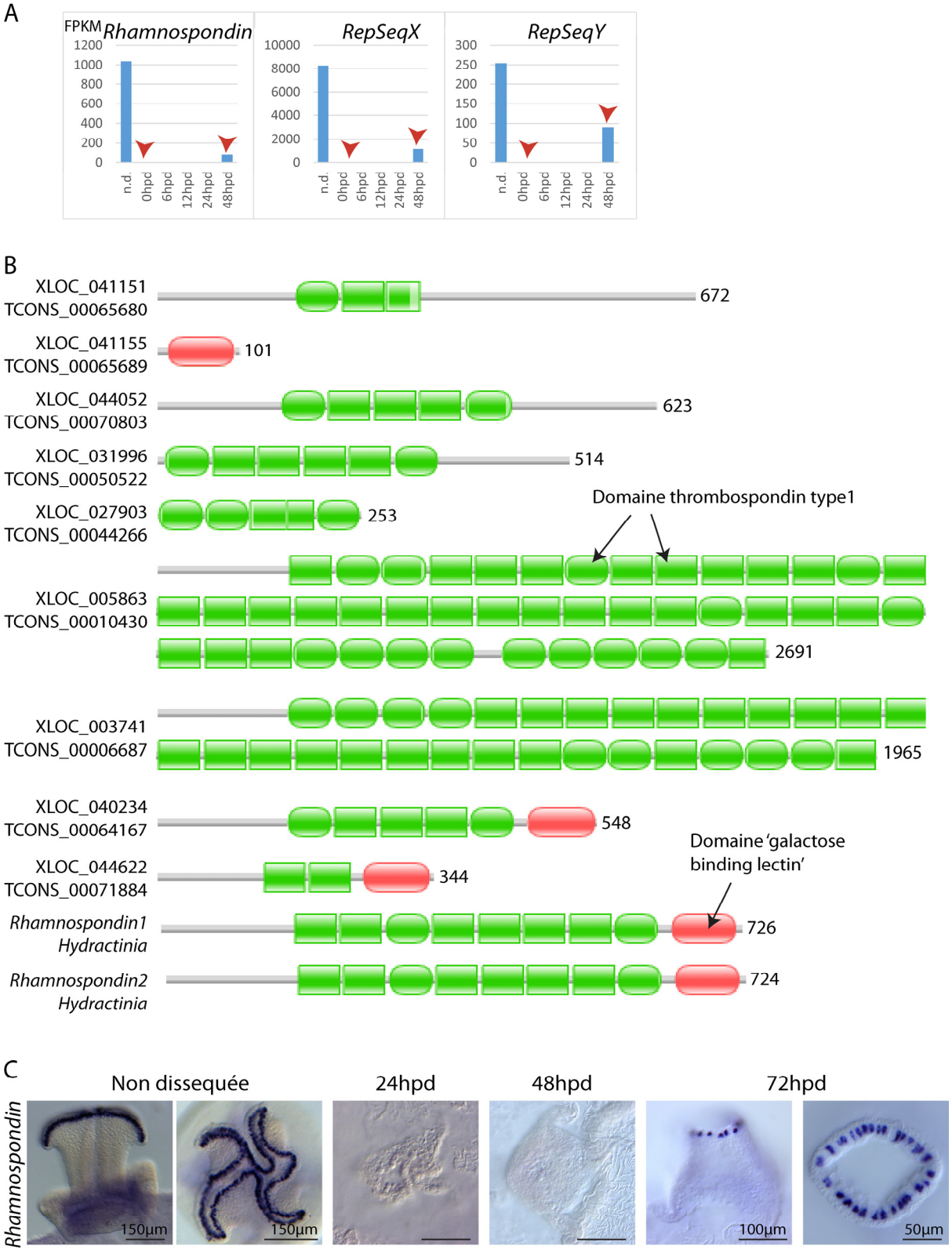


Figure 75 : Identification d'une *rhamnospondin* chez *Clytia*
(A) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) de la *rhamnospondin*, de *RepSeqX* et *RepSeqY*. Les flèches rouges indiquent les variations principales.

Figure 75 : Identification d'une *rhamnospondin* chez *Clytia* (suite de la légende).
(B) Domaines conservés des protéines de *Clytia* contenant des domaines thrombospondin, et des deux *rhamnospondin* d'*Hydractinia*, déterminés par PFAM. En vert les domaines Thrombospondin type 1, en rouge les domaines 'galactose binding lectin'. A gauche les identifiants des gènes de *Clytia* et des protéines correspondantes. A droite la taille des protéines (nombre d'acides aminés).
(C) Patrons d'expression de la *rhamnospondin* obtenus par ISH dans le manubrium de méduses non disséquées en vue latérale et orale et dans les zones centrales en régénération 24hpd, 48hpd (vue orale) et 72hpd (vue latérale et orale).

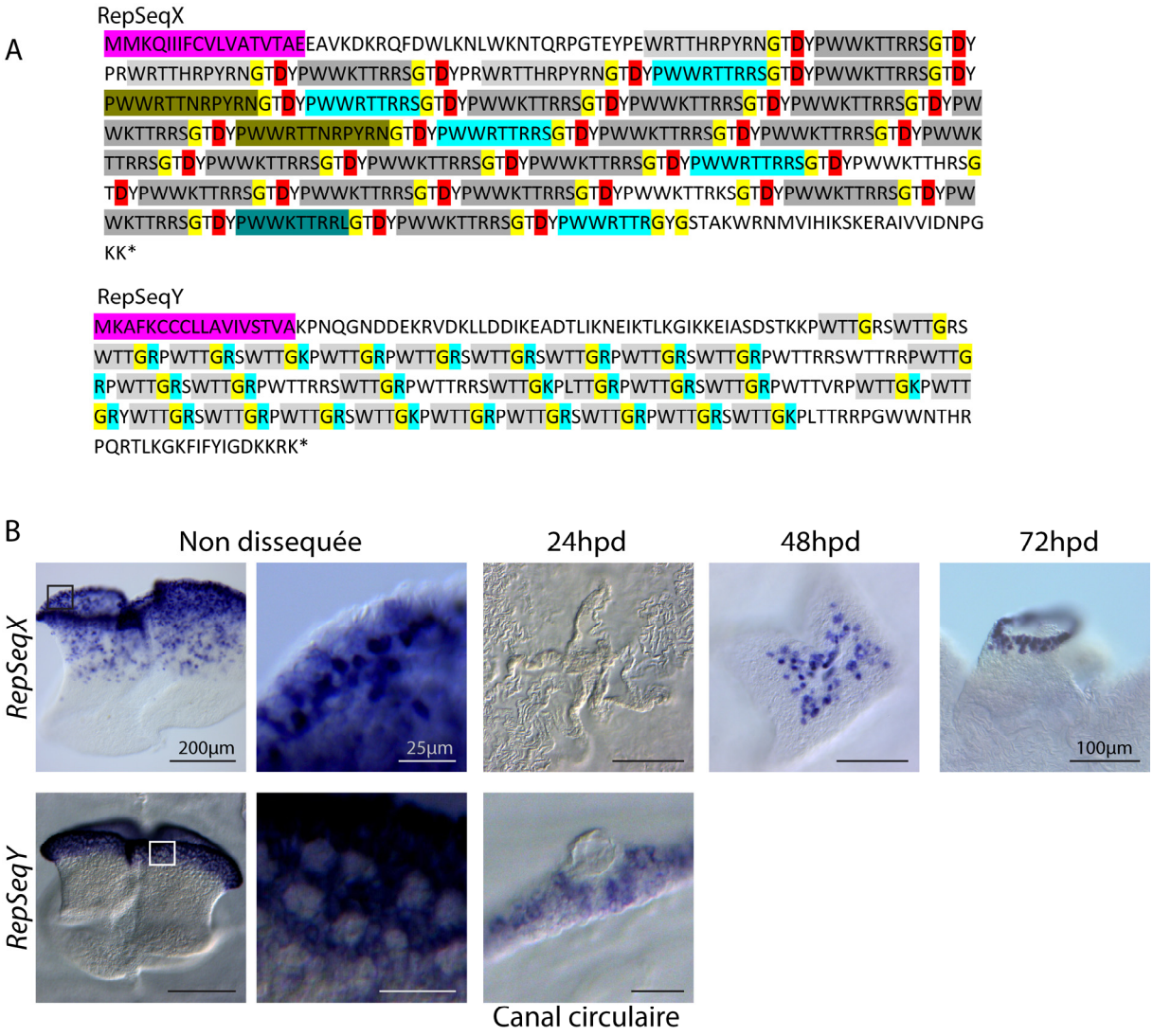


Figure 76 : Deux protéines avec motifs répétés identifiées dans le transcriptome de *Clytia*
(A) Séquences des protéines RepSeqX et RepSeqY. Le peptide signal est surligné en violet, les séquences répétées en gris, les glycines en position C-terminale en jaune, les potentiels sites de clivage acides et basiques respectivement en rouge et en vert.
(B) Patrons d'expression des gènes *RepSeqX* et *RepSeqY* obtenus par ISH dans le manubrium de méduses non disséquées en vue latérale et dans le canal circulaire pour *RepSeqY*. Patron d'expression de *RepSeqX* dans les zones centrales en régénération 24hpd, 48hpd (vue orale) et 72hpd (vue latérale).

Les profils d'expression issus des données transcriptomiques sont bien en cohérence avec les patrons d'expression observés. Les marqueurs des types cellulaires sélectionnés ont permis d'observer une réapparition séquentielle des cellules au cours de la régénération. Tout d'abord les i-cells et les précurseurs de cellules nerveuses sont présents dans le primordium à 24h. A 48h, quelques cellules nerveuses sont présentes, ainsi que des cellules *RepSeqX*+, des nématocytes se différencient. Puis à 72hpd, des cellules glandulaires et *rhamnospondin*+ sont présentes dans le primordium.

III.5. Détermination des territoires pendant la régénération

III.5.1. Définition des territoires oraux et digestifs

Les facteurs de transcription *Brachyury* et *FoxA* ont été choisi afin de suivre la mise en place respectivement du pôle oral et du système digestif au cours de la régénération. D'après les données transcriptomiques, ils sont tous les deux exprimés dans la zone centrale des méduses non disséquées (Fig.77.A). La perte totale de leur expression après dissection indique qu'ils sont exprimés uniquement dans le manubrium. Tous deux sont re-exprimés dans les tous premiers stades de régénération. L'expression de *FoxA* augmente dès 6hpd, puis plus fortement à 24hpd et 48hpd. Celle de *Brachyury* augmente à 24hpd et 48hpd (Fig.77.A).

Ces observations sont confirmées par les ISH au cours de la régénération (Fig.77.B). En accord avec les patrons d'ISH de Kraus *et al.* (2015), *Brachyury* et *FoxA* sont exprimés dans le manubrium sur des territoires distincts. *Brachyury* marque l'extrémité du manubrium, tandis que *FoxA* est exprimé dans l'endoderme de la base, ainsi que dans la zone centrale au niveau des arêtes (Fig.77.B). Au cours de la régénération, leur expression est visible par ISH dès 24hpd dans le primordium. L'expression de *Brachyury* est restreinte au centre, tandis que *FoxA* est exprimé dans des cellules endodermiques dans tout le primordium. L'intensité du marquage augmente ensuite à 48hpd et les territoires *FoxA*+ et *Brachyury*+ deviennent bien distincts, *Brachyury* étant exprimé au niveau de l'ouverture nouvellement formée de la cavité gastrique, *FoxA* à la base du primordium. A 72hpd, le manubrium a une forme de tube. Les territoires de *Brachyury* et *FoxA* correspondent bien aux territoires dans les méduses non disséquées.

Les données transcriptomiques révèlent l'expression dynamique de *Brachyury* et *FoxA* dans la régénération. Les patrons d'ISH au cours de la régénération informent que le manubrium en régénération est déjà régionalisé dès 48hpd, au moment de l'ouverture de la cavité digestive. Les territoires oraux et digestifs sont déjà définis.

III.5.2. Expression dynamique de composants de la voie Wnt/β-caténine

La voie Wnt/β-caténine contrôle la formation du pôle oral chez les cnidaires au cours du développement et de la régénération (Broun 2005; Duffy *et al.* 2010; Trevino *et al.* 2011). Chez *Clytia*, les acteurs principaux de la voie Wnt/β-caténine sont présents. De plus, le manubrium

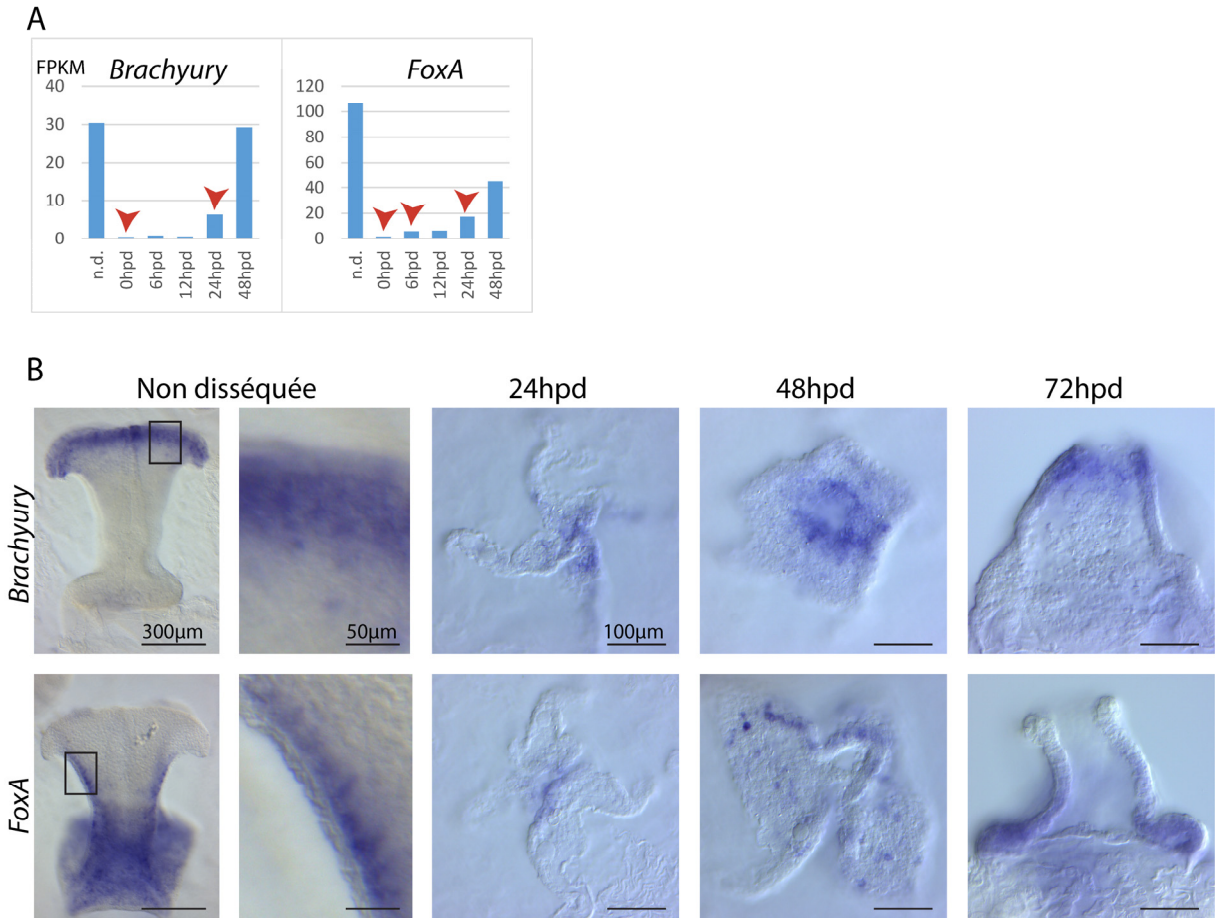


Figure 77 : Expression des FT *Brachyury* et *FoxA* au cours de la régénération du manubrium

(A) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) de *Brachyury* et *FoxA*. Les flèches rouges indiquent les variations principales.

(B)Patrons d'expression des gènes obtenus par ISH dans le manubrium (vue latérale, pole oral vers le haut) de méduses non disséquées et dans le primordium en régénération 24hpd, 48hpd (vue orale) et 72hpd (vue latérale).

est connu pour être une structure exprimant les acteurs de la voie Wnt (neuf des 12 ligands *Wnt*, et trois des quatre récepteurs *Fzl* (Momose & Houliston 2007; Condamine 2018)).

Les données transcriptomiques révèlent une expression très dynamique des ligands *Wnt*, des récepteurs *Fzl* et d'autres acteurs de la voie canonique au cours de la régénération. De ces trois groupes, les ligands *Wnt* présentent les variations d'expression les plus importantes, avec une augmentation de l'expression séquentielle au cours de la régénération (Fig.78.A). Les *Wnt* exprimés dans le manubrium (*Wnt1*, *Wnt1b, Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5b, Wnt6, Wnt7* et *WntA*) ont le profil suivant : forte diminution de l'expression après ablation du manubrium, suivie d'une augmentation au cours de la régénération. *Wnt5* et *Wnt8* ne sont pas exprimés dans la zone centrale non disséquée, et présentent pourtant des variations d'expression au cours de la régénération. *Wnt11a* n'est pas exprimé dans la zone centrale pendant la régénération.

D'après les données transcriptomiques, l'expression de certains *Wnt* augmente dès 6hpd (Fig.78.A), quand le trou causé par la dissection est encore ouvert. C'est le cas de *Wnt6*, exprimé dans l'ectoderme de l'extrémité distale du manubrium non disséqué, et de *Wnt8*, qui n'est pas exprimé dans le manubrium (pour les patrons d'expression des Wnt et Fzl dans le manubrium, voir Fig.56A tirée de Condamine (2018)). L'expression de *Wnt3*, augmente à 24hpd, le primordium est alors formé. L'expression de *Wnt5* qui est absent du manubrium augmente également. L'ouverture de la cavité gastrique à 48hpd est associée à l'augmentation de l'expression de *Wnt1* et *Wnt1b* exprimés dans l'ectoderme distal, *Wnt2* exprimé dans l'endoderme proximal, *Wnt4* et *Wnt7* exprimés dans l'ectoderme au niveau de la limite entre l'extrémité distale et la colonne, *WntA* exprimé dans l'endoderme à la base, et *Wnt5b* exprimé dans l'endoderme du manubrium et dans la zone centrale après ablation du manubrium.

Les récepteurs *Fzl* ont des profils d'expression très différents (Fig.78.B). L'expression de *Fzl1* et *Fzl4* ne varie pas (*Fzl4*) ou augmente (*Fzl1*) après ablation du manubrium, puis elle diminue pendant la régénération. Quant à *Fzl2* et *Fzl3*, leur expression ne varie pas après ablation du manubrium, puis elle augmente à 12h et à 24h respectivement pour *Fzl3* et *Fzl2* jusqu'à atteindre un niveau supérieur au manubrium non disséqué (*Fzl2* n'est pas exprimé dans la zone centrale).

Parmi les autres acteurs de la voie Wnt/β-caténine, l'expression de la *β-caténine* est celle présentant le plus de variations (Fig.78.C). Elle est fortement exprimée dans la zone centrale avant et après ablation. Puis son expression triple à 6hpd, diminue et ré-augmente à 48hpd. *Tcf*, *GSK-3* et *Dsh* présentent un profil similaire avec un pic d'expression à 6hpd et 48hpd, mais avec des variations plus faibles. L'expression de l'*axin* diminue après ablation puis augmente à 24hpd. Les patrons d'expression de ces gènes ne sont pas connus chez *Clytia*.

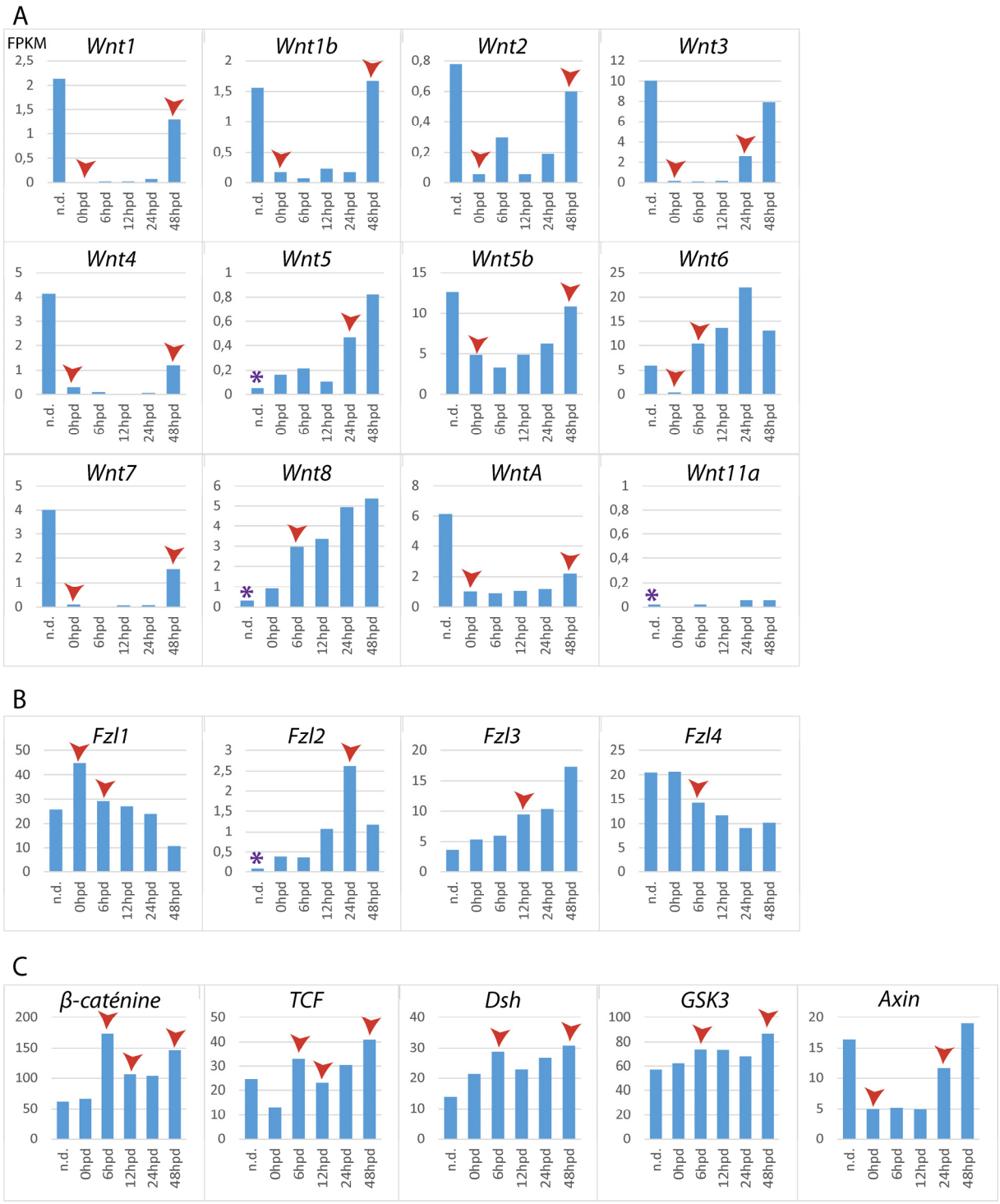


Figure 78 : Expression des acteurs de la voie Wnt/β-caténine au cours de la régénération du manubrium

(A) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des ligants *Wnt*.

(B) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des récepteurs *Fzl*.

(C) Profil d'expression issu des données transcriptomiques dans les échantillons MdCA (en abscisses, valeurs d'expression données en FPKM) des autres membres de la voie Wnt/β-caténine.

Les flèches rouges indiquent les variations principales, les astérisques violets les gènes dont l'expression n'est pas détectée dans le manubrium non disséqué.

IV. Discussion

Puissance et limitations de l'approche transcriptomique pour cette étude
Le but de cette étude était de caractériser des types cellulaires du manubrium et d'identifier des gènes candidats régulateurs de la régénération. L'approche transcriptomique a généré une liste assez conséquente de gènes différentiellement exprimés au cours de la régénération, grâce à laquelle de nombreux gènes candidats ont été identifiés. La difficulté consiste maintenant à déterminer lesquels sont réellement importants pour le remodelage et la régénération. Concernant la caractérisation des types cellulaires, quelques nouveaux marqueurs ont pu être identifiés. Les données transcriptomiques ont notamment permis d'élargir les connaissances sur les sous-types de cellules glandulaires. Le séquençage de cellules uniques permettrait de caractériser les types cellulaires avec plus de précision, et de générer un jeu de marqueurs moléculaires plus complet. Cependant, dans le contexte de la régénération, le RNAseq, contrairement au séquençage de cellules uniques, permet l'analyse aisée des variations d'expression au cours du temps, et donc d'inférer la réapparition des types cellulaires au cours de la régénération.

IV.1. Différenciation et dédifférenciation au cours de la régénération

Au cours de la régénération, j'ai pu observer une réapparition séquentielle des types cellulaires dérivés des i-cells, par immunohistochimie et grâce à la dynamique de gènes marqueurs dans le transcriptome. Tout d'abord les cellules nerveuses commencent leur différenciation à 24hpd, suivies par les nématocytes et les cellules glandulaires. La différenciation des nématocytes commence à 48hpd, celle des cellules glandulaires finie à 72hpd, les deux se différencient probablement en même temps.

La totalité des types cellulaires du manubrium en régénération ne provient pas nécessairement de la différenciation de cellules souches. En effet, les cellules nerveuses sont présentes dans la sous-ombrelle, et certaines sont dans le primordium avant l'expression de marqueurs de différenciation. Les cellules nerveuses du manubrium en régénération peuvent donc avoir plusieurs origines : soit la division des cellules nerveuses différenciées soit la différenciation à partir d'i-cells ou de précurseurs neuraux. De même pour les nématocytes, certains sont déjà présents dans le primordium avant le début de la nématogenèse. Ceux apparaissant après 48h viennent probablement de la différenciation des i-cells. Seules les cellules glandulaires sont totalement absentes du primordium dans les stades précoces de régénération et se différencient en totalité de novo.

La différenciation des i-cells est bien caractérisée chez l'hydre. Cependant, elle n'a jamais été démontrée chez *Clytia*. Certaines différences sont possibles entre ces deux espèces. Concernant les cellules glandulaires, il a été montré chez l'hydre que les cellules glandulaires gastriques (appelées 'zymogen gland cells') dérivent bien des i-cells (Schmidt & David 1986; Bode *et al.* 1987). Les cellules glandulaires sphéruleuses (appelées 'granular mucous gland cells') peuvent aussi être produites par transdifférenciation dans la région orale à partir d'autres cellules

glandulaires (Siebert *et al.* 2018), ces dernières pouvant être produites par différenciation d'i-cells (Siebert *et al.* 2018). Concernant les cellules nerveuses, les neurones ganglionnaires exprimant RF-amide sont bien dérivés des i-cells chez les cnidaires (Martin 1990, 1992). Cependant certains neurones sensoriels dans les larves d'hydrozoaires viennent des cellules ectodermiques (*Clytia* (Thomas *et al.* 1987), *Pennaria tiarella* (Martin & Thomas 1981)). Les précurseurs nerveux exprimant *Sox10* sont vraisemblablement bien dérivés des i-cells puisque l'orthologue *SoxB2* est exprimé chez *Hydractinia* et *Nematostella* dans une population de précurseurs de neurones donnant naissance aux neurones et aux nématocytes (Richards & Rentzsch 2014; Flici *et al.* 2017), mais cela reste à démontrer chez *Clytia*. Les marqueurs d'i-cells marquant à la fois les cellules souches indifférenciées et les progéniteurs, il est possible de suivre leur différenciation par l'expression de marqueurs des progéniteurs (ex. nématoblastes exprimant *Piwi* et *mcoll3/4* dans les bulbes tentaculaires (Denker *et al.* 2008)).

L'expression de marqueurs de neurogenèse et de nématogenèse indique que la différenciation a lieu sur place, dans le primordium. En l'absence de marqueurs de différenciation des cellules glandulaires, il n'est pas possible de l'affirmer pour ces dernières. Les i-cells sont présentes dans le primordium avant l'expression des marqueurs de différenciation (voir Chapitre 1). Elles sont donc probablement à l'origine de la différenciation séquentielle des cellules nerveuses, nématocytes et cellules glandulaires. Des cas de différenciation séquentielle des i-cells ont déjà été montrées chez des hydrozoaires. Dans la larve de *Clytia*, les dérivés somatiques des i-cells apparaissent séquentiellement, avec tout d'abord la différenciation des cellules glandulaires exprimant *antistasin* et des nématocytes après gastrulation à 24hpf puis la neurogenèse dès 36hpf, visible par l'expression de *Prdl-a*, et l'expression des précurseurs de RF-amide et GLW-amide (Ruggiero 2015). Dans les agrégats de cellules musculaires striées chez *Podocoryne*, la transdifférenciation des cellules musculaires est également séquentielle. Les cellules musculaires striées se transdifférencient d'abord en cellules musculaires lisses, puis en cellules nerveuses (Schmid & Alder 1984). Une fois l'axe proximo-distal établi, les cellules glandulaires, i-cells et nématocytes apparaissent (Schmid & Alder 1984; Alder & Schmid 1987).

De nombreux gènes codants pour des protéines structurales présentes dans les muscles, comme *StMyo-a, StMyo-B, MNmyo, TPM-A, TPM-B* et *MLCK-A*, voient leur expression diminuer au cours des 12 premières heures de régénération. Ceci pourrait être dû à la dédifférenciation des cellules musculaires au niveau de la zone de coupure. En effet, mes marquages à la phalloïdine indiquent que les fibres musculaires proches de la zone de coupure se dissocient (voir Chapitre 1). Des cas de dédifférenciation de cellules musculaires ont déjà été observés chez les méduses hydrozoaires. Chez *Podocoryne carnea*, *Msx* exprimé dans les muscles striés, est inactivé lorsque ces derniers sont isolés de la méduse et se transdifférencient en muscles lisses (Galle *et al.* 2005). Chez *Polyorchis*, une blessure dans la couche de muscles striés, est refermée en 10h par migration des cellules myoépithéliales. Pendant la migration, les cellules myoépithéliales changent drastiquement de morphologie. Les fibres musculaires se dissocient, les prolongements contenant initialement les fibres se rétractent et les cellules s'aplatissent. Les fibres musculaires se reconstituent 24 à 48h après la blessure (Lin *et al.* 2000). L'hypothèse de

la dédifférenciation de cellules musculaires au cours de la régénération chez *Clytia* peut être testée en réalisant les ISH des gènes structuraux pendant la régénération.

IV. 2 Régénération du pôle oral du manubrium

Chez *Clytia* et *Aurelia*, l'expression de *Brachyury* et *FoxA* démarque des territoires distincts du manubrium (Kraus *et al.* 2015), délimitant le pôle oral et l'endoderme gastrique respectivement. Au cours de la régénération du manubrium chez *Clytia*, les données transcriptomiques indiquent que leurs expressions augmentent dès les stades précoces de la régénération. L'expression de *Brachyury* et *FoxA* peut être mise en évidence par ISH dès 24hpd. A 48hpd, à l'ouverture de la cavité gastrique, les territoires sont bien distincts. *FoxA* est exprimé de façon diffuse dans l'endoderme, et *Brachyury* est localisé autour de l'ouverture, indiquant que l'extrémité distale a déjà acquis son identité orale à 48hpd. La régionalisation du primordium est visible à la localisation de types cellulaires exprimés spécifiquement au pôle oral : les nématocytes différenciés ainsi que les cellules exprimant *RepSeqX*. Les territoires du manubrium et le pôle oral sont donc définis pendant les stades précoces de la régénération, et bien établis dès 48hpd.

FoxA et *Brachyury* sont également exprimés au pôle oral pendant les premiers stades de régénération du pôle oral chez l'hydre (Martinez *et al.* 1997; Technau & Bode 1999). Ils sont potentiellement impliqués dans la détermination et l'organisation des cellules digestives dans le manubrium de *Clytia*. En effet, chez les métazoaires, *FoxA* et *Brachyury* sont connus pour leurs fonctions conservées dans la détermination du système digestif et leur expression dans la bouche et le système digestif chez les cnidaires et les bilatériens (avec une divergence du rôle de *Brachyury* chez les chordés). Ceci a conduit Chen *et al.* (2017) à supposer leur appartenance à un 'programme génétique de la bouche' composé de *FoxA*, *Brachyury* et *Otx*.

IV.3. Role potentiel de la voie Wnt/β-caténine dans la régénération

Implication de la voie Wnt/β-caténine

La voie Wnt/β-caténine est connue pour être impliquée dans la régénération chez de nombreux organismes. Au vu des domaines d'expression étagés des ligands *Wnt* dans le manubrium de *Clytia* et de leur expression très dynamique au cours de la régénération, la voie Wnt canonique est très probablement impliquée dans la régénération chez *Clytia*. Les ligands *Wnt* ayant une expression bien plus dynamique que les recepteurs *Fzl,* les données trancriptomiques laissent supposer que la régulation de la voie Wnt a lieu surtout *via* les ligands. Cependant, les seules données disponibles actuellement sur la dynamique de la voie Wnt concernent la quantité des ARNm. D'autres niveaux de régulation entrent probablement en jeu, par exemple au niveau des modifications post-traductionnelles, de la sécrétion et/ou de la diffusion des ligands Wnt.

Les ligands Wnt peuvent être séparés en deux classes, décrites chez le xénope et les cellules épithéliales de mammifères (Shimizu *et al.* 1997; Kühl *et al.* 2000; Miller 2002). Les *Wnt* dits transformants (*Wnt1, Wnt3, Wnt8*) activent la voie Wnt/β-caténine et sont impliqués dans la formation de l'organisateur de Spemann dans l'embryon de xénope et le patterning axial. Les

Wnt non transformants (*Wnt4, Wnt5a, Wnt11*) n'agissant pas via la voie Wnt/β-caténine et sont responsables des mouvements de convergence-extension dans les épithéliums via la voie PCP (review PCP – convergence-extension : (Roszko *et al.* 2009)). Chez les cnidaires l'expression de *Wnt1* et *Wnt3* au pôle oral est conservée (Hensel *et al.* 2014). De plus, des perturbations de la voie Wnt/β-caténine entrainent des défauts de polarité orale-aborale (Broun 2005; Lee *et al.* 2006; Duffy *et al.* 2010; Trevino *et al.* 2011). Le rôle de ces deux *Wnt* semble donc être conservé entre les cnidaires et les vertébrés.

Chez l'hydre, l'activation de la voie Wnt/β-caténine par surexpression de la β-caténine par transgenèse ou traitements pharmacologiques est suffisante pour induire la formation de têtes ectopiques (Broun 2005; Gee *et al.* 2010). Chez *Nematostella* et *Hydractinia* également, la formation de la tête est induite de façon ectopique par traitement à l'alsterpaulone après bissection (Duffy *et al.* 2010; Trevino *et al.* 2011). Pendant la régénération du manubrium chez *Clytia*, les autres membres de la voie Wnt/β-caténine (récepteurs Fzl, axin, TCF) ont aussi une expression dynamique, indiquant une probable action via cette voie. Il est possible de tester cette hypothèse par des traitements pharmacologiques. L'alsterpaulonne et l'azakenpaullone sont utilisés en routine pour suractiver la voie Wnt/β-caténine au cours du développement précoce chez *Clytia* (Ruggiero 2015). L'inhibiteur de la voie Wnt/βcaténine, le PKF118-310 (PKF), bloquant la liaison entre la βcaténine et le FT TCF (Lepourcelet *et al.* 2004), semble fonctionner chez la larve (Ruggiero 2015) et des tests préliminaires ont été réalisés sur les adultes par Carine Barreau et Sandra Chevalier. L'incubation de méduses après ablation du manubrium dans du PKF (0,8µM) bloque la régénération après la formation du primordium plat à la jonction des canaux radiaires. Cependant, il reste encore à déterminer si les effets observés sont réellement liés à une inhibition de la voie Wnt/βcaténine. En effet, à forte concentration, le PKF bloque également la cicatrisation chez la méduse adulte et l'adhésion intercellulaire chez la larve.

Le PKF bloque la régénération du manubrium avant la formation de la cavité gastrique. Ce blocage est plus précoce que celui induit par l'hydroxyurée (HU), inhibant la division cellulaire et arrêtant la régénération juste avant l'ouverture de la cavité gastrique (voir Chapitre 1). L'effet de PKF a lieu au moment de l'activation de Wnt3, et de l'augmentation de la prolifération dans le primordium (voir Chapitre 1). Or Wnt3 est connu chez l'hydre pour être nécessaire au déclenchement de la prolifération du côté de la tête via la voie Wnt/β-caténine (Chera *et al.* 2009). Un lien entre la β-caténine et prolifération est envisageable chez *Clytia*. Le PKF pourrait aussi avoir une action sur d'autres processus cellulaires comme la réorganisation des cellules ou migration des cellules souches. Ces hypothèses sont à tester par incubation des méduses en régénération dans le PKF et marquage EdU et ISH *Nanos1*.

Le rôle des Wnt pourrait être déterminé par RNAi. Cette technique est actuellement en développement dans l'équipe. L'injection d'ARN double brin Wnt3 chez la larve entraine l'extension du territoire aboral de la larve, un phénotype identique à l'injection de MO Wnt3 (Momose *et al.* 2008), ce qui indique que la machinerie de RNAi est bien fonctionnelle chez *Clytia*. Il reste encore cependant à trouver une méthode afin de faire entrer l'ARN dans les cellules au stade méduse. Chez *Hydractinia*, les polypes sont incubés dans l'eau de mer

contenant l'ARN (Bradshaw *et al.* 2015). Cette méthode est en phase de test chez la méduse *Clytia*.

Voie Wnt et différenciation cellulaire

La voie Wnt est connue pour influencer les cellules souches (ex. auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques des mammifères (Reya *et al.* 2003)). Ce rôle est bien présent chez les cnidaires. Teo *et al.* (2006) ont montré que chez *Hydractinia*, le traitement avec des paullones activant la voie Wnt/β-caténine entraine la différenciation des i-cells en nématocytes et cellules nerveuses, réduisant le pool d'i-cells. Chez l'hydre également, un traitement à l'alsterpaullone entraine la différenciation terminale des nématoblastes (Khalturin *et al.* 2007). Chez *Clytia*, au cours du développement, la différenciation finale des i-cells en neurones et nématocytes est inhibée par MO Wnt3 et traitement au PKF. En revanche, la différenciation en cellules glandulaires n'est pas affectée par le MO Wnt3, et donc indépendante de la voie Wnt (Ruggiero 2015). Au cours de la régénération, j'ai pu observer une augmentation de l'expression de sept des *Wnt* à 48hpd. Cette augmentation pourrait être liée à la finalisation de la neurogenèse et de la nématogenèse. Cette hypothèse est à tester par traitements pharmacologiques au cours de la régénération et observation des neurones différenciés et nématocytes par ISH et observation DIC.

Voie Wnt et polarité

Chez l'embryon de *Clytia*, l'expression de *Brachyury* et *FoxA* au pôle oral de la gastrula est sous le contrôle de la voie Wnt (Lapébie *et al.* 2014). Au cours de la régénération du manubrium, le patterning de l'axe oral-aboral pourrait être médié par la voie Wnt. En effet, cette dernière est impliquée dans le patterning antéro-postérieur chez les métazoaires (Niehrs 2010). A la différence des bilatériens chez qui la voie Wnt contrôle l'identité postérieure, le centre de signalisation Wnt/β-caténine se situe au pôle oral chez les cnidaires (review : (Petersen & Reddien 2009b).

Chez certains cnidaires, les Wnt ont des domaines d'expression échelonnés (planula : *Clytia* (Momose *et al.* 2008) et *Nematostella* (Kusserow *et al.* 2005), polype adulte : Hydre (Lengfeld *et al.* 2009), *Nematostella* (Kusserow *et al.* 2005) et *Hydractinia* (Hensel *et al.* 2014), et le manubrium de *Clytia* et *Aurélia aurita* (Condamine 2018)), ce qui a conduit à proposer la présence d'un 'Wnt-code' définissant le patterning axial chez les cnidaires (Guder *et al.* 2006). Chez *Clytia*, les différents *Wnt* activés à différent temps de la régénération du manubrium, pourraient spécifier les différents territoires du manubrium selon l'axe oral-aboral. Parmi les ligands *Wnt*, seuls *Wnt1*, *Wnt3* et *Wnt7* ont une expression conservée à l'extrémité orale du polype et le manubrium de la méduse (expression de *Wnt7* inconnue pour *Aurelia*). Ceux-ci pourraient être ceux définissant la zone orale du manubrium de *Clytia*. Les patrons d'expression des autres *Wnt* sont relativement peu conservés (Hensel *et al.* 2014) indiquant une divergence des fonctions.

Chez l'hydre, comme chez *Clytia*, les ligands Wnt sont réexprimés de façon séquentielle au niveau du pôle oral en régénération (Lengfeld *et al.* 2009). Contrairement à *Clytia*, le premier Wnt dont l'expression augmente chez l'hydre est *Wnt3* après 1,5h. Ce dernier a été identifié

comme étant le 'head activator' (voir section III.2.3 de l'Introduction générale). Chez *Clytia*, l'initiation de la régénération pourrait être déclenchée par *Wnt6* et *Wnt8*, activés avant *FoxA* et *Brachyury*. L'augmentation de l'expression de Wnt3, à partir de 24hpd reste cohérente avec un rôle potentiel dans la mise en place de la polarité orale-aborale, puisqu'elle est mise en place dans le primordium entre 24h et 48h.

IV.4. Une homologie entre la cavité gastrique du polype et le manubrium ?

L'homologie entre le manubrium de la méduse et les structures orales du polype n'est pas claire (voir section I.5 de l'introduction de ce chapitre). Elle sera discutée dans cette section en fonction de la localisation des types cellulaires et de l'expression de facteurs de transcription obtenus chez la méduse *Clytia* suite au crible ISH réalisé.

Distribution des types cellulaires

Chez la méduse *Clytia*, un des gènes exprimé au pôle oral code pour la rhamnospondin, une protéine caractérisée par la présence de plusieurs domaines thrombospondin. Deux orthologues de la *rhamnospondin* ont été identifiées chez *Hydractinia* et sont exprimées à l'extrémité de l'hypostome des gastrozoïdes (Fig.79.A1) (Schwarz *et al.* 2007). Même si leur expression n'augmente pas après contact avec des bactéries ou des champignons, la *rhamnospondin* joue potentiellement le rôle de récepteurs de la réponse immunitaire (Schwarz *et al.* 2007). Chez *Hydra oligactis* 17 gènes avec des domaines thrombospondin ont été identifiés, huit sont exprimés exclusivement dans l'hypostome de l'hydre (ectoderme et endoderme) (Fig.79.A2 et A3), cinq sont exprimés dans l'hypostome et d'autres régions et les trois autres sont exprimés dans les tentacules (Hamaguchi-Hamada *et al.* 2016). Chez l'hydre et *Hydractinia*, les protéines contenant des domaines thrombospondin sont bien associées au pôle oral du polype, et plus précisément à l'hypostome pour les rhamnospondin *d'Hydractinia* (Schwarz *et al.* 2007; Hamaguchi-Hamada *et al.* 2016). Les domaines d'expression chez la méduse *Clytia* et les polypes d'hydre et *d'Hydractinia* sont en faveur de l'homologie entre l'extrémité orale du manubrium et l'hypostome.

Les cellules glandulaires sont présentes à différents niveaux de l'endoderme du manubrium de *Clytia*, et sont donc potentiellement de bons points de comparaison avec le polype. Les patrons d'expression des cellules glandulaires dans le manubrium ont révélé une grande diversité de populations de cellules glandulaires chez *Clytia*, réparties dans tout l'endoderme du manubrium, à l'exception de l'extrémité la plus distale. Chez le polype d'hydre, les cellules glandulaires sont réparties dans tout l'endoderme de la cavité digestive, du pédoncule à la partie basale de l'hypostome (Fig.79.B1-B3) (Augustin *et al.* 2006; Hwang *et al.* 2007). De plus, différentes combinaisons d'enzymes sont exprimées en fonction de la position le long de l'axe oral-aboral (Hwang *et al.* 2007), ce qui est similaire à la distribution observée chez *Clytia*. Les domaines d'expression de l'enzyme digestive EPPT ont été caractérisés au stade polype et méduse chez *Podocoryne carnea* (Baader *et al.* 1995). Chez la méduse, les cellules exprimant *EPPT* sont localisées à l'extrémité orale du manubrium (voir Fig.54). Chez le polype, les

cellules exprimant *EPPT* sont localisées dans l'endoderme en une bande à la base de l'hypostome entre la base des tentacules et la bouche (Fig.79.B4). Chez le polype et la méduse *Pococoryne carnea*, les cellules glandulaires exprimant *EPPT* sont absentes de l'extrémité la plus distale de l'hypostome ou du manubrium. La localisation des cellules glandulaires dans tout l'endoderme du polype, à l'exception de la partie orale de l'hypostome, et dans tout l'endoderme du manubrium sauf la partie la plus distale suggère une possible homologie entre le polype entier et le manubrium.

Chez les méduses *Clytia* et *Podocoryne*, les i-cells sont présentes à la base du manubrium (Seipel *et al.* 2004b; Torras *et al.* 2004; Leclère *et al.* 2012). En revanche, chez les polypes d'hydre et *Hydractinia*, ces dernières sont localisées dans les zones de forte prolifération et sont absentes des deux extrémités du corps (Fig.79.C1-C3). Chez l'hydre, elles sont présentes dans l'ectoderme de la région gastrique (Khalturin *et al.* 2007). Chez *Hydractinia*, les i-cells sont localisées dans les stolons, dans l'ectoderme de la moitié inférieure des gastrozoides et dans l'ectoderme basal des gonozoides (Rebscher *et al.* 2008; Bradshaw *et al.* 2015). Dans les deux cas, les i-cells ne sont pas présentes dans la région orale où se situe l'hypostome. La localisation des i-cells à la base du manubrium et dans la zone médiane ou inférieure du corps des polypes est cohérente avec l'hypothèse de l'homologie entre le polype entier et le manubrium.

La composition cellulaire du pôle oral du polype et de l'extrémité distale du manubrium soutient l'homologie entre ces deux zones. Concernant la zone centrale et la base du manubrium, la distribution des cellules glandulaires et des i-cells semble supporter l'homologie entre le polype entier et le manubrium. Il ne faut cependant pas oublier que chez *Clytia*, quelques cellules glandulaires exprimant *AMCh-like*, la *lipaseA* et la *carboxypeptidase* sont présentes dans les gonades. De plus, des pools d'i-cells sont localisés dans les gonades et les bulbes tentaculaires (Leclère *et al.* 2012). On pourrait donc également supposer que tout le système gastrovasculaire de *Clytia* serait homologue à la cavité digestive des polypes hydrozoaires. Cependant, les données de Kraus *et al.* (2015) soutiennent plutôt une homologie entre les canaux radiaires de la méduse et l'endoderme des tentacules oraux du polype (Kraus *et al.* 2015).

Domaines d'expression des FT *FoxA* et *Brachyury*

Dans le manubrium de *Clytia* et *Aurelia aurita*, les territoires *FoxA* et *Brachyury* sont localisés respectivement dans l'endoderme de la base et de la colonne, et à l'extrémité orale ((Kraus *et al.* 2015; Steinmetz *et al.* 2017) cette étude). Les patrons d'expression de ces deux gènes sont connus chez certains polypes, permettant la comparaison de leurs territoires d'expression.

Chez l'hydre, deux homologues de *Brachyury* ont été identifiés, *HyBra1* et *HyBra2*. Tous deux sont exprimés en continu au niveau de l'hypostome, *HyBra1* dans les cellules épithéliales endodermiques (Fig.79.D1) (Technau & Bode 1999), *HyBra2* dans l'ectoderme (Bielen *et al.* 2007), et à l'extrémité apicale du bourgeon dès les stades précoces de bourgeonnement (Technau & Bode 1999; Bielen *et al.* 2007). Pendant la régénération de la tête, *HyBra1* fait partie des premiers gènes exprimés après 1 à 3h, tandis que *HyBra2* est exprimé après 8 à 10h (Technau & Bode 1999; Bielen *et al.* 2007). Chez *Podocoryne* et le polype de *Clytia*, *Brachyury* (*Ch-bra1* chez *Clytia*) est exprimé dans l'endoderme à l'extrémité de l'hypostome du polype

(Fig.79.D2 et D3) (Spring *et al.* 2002; Kraus *et al.* 2015). Comme pour la localisation des types cellulaires, les domaines d'expression de *Brachyury* dans les polypes et les méduses sont en faveur d'une homologie entre l'hypostome du polype et l'extrémité du manubrium de la méduse.

Concernant les orthologues de *FoxA*, ils sont associés au système digestif chez le polype. L'orthologue de *FoxA* chez l'hydre, *budhead,* est exprimé fortement dans l'endoderme de l'hypostome, dans la zone basale, au-dessus de la zone d'insertion des tentacules (Fig.79.E1). Son domaine d'expression s'étend dans la cavité gastrique en diminuant d'intensité, et n'est plus visible au-delà du quart supérieur (Martinez *et al.* 1997). *Budhead* est exprimé au pôle oral en formation, pendant le bourgeonnement et la régénération de la tête au pôle oral ou induite de façon ectopique, conduisant à supposer un rôle dans le patterning du pôle oral (Martinez *et al.* 1997). Contrairement à *Nematostella* et l'éphyrule d'Aurélia, chez qui la distribution des cellules glandulaires est restreinte au territoire *FoxA*+ (Steinmetz *et al.* 2017), l'expression de *FoxA* chez l'hydre ne couvre pas la totalité de la cavité gastrique où les cellules glandulaires sont présentes (Fig.79.E3) (Martinez *et al.* 1997; Augustin *et al.* 2006; Hwang *et al.* 2007). Chez le polype de *Clytia*, *FoxA* est exprimé dans l'endoderme du pôle oral, à l'exception des tentacules (Fig.79.E2) (Kraus *et al.* 2015). L'expression dans le reste du corps reste à déterminer. Les territoires exprimant *FoxA* chez le polype et la méduse semblent plutôt en faveur d'une correspondance entre le quart supérieur de la cavité digestive du polype et le manubrium de la méduse (Martinez *et al.* 1997; Kraus *et al.* 2015; Steinmetz *et al.* 2017), cette étude). Cependant cette conclusion est basée uniquement sur l'expression de *FoxA* chez le polype d'hydre. La comparaison des domaines d'expression d'autres FT, particulièrement ceux exprimés le long de la cavité gastrique du polype, est nécessaire afin de pouvoir trancher sur la question de l'homologie entre le manubrium et les structures du polype.

L'homologie entre l'extrémité du manubrium et l'hypostome est supportée par la localisation de types cellulaires et l'expression du FT *Brachyury*. L'homologie de la colonne du polype avec la base du manubrium est une question ouverte. La localisation dans le manubrium de la méduse de FT exprimés dans la cavité gastrique de l'hydre serait particulièrement informative pour clarifier la question de l'homologie de ces structures.

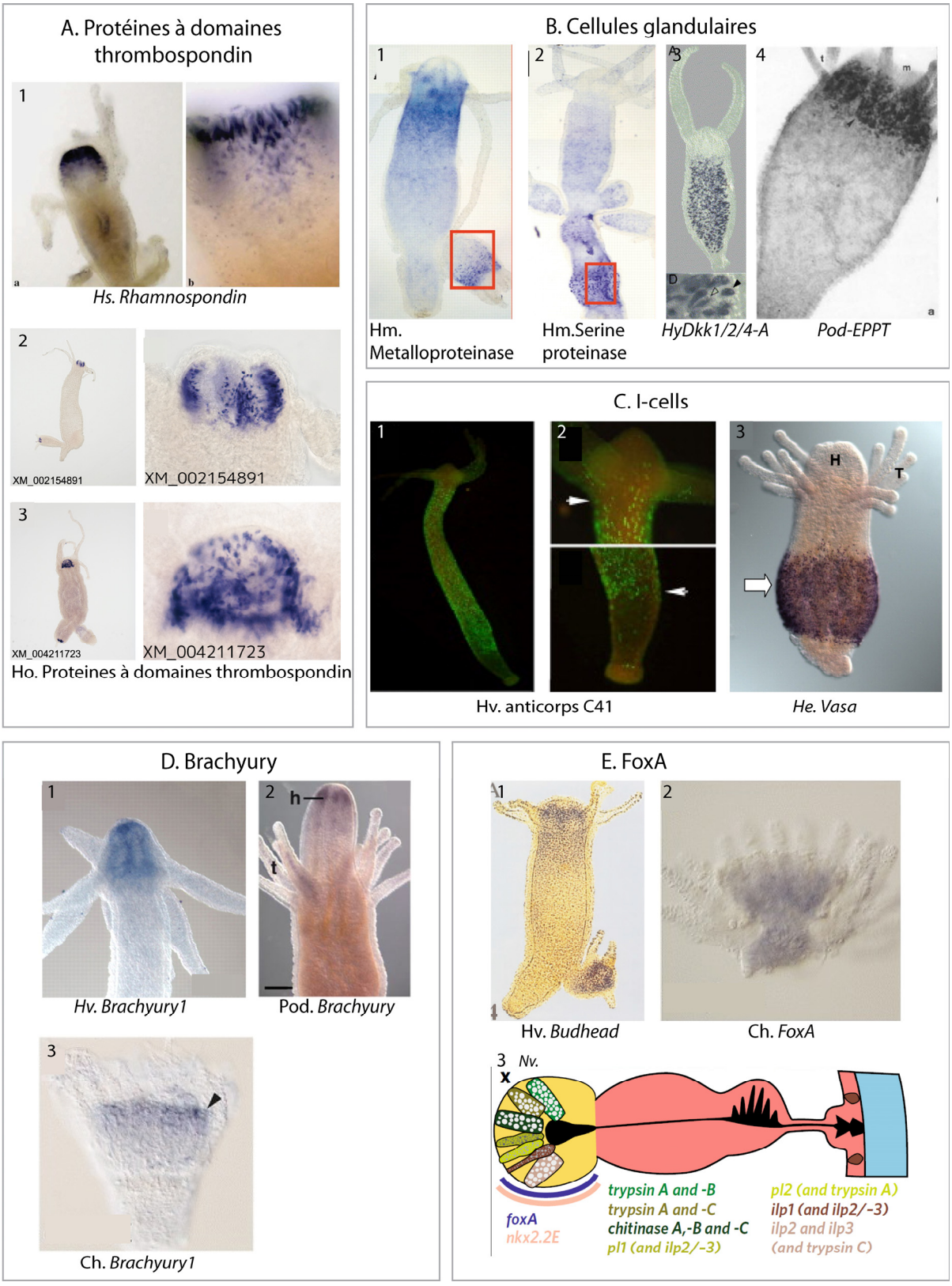


Figure 79 : Localisation de différents types cellulaires et des facteurs de transcription *FoxA* et *Brachyury* chez les polypes.

Figure 79 : Localisation de différents types cellulaires et des facteurs de transcription *FoxA* et *Brachyury* chez les polypes (légende).
(A) Patrons d'expression obtenus par ISH (1) de la *rhamnospondin* chez *Hydractinia synbiolongicarpus*, (2) et (3) de protéines à domaine thrombospondin localisée dans l'hypostome d'*Hydra oligactis*.
Tiré de Schwarz *et al.* (2007) et de Hamaguchi-Hamada *et al.* (2016).
(B) Patrons d'expression obtenus par ISH (1) d'une metalloproteinase (2) d'une serine protéinase (3) et de *HyDkk1/2/4-A chez Hydra magnipapillata (Hm) et Hydra vulgaris. (4) Patron d'expression de Pod-EPPT chez Podocoryne carnea (Pod)*.
Tiré de Hwang *et al.* (2007) Augustin *et al.* (2006) et Baader *et al.* (1995)
(C) (1) Localisation des i-cells par immunohistologie avec l'anticorps monoclonal C41 chez *Hydra vulgaris* (Hv). (2) Patrons d'expression obtenus par ISH de *Vasa* chez *Hydractinia echinata* (He).
Tiré de Khalturin *et al.* (2007) et Rebscher *et al.* (2008).
(D) Patrons d'expression obtenus par ISH (1) de *Brachyury1* chez *Hydra vulgaris*, (2) *Brachyury* chez *Podocoryne carnea* (Pc) et (3) *Brachyury1* chez *Clytia*.
Tiré de Bielen *et al.* (2007), Spring *et al.* (2002) et Kraus *et al.* (2015).
(E) Patrons d'expression obtenus par ISH (1) de *budhead* chez *Hydra vulgaris* et (2) *FoxA* chez *Clytia* (Ch). (3) Représentation schématique des territoires exprimant *FoxA* et des enzymes digestives au niveau des mésentères de *Nematostella vectensis* (Nv).
Tiré de Martinez *et al.* (1997), Kraus *et al.* (2015) et Steinmetz *et al.* (2017).

V. Annexes

Nom	Type d'échantillon	Temps	Nombre de méduses	Concentration d'ARNm (ng/µL)	Ratio 28S/18S
MdCA_0hpd_1	MdCA	0hpd	150	142	1,6
MdCA_0hpd_2	MdCA	0hpd	150	149	1,5
MdCA_12hpd_1	MdCA	12hpd	100	42	1,8
MdCA_12hpd_2	MdCA	12hpd	100	86	1,6
MdCA_24hpd_1	MdCA	24hpd	60	65	1,7
MdCA_24hpd_2	MdCA	24hpd	60	33	1,7
MdCA_48hpd_1	MdCA	48hpd	50	73	1,7
MdCA_48hpd_2	MdCA	48hpd	50	53	1,8
MdCA_6hpd_1	MdCA	6hpd	100	95	1,7
MdCA_6hpd_2	MdCA	6hpd	100	65	1,2
MdCA_WT_1	MdCA	n.d.	30	393	1,8
MdCA_WT_2	MdCA	n.d.	30	333	1,7
MdEJ_0hpd_1	MdEJ	0hpd	10	512	1,6
MdEJ_0hpd_2	MdEJ	0hpd	10	607	1,6
MdEJ_0hpd_3	MdEJ	0hpd	10	563	1,7
MdEJ_12hpd_1	MdEJ	12hpd	10	603	2
MdEJ_12hpd_2	MdEJ	12hpd	10	330	1,3
MdEJ_24hpd_1	MdEJ	24hpd	10	379	1,9
MdEJ_24hpd_2	MdEJ	24hpd	10	451	1,9
MdEJ_24hpd_3	MdEJ	24hpd	10	346	2
MdEJ_48hpd_1	MdEJ	48hpd	10	400	1,9
MdEJ_48hpd_2	MdEJ	48hpd	10	395	1,5
MdEJ_6hpd_1	MdEJ	6hpd	10	153	2
MdEJ_6hpd_2	MdEJ	6hpd	10	530	2
MdEJ_WT_1	MdEJ	n.d.	10	1208	1,7
MdEJ_WT_2	MdEJ	n.d.	10	879	1,9
UdEJ_0hpd_1	UdEJ	0hpd	10	637	1,9
UdEJ_0hpd_2	UdEJ	0hpd	10	496	1,75
UdEJ_12hpd_1	UdEJ	12hpd	10	364	1,3
UdEJ_12hpd_2	UdEJ	12hpd	10	366	1,9
UdEJ_24hpd_1	UdEJ	24hpd	10	346	1,5
UdEJ_24hpd_2	UdEJ	24hpd	10	214	1,5
UdEJ_48hpd_1	UdEJ	48hpd	10	422	2
UdEJ_48hpd_2	UdEJ	48hpd	10	498	1,8
UdEJ_6hpd_1	UdEJ	6hpd	10	663	1,7
UdEJ_6hpd_2	UdEJ	6hpd	10	374	1,8

Tableau 1 : Description et quantité d'ARN des échantillons de l'étude transcriptomique
Les valeurs de concentration et ratio 28S/18S sont celles calculées par le bioanalyser.

Nom du gène	N° accession	Référence
Nanos1	JQ397274.1	(Leclère 2012)
Piwi	EU199802.1	(Denker 2018)
GFP2	HQ397707.1	Fourage 2014)
Sox10	DQ138605.1	(Jager 2011)
PP1	KX496947	(Takeda 2017)
Mcoll3/4a	EU024529.1	(Denker 2008)
Antistasin	KU162955	(Ruggiero 2015)
FoxA	GBGP01000196.1	(Lapebie 2014)
Brachyury	DQ872898.1	(Momose 2007)

Tableau 2 : Nom, numéro d'accession et références des gènes déjà caractérisés observés par ISH

Nom du gène	EST	Identifiant du gène
Mouth ADAMTS	SA0AAB75YH20RM1	XLOC_000129
Serine-protease1a	SA0AAB90YL11RM1	XLOC_034427
Chymotrypsin elastase3B	IL0ABA27YL14RM1	XLOC_004103
PMP1	SA0AAB169YK18NM1	XLOC_036454
Tr-prot-serine9B	SA0AAA2YF12RM1	XLOC_001911
Tr prot-serine9A	SA0AAB16YM07RM1	XLOC_002272
Serine-protease27-like	SA0AAB26YK24RM1	XLOC_034219
LipaseA	SA0AAB115YG16RM1	XLOC_011101
CarboxypeptidaseB	SA0AAB15YK08RM1	XLOC_004604
Chitinase1	SA0AAB24YO09RM1	XLOC_015284
AMCh-like	SA0AAB8YF07RM1	XLOC_002105
Catepsin-L1	SA0AAA9YD16RM1	XLOC_006965
Rhamnospondin	SA0AAB114YB09RM1	XLOC_041151 XLOC_041155
RepSeqX	SA0AAA23YA24NM1	XLOC_028479 XLOC_028480
RepSeqY	SA0AAB100YF07NM1	XLOC_043544
Nucleostemin	SA0AAB15YK14RM1	XLOC_003046
Nuc-Prot-56	SA0AAB131YK20RM1	XLOC_043883
catalase-like	SA0AAB182YE06RM1	XLOC_044318
STmyosin-A	SA0AAB39YP06RM1	XLOC_038183
Galaxin	SA0AAA6YF04RM1	XLOC_009798+XLOC_009808
SubU-Col2	IL0ABA4YA21RM1	XLOC_030379
hedgehog1	SA0AAB115YH17RM1	XLOC_001425
Musashi	SA0AAB154YG24RM1	XLOC_035868
Myc2	SA0AAB22YN14RM1	XLOC_000985
TPM-B	SA0AAA14YL06RM1	XLOC_042542
innexin-A	SA0AAB9YJ19RM1	XLOC_013735
innexin-C	SA0AAA14YM02RM1	XLOC_044277
Fibrilin-B	IL0ABA27YF05RM1	XLOC_042418
STmyosin-B	SA0AAB97YL21RM1	XLOC_029205
TPM-A	SA0AAB82YB13RM1	XLOC_000520
SubU-Col4	SA0AAB169YA09RM1	XLOC_033869
innexin-B	SA0AAB96YB11RM1	XLOC_000135
Smoothened	SA0AAB54YE06RM1	XLOC_000028
RepSeqU	SA0AAB111YF24RM1	XLOC_000724+XLOC_000751

Tableau 3 : Noms des gènes, EST utilisées pour la synthèse des sondes et identifiants des gènes observés par ISH

Nom	XLOC	Accession si publié
Vasa	XLOC_033801	JQ397273.1
PL10	XLOC_033976	JQ397276.1
Thyn1	XLOC_041005	KU162960.1
Boule-like 1b	XLOC_030073	ALY05316.1
Poc1	XLOC_001641	HM010924.1
Mos1	XLOC_009859	FJ026395.1
Prdl-a	XLOC_030117	KU162954.1
Otp	XLOC_016543	LN611641
neurogenin	XLOC_018937	KT318150
PP1	XLOC_042761	KX496947
PP5 Rfamide	XLOC_019434	KX496951
mcol1	XLOC_044122	EU195079.1
Dkk3	XLOC_030083	EU195080
NOWA	XLOC_018627	EU195078
Prdl-b	XLOC_004378	KT318135.1
Nematogalectin A	XLOC_039010	AM753667.1
ADAMTS6-like	XLOC_002768	
EPPT	XLOC_003178	
Wnt1	XLOC_015404	EU374717 (WntX2 Momose 2008)
Wnt1b	XLOC_015382	(Condamine 2018)
Wnt2	XLOC_031686	EU374720 (WntX1A Momose 2008)
Wnt3	XLOC_001931	EU374721
Wnt4	XLOC_041060	EU374722 (WntX1B Momose 2008)
Wnt5	XLOC_000650	EU374718
Wnt5b	XLOC_030003 & XLOC_029991	(Condamine 2018)
Wnt6	XLOC_035748	EU374719 (Wnt9 Momose 2008)
Wnt7	XLOC_034538	(Condamine 2018)
Wnt8	XLOC_045775	(Condamine 2018)
Wnt11a	XLOC_002938	EU391658 (WntX3 Momose 2008)
WntA	XLOC_006909	(Condamine 2018)
Fz1	XLOC_044260	DQ869571
Fz2	XLOC_039886	JQ439004.1
Fz3	XLOC_010791	DQ869572
Fz4	XLOC_002646	JQ439005.1
TCF	XLOC_007658	JQ806376.1
beta-catenin	XLOC_011128	JQ438997.1
Axin	XLOC_011804	EU374716
Dsh	XLOC_015396	JQ439000.1
GSK-3	XLOC_016339	EU374723

Tableau 4 : Noms, identifiants et numéros d'accession des gènes présentés mais non observés par ISH

Echantillon	Nombre de reads bruts	Nombre de reads filtrés	Taux de reads conservés aprèsfiltrage (%)	Taux de reads mappés (%)
MdCA-0hpd-1	24136607	24086420	99.79	85.72
MdCA-0hpd-2	24136980	24078710	99.75	86.72
MdCA-12hpd-1	24136631	24054288	99.65	84.50
MdCA-12hpd-2	24136045	24089981	99.80	85.04
MdCA-24hpd-1	24136419	24070148	99.72	84.54
MdCA-24hpd-2	24136817	24075491	99.74	84.80
MdCA-48hpd-1	24136886	24097751	99.83	84.33
MdCA-48hpd-2	24137003	24023500	99.52	84.31
MdCA-6hpd-1	24137209	24072872	99.73	85.73
MdCA-6hpd-2	24137289	24072635	99.73	86.15
MdCA-WT-1	24136216	24088320	99.80	84.86
MdCA-WT-2	24136618	24091386	99.81	85.55
MdEJ-0hpd-1	24136354	24092058	99.81	85.70
MdEJ-0hpd-2	24136585	24088914	99.80	85.50
MdEJ-0hpd-3	24136574	24086994	99.79	86.04
MdEJ-12hpd-1	24137138	24073309	99.73	86.29
MdEJ-12hpd-2	24137493	24061078	99.68	86.48
MdEJ-24hpd-1	24136168	24100743	99.85	85.93
MdEJ-24hpd-2	24136051	24101634	99.85	85.87
MdEJ-24hpd-3	24136570	24098976	99.84	85.69
MdEJ-48hpd-1	24136888	24083843	99.78	86.15
MdEJ-48hpd-2	24136616	24088500	99.80	85.96
MdEJ-6hpd-1	24137188	24084856	99.78	86.72
MdEJ-6hpd-2	24137550	24085115	99.78	87.04
MdEJ-WT-1	24137091	24086827	99.79	85.95
MdEJ-WT-2	24137014	24092909	99.81	85.91
UdEJ-0hpd-1	24136926	24092148	99.81	85.60
UdEJ-0hpd-2	24136552	24086814	99.79	85.90
UdEJ-12hpd-1	24137320	24086760	99.79	86.42
UdEJ-12hpd-2	24135868	24085374	99.79	86.16
UdEJ-24hpd-1	24136552	24098855	99.84	85.88
UdEJ-24hpd-2	24136036	24082828	99.77	85.86
UdEJ-48hpd-1	24137197	24087127	99.79	85.79
UdEJ-48hpd-2	24136858	24088499	99.79	86.22
UdEJ-6hpd-1	24137219	24080525	99.76	86.43
UdEJ-6hpd-2	24137227	24079277	99.75	86.63

Tableau 5 : Nombre de reads et qualité par échantillon
Valeurs données par l'analyse BGI

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse constitue la première caractérisation des processus cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la réponse à la blessure suite à l'ablation du manubrium chez la méduse *Clytia.* J'ai pu confirmer le potentiel de *Clytia* en tant que modèle d'étude de la régénération et de la réponse à la blessure en général. *Clytia* est également intéressante pour étudier différents aspects de la physiologie de la méduse. Certaines questions ont pu trouver des réponses, et ainsi apporter d'autres questions. Beaucoup d'aspects n'ont pas été résolus, le but de ces travaux étant de servir de base pour les études futures.

Les espèces modèles d'étude, notamment de la régénération, sont en train de se diversifier. L'accès facilité aux ressources génomiques et transcriptomiques et le développement de protocoles utilisables sur de nombreux organismes permet de s'affranchir des organismes modèles conventionnels (souris, drosophile, *C. elegans*) qui ont des capacités de régénération restreintes comparées à celles des cnidaires ou des planaires par exemple.

> "As a result, there has been an explosion of interest in extending the set of model organisms to include both classic systems long known to be excellent models for particular areas of biology, as well as completely novel systems that have never been explored experimentally but which pose fascinating challenges for mechanistic understanding. We will refer to organisms that are models in the original sense, but not yet in the newer sense, as "non-model model organisms" (NMMO)." (Russell *et al.* 2017)

Clytia est un de ces organismes modèles non modèles, développé tout d'abord pour étudier le développement embryonnaire (Houliston *et al.* 2010). En plus de cela, les capacités de régénération du stade méduse permettent son utilisation comme modèle de la régénération. Différents aspects de la régénération peuvent être étudiés. Ils seront détaillés tout au long de la discussion.

I. Source de cellules pendant la régénération

La régénération du manubrium chez *Clytia* repose sur différentes sources de cellules. Elle dépend de prolifération locale au niveau du primordium, de prolifération à distance dans les canaux radiaires, ainsi que de migration de cellules souches (i-cells) et d'un apport de cellules différenciées (cellules gastrodermiques) venant des gonades.

De par sa plasticité, la méduse *Clytia* permet donc l'étude du recrutement et de la migration de différentes populations de cellules sur une distance relativement grande (quelques mm), en plus de l'étude du rôle des cellules souches multipotentes pendant la régénération.

La possibilité de greffer des organes après marquage de différentes populations de cellules est un outil efficace pour étudier les mouvements cellulaires lors de la régénération. La contribution de cellules en prolifération et de cellules gastrodermiques au cours de la régénération du manubrium a été identifiée par la greffe de gonade marquée respectivement à l'EdU et avec des microbilles fluorescentes. L'approche de greffe peut être utilisée également pour déterminer si

les migrations ont lieu uniquement de la gonade vers le manubrium en régénération, ou si les cellules migrent également lors de la régénération des autres organes. Les types cellulaires les plus variés et les i-cells sont regroupés dans les gonades, les bulbes tentaculaires et le manubrium de la méduse. Ces organes, distants au moins d'une centaine de µm, sont reliés par les canaux gastrovasculaires transportant les nutriments. La gonade alimente le manubrium en cellules après ablation, mais d'autres combinaisons sont possibles. Les trois organes principaux pourraient constituer des pools de cellules, et s'alimenter l'un l'autre si un des pools est manquant. Cette hypothèse est à tester par différentes combinaisons de greffes et dissections. Le gain de fonction par transgénèse est actuellement en développement dans l'équipe et permettra dans le futur un suivi des cellules beaucoup plus précis et in vivo.

Une question encore non résolue est dans quelle mesure la migration contribue à la formation du manubrium lors de la régénération. Il est possible de déterminer la contribution globale de la migration de cellules en division par une approche de d'EdU dite 'pulse-chase', en marquant les cellules en division avant dissection et en détectant les cellules ayant incorporé l'EdU au cours de la régénération. La prolifération dans le primordium commence dès 24hpd. Au vu de la répartition de la prolifération dans l'ectoderme et l'endoderme et de son ampleur, la plupart des types cellulaires formant le primordium sont probablement en prolifération. Les cellules en prolifération peuvent être identifiées en combinant marquage EdU et FISH. Une partie des cellules du manubrium régénéré vient probablement de cellules déjà présentes au centre de l'ombrelle se divisant. En effet, pendant la régénération, les fibres musculaires lisses du centre de l'ombrelle semblent s'intégrer à l'ectoderme du primordium et de nombreuses cellules de la sous-ombrelle autour du primordium sont en division. Les cellules épithéliales ectodermiques viennent donc probablement des cellules épithéliales déjà présentes au site de régénération. De même, le manubrium se forme sur un canal radiaire et l'endoderme du manubrium est en continuité avec celui des canaux. Une partie de l'endoderme du manubrium en régénération dérive donc surement de celui des canaux présents avant la régénération. Les cellules recrutées via les canaux radiaires seraient alors entre autres les cellules souches interstitielles se différenciant en cellules glandulaires, cellules nerveuses et nématocytes, et des cellules gastrodermiques. La greffe d'une gonade marquée à l'EdU suivie d'une ISH *Nanos1* a indiqué que les cellules souches représentent une petite fraction des cellules migrant de la gonade. La nature des autres cellules est encore inconnue, mais elles peuvent être identifiées par ISH. Des ovocytes sont également recrutés vers le manubrium en régénération à partir des gonades, ils sont absents du manubrium non disséqué. Une hypothèse serait qu'ils servent de source d'énergie. Le signal déclenchant la prolifération et la migration des cellules est inconnu. Un candidat présenté dans la discussion du chapitre 2 est la voie Wnt/β-caténine.

Les types cellulaires du manubrium réapparaissent de façon séquentielle au cours de la régénération. Il est possible de les suivre par ISH, le transcriptome ayant permis d'identifier des marqueurs en plus de ceux déjà connus. L'étude de la régénération chez *Clytia* forme un cadre dans lequel étudier la différenciation dans des conditions physiologiques chez l'adulte. Les i-cells sont impliquées dans la régénération et leurs dérivés somatiques caractérisés chez l'hydre (neurones, nématocytes et cellules nerveuses) suivent aussi cette différenciation séquentielle. A part les nématocytes, les dérivés somatiques des i-cells n'ont pas encore été caractérisés chez

Clytia. Il reste encore à confirmer que les cellules glandulaires et les neurones proviennent bien des i-cells.

Chez *Clytia*, comme chez les autres hydrozoaires et les planaires, la régénération dépend de cellules souches multipotentes recrutées depuis des sites distants pour former un blastème donnant naissance à la structure en régénération (voir section II.1.2 de l'Introduction générale) (Newmark & Sánchez Alvarado 2000; Bradshaw *et al.* 2015). La régénération chez *Clytia* est basée sur le même système de cellules que les autres hydrozoaires et les planaires. Celui-ci est différent de celui utilisé par les vertébrés et les arthropodes qui repose sur l'utilisation de progéniteurs spécialisés ou la dédifférenciation des cellules présentes au plan d'amputation (voir section II.1.3 de l'Introduction générale) (Odelberg 2005; Sandoval-Guzmán *et al.* 2014).

II. Physiologie de la méduse

L'étude de la régénération de la méduse *Clytia* a fourni des informations sur sa physiologie, notamment concernant la digestion. Les profils d'expression des enzymes digestives ont révélé de nombreuses populations de cellules glandulaires dans le manubrium, ainsi que des cellules glandulaires dans les gonades. Comme chez la méduse *Aglantha digitale* (Mackie 2003) la digestion n'a pas lieu uniquement dans le manubrium. Des particules non digérées sont envoyées dans les canaux et la digestion se poursuit dans les gonades. Quelques cellules isolées exprimant des enzymes de digestion ont également été observées dans les bulbes, indiquant que la digestion peut aussi être finalisée dans les bulbes.

J'ai identifié une population de cellules différenciées gastrodermiques ayant la capacité de se détacher de l'endoderme, de migrer dans les canaux et de s'intégrer dans l'endoderme de l'organe en régénération. Ces cellules peuvent être visualisées par leur pigmentation marron ou expérimentalement par leur endocytose de microbilles fluorescentes introduites dans la cavité gastrique. Elles sont présentes dans tout le système gastrovasculaire, soit au niveau de l'endoderme du manubrium, des gonades et des bulbes tentaculaires, soit en circulation dans les canaux. Ces cellules gastrodermiques deviennent particulièrement mobiles pendant la régénération mais également suite à une période de jeûne. Elles se détachent alors de l'endoderme des bulbes et des gonades et circulent rapidement dans les canaux. Elles semblent être portées par le flux dans les canaux plutôt que de migrer activement. La fonction précise de ces cellules lors de la régénération n'est pas connue. Elles pourraient contribuer à la régénération de l'endoderme et/ou fournir des ressources en énergie. La détection des billes fluorescentes dans l'endoderme du manubrium en régénération ne permet pas de distinguer entre ces possibilités. Les cellules gastrodermiques portant les billes ont pu être intégrées dans l'endoderme ou bien être phagocytées. Dans ces expériences une portion au moins des cellules provenant des autres parties de la méduse s'est probablement intégrée dans l'endoderme du manubrium, puisque des cellules marron sont visibles dans le primordium dès 48h jusqu'à la fin de la régénération, ainsi que dans le manubrium non disséqué.

Clytia serait un bon modèle pour étudier la digestion chez les cnidaires ainsi que la réponse au manque de nourriture. Suite à une période sans nourriture, la production des œufs diminue, les cellules gastrodermiques sont mobilisées et perdent leur pigmentation, et les méduses diminuent de taille. La croissance et gamétogenèse reprennent une fois les méduses nourries. Quelques organismes ont la capacité de diminuer de taille en cas de manque de nourriture, et de grandir une fois que les conditions sont favorables. Chez les invertébrés des exemples ont été observés entre autres chez les annélides, les planaires et les cnidaires. Chez l'hydre, la durée du cycle cellulaire dépend du nourrissage (Campbell 1967; Webster & Hamilton 1972; Otto & Campbell 1977b) : la durée du cycle augmente et la taille diminue quand les hydres sont peu nourries, et la prolifération augmente ensuite si elles sont bien nourries. Pendant une période sans nourriture, *Pelagia noctiluca* peut perdre jusqu'à 85% de sa masse (Lilley *et al.* 2014). Les planaires également adaptent leur taille à la disponibilité de la nourriture en croissant et décroissant en fonction (Felix *et al.* 2019). Chez l'annélide *Pristina leidy*, les gonades réduisent de taille en l'absence de nourriture et grandissent à nouveau quand la nourriture est disponible (Özpolat *et al.* 2016). Un vertébré capable du même phénomène est l'iguane marin des Galapagos *Amblyrhynchus cristatus*. Au cours des évènements ElNino qui entrainent la disparition des algues dont ils se nourrissent, les iguanes peuvent perdre jusqu'à 20% de leur taille. Ils reprennent leur croissance une fois les conditions redevenues favorables (Wikelski & Thom 2002). Il serait intéressant de déterminer si les mécanismes de contrôle de la croissance et de mobilisation des ressources énergétiques en cas de manque de nourriture sont conservés parmi les cnidaires et entre les différents phyla.

III. Réponse à la blessure

Au cours de cette étude, j'ai pu déterminer que la méduse *Clytia* présente une réponse à la blessure robuste en trois phases. Après la cicatrisation de la blessure, le remodelage de l'ombrelle restaure la forme circulaire de la méduse, puis certains des organes manquants sont régénérés. La réponse à la blessure restaure efficacement la forme méduse suite à de nombreuses coupes. Le seul échec de la restauration de la forme circulaire suit l'ablation totale de la marge. Les phases de remodelage et régénération sont définies selon l'implication de la prolifération cellulaire ou non.

A la différence des planaires, chez lesquels la phase de régénération épimorphique est mélangée avec le remodelage morphallactique (Reddien & Alvarado 2004), les trois phases se produisent de façon successive chez *Clytia*. La cicatrisation a lieu dans les deux premières heures. Le remodelage commence une fois la cicatrisation finie et est suivi par la régénération (du manubrium par exemple). Les phases de remodelage et régénération sont aussi séparées dans l'espace : le remodelage affectant l'ombrelle et la régénération concernant les organes. Le remodelage peut également agir sur les organes, entrainant par exemple la fermeture du demi-manubrium après bissection. La méduse *Clytia* est donc un modèle intéressant afin d'étudier les mécanismes cellulaires de ces trois phases chez un métazoaire non bilatérien, ainsi que les transitions entre les phases.

La cicatrisation a déjà été étudiée dans le contexte d'une blessure au niveau de l'exombrelle chez *Clytia* (Kamran *et al.* 2017). Dans cette étude-là, l'exombrelle a été choisie car elle est composée d'une seule couche de cellules. La cicatrisation a lieu par extension de lamellipodes si la lame basale est intacte ou par un mécanisme de 'purse string' si la lame basale est abimée. Les deux dépendent de la formation d'un câble d'actomyosine. La sous-ombrelle se distingue de l'exombrelle par la présence de muscles. La cicatrisation de la sous-ombrelle a été étudiée chez *Polyorchis* (hydroméduse). Lin *et al.*(2000) montrent que, suite à une blessure, les muscles striés peuvent se dédifférencier, migrer sur la blessure puis rétablir à nouveau la continuité de la couche de muscles. Les cellules musculaires de quelques hydroméduses sont connues pour migrer sur une ECM hôte (Schmid & Bally 1988). Chez *Clytia*, suite à l'ablation du manubrium, la blessure se situe à la limite entre la sous-ombrelle et l'exombrelle. La cicatrisation a probablement lieu par migration des deux couches vers la mésoglée apparente. Schmid et Tardent (1971) supposent qu'elle est due aux contractions des muscles de la sous-ombrelle ainsi qu'à l'extension de l'exombrelle sur la mésoglée. Dans tous les cas, il s'agit d'une réponse locale conduisant à la formation d'une interface entre la sous-ombrelle et l'exombrelle qui est absente dans des méduses intactes.

Le remodelage chez *Clytia* est divisé en deux phases : la réduction de la zone de coupure rétablissant la forme circulaire, et le repositionnement des organes, avec notamment la relocalisation du manubrium au centre de l'ombrelle. J'ai pu déterminer que la réduction de la zone de coupure est indépendante de la prolifération cellulaire et repose sur l'assemblage d'un câble d'actomyosine au niveau de la zone de coupure. Comme la cicatrisation, il s'agit d'une réponse locale au niveau de la blessure cicatrisée. Le signal pourrait être donné directement par l'interface entre la sous-ombrelle et exombrelle ou alors par la perte du point d'ancrage des fibres musculaires lisses. Le câble d'actomyosine entraine la disparition totale de la zone de coupure. Si une portion de marge est présente dans le fragment, elle l'entoure totalement suite à la réduction de la zone de coupure ; si le fragment ne contient pas de marge, la contraction de la zone de coupure se poursuit jusqu'à ce que le médusoïde ait une forme de cône fermé qui n'est pas viable. Ce processus permet une réponse rapide suite à une blessure, refermant après bissection une coupure de 5mm de long en moins de 12h. Les fibres musculaires lisses interrompues par la coupure se retrouvent ainsi concentrées au point de jonction des deux extrémités du canal circulaire, formant un demi-point de jonction en périphérie.

Une fois la forme circulaire rétablie les organes sont repositionnés : le manubrium entier ou en cours de régénération est relocalisé vers le milieu et les canaux radiaires et les fibres musculaires lisses retrouvent une orientation radiaire. La deuxième partie du remodelage affecte la méduse en entier et peut durer plusieurs jours. Deux hypothèses basées sur des forces de tension dans l'ombrelle peuvent expliquer ces mouvements. La méduse est une structure maintenue en tension par les muscles et la mésoglée. La tension est visible par le changement de forme immédiat suite à une incision dans l'ombrelle. La réduction de la zone de coupure semble entrainer une accumulation de forces de tension au niveau du point de jonction des deux extrémités du canal circulaire, visibles par la fragilité de cette zone. Le relâchement de ces forces de tension vers le centre de l'ombrelle pourrait causer le déplacement du manubrium vers le centre. La deuxième hypothèse suppose que les fibres musculaires radiaires du côté

opposé à la zone de coupure exercent une tension sur le manubrium et le tirent vers le centre de l'ombrelle. Dans les deux cas, le mouvement du manubrium entraine avec lui les canaux radiaires et les fibres musculaires, reformant le point de jonction des fibres musculaires lisses. Ces deux modèles pourraient être testés par des modèles mathématiques ou expérimentalement par des coupes de l'ombrelle au moment de la relocalisation du manubrium.

Comme la cicatrisation, le remodelage semble être déclenché par les interactions locales qui entrainent l'assemblage du câble d'actomyosine à la zone de coupure. La transition entre cicatrisation et régénération est potentiellement contrôlée par la voie ERK/MAPK. Les résultats d'expériences préliminaires que j'ai réalisées montrent que l'inhibition de la phosphorylation de la kinase ERK par l'UO126 ne bloque pas la cicatrisation mais empêche le remodelage suite à différentes coupes. Dans les fibroblastes humains en culture, ERK est localisé sur les fibres de stress (Hirata *et al.* 2015). ERK est phorphorylé suite à l'étirement des fibres de stress dû soit à l'activité de la myosin II, soit par étirement des cellules même quand la myosin II est inhibée. Dans des cellules en culture, l'activation de la voie ERK/MAPK dépend donc directement des forces de tension affectant la forme des cellules (Hirata *et al.* 2015). Chez *Clytia* un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans la détection de la coupure et l'assemblage du câble d'actomyosine : une coupe dans l'ombrelle induit un relâchement des tissus, ce qui pourrait entrainer la phosphorylation de ERK à la zone de coupure. Cette hypothèse peut être testée en visualisant l'activation de la kinase ERK avec l'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de ERK.

La régénération commence une fois la zone de coupure refermée et le point de jonction des fibres musculaires formé mais pas nécessairement au centre de l'ombrelle. Il s'agit d'une réponse générale de la méduse impliquant le recrutement de différents types cellulaires venant des gonades notamment. Des cellules viennent aussi potentiellement d'autres parties de la méduse (voir section I de la discussion). Le manubrium se forme systématiquement au niveau du point de jonction des fibres musculaires lisses. Comme la régénération du pharynx chez les planaires, la régénération du manubrium ne se produit pas nécessairement au niveau de la zone de coupure: la régénération a lieu à la zone de coupure dans le cas de l'ablation du manubrium, en dehors dans le cas des quarts par exemple.

Le signal déclenchant la régénération est inconnu. Chez *Nematostella*, le cytosquelette joue potentiellement un rôle dans l'initiation de la régénération. En effet, Passamaneck et al, (2012) ont montré que l'incubation dans le nocodazole d'animaux décapités empêche la régénération. Le signal de la régénération pourrait être donné par la tubuline. Le nocodazole est connu pour ses effets secondaires, notamment le changement de morphologie et du comportement de migration de neurones en différenciation chez la souris (Baudoin *et al.* 2007). DuBuc *et al.*(2014) ont également observé que la cicatrisation a lieu par accumulation d'actine et de lamellipodes rapprochant les bords de la blessure.

Contrairement à la régénération, le remodelage ne permet pas de restauration de la structure perdue. Ce mode de réponse à la blessure a probablement été sélectionné au cours de l'évolution des méduses pour sa rapidité par rapport à la régénération. La forme circulaire de l'ombrelle est

nécessaire à la nage par propulsion, qui est le mode de locomotion principal des méduses, et les méduses n'ont pas de squelette donc peu de moyens de protection contre les blessures. Des mécanismes de rétablissement rapides sont donc nécessaires. Comparé à la régénération, le cout énergétique est aussi probablement plus faible car le remodelage ne nécessite pas de prolifération (*Clytia* et *Aurelia* (cette étude ; Abrams *et al.* 2015). La restauration de la symétrie radiaire a été documentée chez quelques méduses hydrozoaires et scyphozoaires (Hargitt 1899; Schmid & Tardent 1971; Abrams *et al.* 2015) suite à une blessure.

IV. Le modèle de l'information de position de Wolpert face à la méduse *Clytia*

> "I was convinced that there must be general mechanisms for patterning during development and regeneration: that there was a general set of principles underlying the translation of genetic information into pattern and form. […] Positional information provided a general solution." (Wolpert 1996)

L'information de position est le mécanisme spécifiant la position des cellules dans un tissu, ce qui permet le passage de l'information génétique des cellules en pattern (voir section II.2. de l'Introduction générale). Ce concept a été formulé par Wolpert afin d'être un principe applicable à tous les organismes (Wolpert 1969, 1996). Sa théorie est illustrée par des exemples variés provenant de quatre phyla différents (oursin, hydroïde, insectes, membres des vertébrés) et a été appliquée aux processus de morphogenèse chez de nombreux organismes. Qu'en est-il du repatterning de l'ombrelle et de la morphogenèse du manubrium lors de la réponse à la blessure chez la méduse *Clytia* ?

IV.1. Patterning de l'ombrelle

Chez la méduse *Clytia*, nous avons déterminé que le patterning de l'ombrelle est assuré par les éléments structuraux (les muscles), comme une conséquence du processus de remodelage. Ceci est différent de la vision classique du patterning reposant souvent sur des systèmes de morphogènes. Cette vision s'est développée dès les années 1930 (Huxley & De Beer 1963), et a ensuite été renforcée par le système de réaction-diffusion de Turing (1952), et le modèle de Gierer-Meinhardt (1972). Cependant Turing avait conscience de l'influence des facteurs mécaniques sur la morphogenèse, qu'il a choisi de ne pas considérer dans l'élaboration de son modèle (Green & Sharpe 2015). L'influence de facteurs mécaniques sur la morphogenèse commence aujourd'hui à être mieux connue que lors du développement de ces modèles. Le modèle de l'information de position de Wolpert reste souvent interprété en termes de gradient de morphogènes. Cependant, la définition originale ne précise pas la nature du gradient spécifiant l'information de position (Wolpert 1969). Il peut donc être aussi bien chimique (morphogène) que physique (mécanique). De plus, Wolpert considère que les morphogènes seuls ne sont pas assez précis ni robustes en cas de perturbations pour encoder de façon fiable l'information de position (Kerszberg & Wolpert 2007).

> "A gradient in a diffusible morphogen is just one way of specifying position." (Wolpert 1989)

Le système de patterning de l'ombrelle chez la méduse *Clytia,* reposant sur des éléments structuraux, est donc compatible avec le concept d'information de position de Wolpert. Cependant, il y a trois raisons pour lesquelles ce concept pourrait ne pas s'appliquer chez *Clytia* :

- Les champs, dans lesquels les cellules ont leur position spécifiée sont souvent de petite taille (une centaine de cellules maximum chez l'hydre, les embryons au stade gastrula, les segments de larve d'insectes, les disques imaginaux de la drosophile) (Wolpert 1969). Le diamètre de la méduse *Clytia* est de plusieurs millimètres.

- Le concept de l'information de position est représenté classiquement par le modèle du drapeau français. Le système auquel il s'applique est un système linéaire. La méduse *Clytia* a une symétrie radiaire. Projetée sur un plan en deux dimensions, l'ombrelle de *Clytia* a une forme circulaire. Le seul axe pouvant être considéré comme linéaire est l'axe proximo-distal du manubrium. Des modèles circulaires ont été proposés par French *et al.* (1976) et (Tevlin & Trainor 1985) afin d'expliquer entre autres la régénération intercalaire des membres des amphibiens.

- Suite à l'amputation d'une partie de l'ombrelle, le pattern de départ n'est pas exactement rétabli. Seules la forme générale circulaire et les positions du manubrium au centre de l'ombrelle et de la marge à l'extrémité ainsi que l'orientation radiaire des muscles et des canaux sont restaurés. Le nombre original de canaux radiaires n'est pas rétabli.

Pour expliquer la position du manubrium chez *Clytia* par l'information de position de Wolpert, il faut donc adapter le modèle théorique du drapeau français (voir section II.2.1 de l'Introduction générale) à la symétrie radiaire, et également prendre en compte les particularités des réponses régénératives. Pour cela, les points de référence du système ne sont pas les deux extrémités de l'ombrelle comme dans un modèle linéaire ; mais le manubrium comme point ayant une valeur de position maximale, et la marge de l'ombrelle comme zone avec une valeur minimale. Toutes les cellules de l'ombrelle ont donc leur position spécifiée par rapport à ces deux points et forment un champ de position. Celui-ci a une orientation radiaire allant des valeurs les plus élevées du centre vers les valeurs les plus faibles à la marge. Le drapeau français devient circulaire.

Ce modèle peut-il expliquer les résultats obtenus lors des différentes coupes présentées dans le chapitre 1 ?

L'ablation du manubrium entraine la perte du point de référence central. Après ablation du manubrium et réduction de la zone de coupure, le point ayant l'information de position la plus élevée est le centre de l'ombrelle. Ce point devient le nouveau point de référence et entraine la régénération du manubrium. Selon le modèle de Wolpert, le patterning de l'ombrelle est donc rétabli par morphallaxie. L'information de position est respécifiée en fonction du nouveau point de référence central. La régénération commence uniquement si les cellules capables d'interpréter l'information de position sont présentes, celles–ci seraient apportées par les canaux.

Dans le cas des quarts de méduse, la valeur d'information de position la plus grande est localisée à l'extrémité du canal radiaire, dans la zone la plus centrale. Une fois la zone de coupure refermée, et la forme circulaire rétablie, celle-ci est localisée en périphérie de l'ombrelle. Ce point est repoussé vers le centre par la deuxième partie du remodelage. La respécification a lieu alors que le remodelage n'est pas terminé, ce qui est visible par l'initiation de la régénération du manubrium parfois très proche du canal circulaire, qui est ensuite progressivement relocalisé vers le centre. Ceci montre que l'information de position est en partie découplée du processus de remodelage.

L'information de position explique même la régénération des deux manubriums dans le cas de la coupe longitudinale. Suite à la coupe, le processus de remodelage, au lieu de rassembler les points de valeur plus élevée en un point, les rassemble en deux points distincts. Ces deux points ayant les valeurs de position élevées, sont alors entourés de points avec des valeurs inférieures. Ils sont donc interprétés par les cellules comme des points de référence de deux systèmes indépendants, ce qui déclenche la régénération de deux manubriums.

Le modèle de l'information de position explique bien la position de l'initiation de la régénération du manubrium. Même dans un système non conventionnel comme une méduse avec une symétrie radiaire, le modèle de Wolpert reste donc valide. Il fournit un cadre théorique expliquant la détermination de la position du manubrium. *Clytia* offre donc la possibilité d'étudier le patterning dans un système radiaire, différents des modèles classiques.

Le modèle circulaire de l'information de position permet uniquement la spécification de la position le long de l'axe radiaire. La position des cellules est spécifiée par rapport au centre de l'ombrelle et à la marge, et non pas par rapport aux autres cellules situées sur un même cercle. Ce système à un seul axe n'explique pas la répétition de structures selon la symétrie rotationnelle de la méduse. Un deuxième champ de position serait nécessaire pour spécifier le nombre de canaux. Or, pendant la régénération, la symétrie rotationnelle de la méduse n'est pas conservée et un tel second champ n'existe donc probablement pas. Ceci est visible par le fait que lors de la réponse à la blessure chez *Clytia*, seul le manubrium est régénéré au centre et la symétrie tétraradiaire n'est pas rétablie. D'après Hargitt, ceci est aussi valable chez d'autres méduses :

> "In the recovery of the specimens I was not able, moreover, to observe any disposition to regenerate the additional radial canals necessary to complete the symmetry of the original. This, however, does not seem to be an important matter, since there does not seem to be a special necessity for a definite number. And in this connection it may be worth while to note a very considerable variation in normal forms as to the number of radial canals." (Hargitt 1897)

Le modèle de l'information de position de Wolpert fournit un cadre théorique permettant d'interpréter les données de patterning pendant la régénération. L'information de position peut être matérialisée de différentes façons qui peuvent être un gradient de morphogènes dans les tissus, la polarité du cytosquelette d'actomyosine supra-cellulaire, ou encore la polarité des cellules.

L'information de position est visible par la disposition des fibres musculaires lors de la régénération. Le manubrium dans une méduse entière est présent au point de jonction des muscles lisses, et régénéré systématiquement à ce point. Pendant le remodelage, un point de jonction est reformé si celui-ci est absent, ou le point de jonction localisé en périphérie est déplacé au centre de l'ombrelle. Les deux processus de remodelage participent à la formation du point de jonction : la fermeture de la zone de coupure concentre les fibres interrompues en un point unique au bord de l'ombrelle, puis ce point est relocalisé au centre formant un point de jonction complet. On ne sait pas si les fibres musculaires seules sont suffisantes pour initier la régénération, ou si elles sont le reflet d'autres mécanismes de patterning. Chez les cnidaires, les cellules myoépithéliales sont multifonctionnelles. Une fonction de patterning n'est donc pas si surprenante. Chez l'hydre, elles sont connues pour jouer un rôle direct dans le patterning (Livshits *et al.* 2017). Chez *Clytia*, nous n'avons pas déterminé si les muscles influencent directement le patterning de l'ombrelle ou si leur orientation est gouvernée par le même système positionnant le manubrium pendant la régénération.

La spécification de l'information de position entre le centre et la marge pourrait être expliquée par le modèle classique du gradient de morphogène. Chez les acoeles et les planaires, les cellules musculaires sont également responsables de la détermination de l'information de position par l'expression de PCG (Witchley *et al.* 2013; Raz *et al.* 2017). Les cellules myoépithéliales de *Clytia* pourraient coder pour des PCG. Chez les cnidaires, certains gènes ont une expression régionalisée selon l'un des axes du corps, et entrainant un défaut de patterning après perturbation. Ils remplissent les critères des PCG des planaires. Par exemple les ligands Wnt correspondent à cette définition et sont exprimés dans les cellules myoépithéliales chez l'hydre. Une base de données l'hydratlas répertorie l'expression des gènes chez l'hydre en fonction des zones AP du corps (Wenger *et al.* 2019). Elle peut servir à identifier des PCG d'une façon non biaisée. En croisant ces données avec celles de séquençage en cellules uniques (Siebert *et al.* 2018) il est possible de savoir si les PCG potentiels sont bien exprimés dans des cellules musculaires. Avec l'augmentation de l'utilisation du séquençage de cellules uniques il sera possible de savoir si les cellules musculaires d'autres phyla expriment un set de gènes conservés impliqués dans le patterning, et ainsi valider ou non l'hypothèse de Raz et al (2017), postulant qu'une des fonctions ancestrales des cellules musculaires chez l'ancêtre des bilatériens serait la détermination de l'information de position. Des données chez les cnidaires permettraient en plus d'étendre le modèle à l'ancêtre des bilatériens et des cnidaires.

L'hypothèse de l'expression de PCG dans les muscles de *Clytia* reste à considérer, cependant nous n'avons pas d'évidence de la présence d'un gradient de morphogène dans l'ombrelle. Nos données vont jusque-là plutôt à l'encontre d'un patterning gouverné par les morphogènes. En effet, le manubrium peut se former à n'importe quelle position dans l'ombrelle, même à proximité de la marge, indiquant une absence d'inhibition de la marge. De plus, la greffe d'un manubrium n'inhibe pas la régénération du manubrium et deux manubriums peuvent se former en même temps très proches, indiquant une absence d'inhibition venant du manubrium.

L'orientation des fibres musculaires pourrait être le reflet de la polarisation des cellules par le mécanisme de 'planar cell polarity'. Celle-ci a un rôle bien caractérisé dans la détermination de l'orientation de groupes de cellules, visible par exemple par l'orientation des cils dans la même direction sur un épithélium. Elle est due à la localisation asymétrique dans les cellules des composants de la voie Wnt/PCP (review (Zallen 2007; Vladar *et al.* 2009; Gray *et al.* 2011)).

La voie Wnt/PCP a été caractérisée chez la larve de *Clytia* et est responsable de l'alignement des cellules épithéliales ciliées le long de l'axe oral-aboral dans la larve (Momose *et al.* 2012). Le rôle de la voie Wnt/PCP n'a pas été exploré chez l'adulte. Dans ce cas-là, les muscles ne seraient pas responsables de la position du manubrium. La localisation du manubrium au niveau du point de jonction des fibres musculaires serait une corrélation.

L'information donnée par les muscles pourrait être mécanique. Le rôle mécanique des muscles dans le patterning a été montré chez l'hydre : les muscles assurent la conservation de l'axe primaire entre l'hydre 'parent' et l'hydre régénérée à partir d'un fragment issu du 'parent' (voir section II.2.2 de l'Introduction générale) (Livshits *et al.* 2017). Chez la méduse *Clytia*, le cytosquelette d'actomyosine exerce des tensions dans les tissus, qui pourraient être traduites en information de position selon l'axe radiaire. Des forces de tension différentielles pourraient donner une polarité aux fibres musculaires et ainsi entrainer la croissance des canaux et la migration de cellules systématiquement vers le centre de l'ombrelle. Une fois au centre, un signal localisé au niveau du point de jonction pourrait entrainer la différenciation du canal en primordium et recruter les cellules nécessaires à la régénération.

IV.2. Patterning du manubrium

Le manubrium est régionalisé selon l'axe oral-aboral, ce qui est visible par sa structure et la distribution des types cellulaires. Le concept d'information de position pourrait s'appliquer à cet axe et contrôler le patterning via la différenciation des cellules. Contrairement à celui présent dans l'ombrelle, il y a de fortes chances pour que le champ d'information de position soit spécifié par un gradient de morphogènes. En effet, d'après les données transcriptomiques, la voie Wnt/β-caténine est probablement impliquée dans la morphogenèse du manubrium. Des études fonctionnelles restent à réaliser afin de prouver son implication (voir discussion du chapitre 2).

Comme la symétrie globale de la méduse, la symétrie tétraradiaire du manubrium n'est pas nécessairement conservée lors de la régénération. Certains des manubriums régénérés présentent une géométrie tri- ou biradiée. La géométrie du manubrium n'est donc pas expliquée par l'information de position. Ceci reste en cohérence avec la présence d'une information de position le long de l'axe oral-aboral puisque celle-ci détermine uniquement les positions par rapport à la base et à l'extrémité orale du manubrium, et non pas la symétrie rotationnelle du manubrium.

Nous avons démontré que la géométrie du manubrium est déterminée par le nombre de canaux radiaires. En effet, en continuité de chaque canal radiaire se trouve une arête de la colonne du manubrium, ainsi qu'un lobe à son extrémité. Une hypothèse intéressante, encore à tester, serait que les muscles localisés sur les canaux radiaires, et non les canaux radiaires en eux-mêmes, soient responsables de la symétrie du manubrium régénéré. Les muscles de la sous-ombrelle et ceux de l'ectoderme du primordium sont en continuité jusqu'à l'extrémité orale du manubrium. Nous avons pu observer une différence, dès les premiers stades de régénération du manubrium (48hpd), entre les muscles présents sur les canaux et ceux présents sur le reste de la sous-ombrelle, en bordure du primordium : les muscles recouvrant les canaux sont en continuité directe avec ceux du primordium ; tandis que ceux recouvrant la sous-ombrelle forment un

angle avant de s'intégrer au primordium, cet angle étant dû au fait que le primordium est légèrement bombé. On pourrait envisager que cette différence d'angle des muscles en bordure de primordium puisse générer des tensions différentes dans le primordium et notamment des tensions supérieures dans l'épithélium en continuité avec les canaux. Au cours de la croissance du primordium la tension serait plus forte dans ces zones-là que dans les tissus contenant les fibres raccordées avec celles de la sous-ombrelle, ce qui entrainerait la formation des quatre arêtes surmontées par les lobes. On peut d'ailleurs noter que la myosin stMyo-A est exprimée dans le manubrium préférentiellement au niveau des arêtes (voir fig.67), tandis que les cellules souches, les nématocytes et certaines cellules glandulaires sont localisés préférentiellement dans l'ectoderme et l'endoderme au niveau des poches gastriques, soit entre les arêtes. L'hypothèse de la mise en place de la symétrie contrôlée par les muscles au cours de la morphogenèse du manubrium implique donc que ceux-ci contrôleraient également l'installation et la différenciation des différents types cellulaires du manubrium. Cette hypothèse pourrait être testée par des inhibiteurs de contraction musculaire durant les phases précoces de morphogenèse du manubrium et par des expériences de dissection des muscles autour du primordium, ainsi que validée par un modèle mathématique.

Les données obtenues lors de cette thèse laissent penser que la morphogenèse du manubrium pourrait être contrôlée par les forces de tension des muscles et la voie Wnt/β-caténine ; les muscles formant la structure tétraradiaire, et la voie Wnt/β-caténine assurant le patterning AP du manubrium. Les fibres musculaires jouent également un rôle dans le patterning de l'ombrelle, ou sont sous le contrôle du système déterminant la position du manubrium. Chez l'hydre, le patterning de l'axe oral-aboral est gouverné par la voie de signalisation Wnt/β-caténine, induisant la formation de l'hypostome au pôle oral (Broun 2005; Gee *et al.* 2010). L'action mécanique du cytosquelette d'actomyosine a également été démontrée (Livshits *et al.* 2017), fournissant une vision du patterning différente de la vision classique par gradient de morphogènes. La méduse *Clytia* a le potentiel de permettre, en complément de l'hydre, d'étudier l'intégration entre les informations structurales et les voies de signalisation dans le patterning, chez un animal ayant une plus grande complexité anatomique.

Bibliographie

Abrams MJ, Basinger T, Yuan W, Guo C-L & Goentoro L 2015 Self-repairing symmetry in jellyfish through mechanically driven reorganization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112** E3365–E3373. (doi:10.1073/pnas.1502497112)

Achermann J & Sugiyama T 1985 Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. X. Morphogenetic potentials of a regeneration-deficient strain (reg-16). *Developmental Biology* **107** 13–27. (doi:10.1016/0012-1606(85)90371-9)

Adell T, Salo E, Boutros M & Bartscherer K 2009 Smed-Evi/Wntless is required for β-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development* **136** 905–910. (doi:10.1242/dev.033761)

Adell T, Cebrià F, Saló E & Strutt D 2010 Gradients in Planarian Regeneration and Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2** a000505. (doi:10.1101/cshperspect.a000505)

Agata K, Tanaka T, Kobayashi C, Kato K & Saitoh Y 2003 Intercalary regeneration in planarians. *Developmental Dynamics* **226** 308–316. (doi:10.1002/dvdy.10249)

Agata K, Saito Y & Nakajima E 2007 Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Development Growth and Differentiation* **49** 73–78. (doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00919.x)

Akimenko MA, Marí-Beffa M, Becerra J & Géraudie J 2003 Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics* **226** 190–201. (doi:10.1002/dvdy.10248)

Alder H & Schmid V 1987 Cell cycles and in vitro transdifferentiation and regeneration of isolated, striated muscle of jellyfish. *Developmental Biology* **124** 358–369. (doi:10.1016/0012-1606(87)90488-X)

Alessandra S & Rossi L 2019 Stem Cells Heterogeneity - Novel Concepts. *Advances in Experimental Medecine and Biology* **1123** 39–54. (doi:10.1007/978-3-030-11096-3)

Alibardi L & Toni M 2005 Wound keratins in the regenerating epidermis of lizard suggest that the wound reaction is similar in the tail and limb. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* **303** 845–860. (doi:10.1002/jez.a.213)

Alié A, Hiebert LS, Simion P, Scelzo M, Prünster MM, Lotito S, Delsuc F, Douzery EJP, Dantec C, Lemaire P *et al.* 2018 Convergent acquisition of nonembryonic development in styelid ascidians. *Molecular Biology and Evolution* **35** 1728–1743. (doi:10.1093/molbev/msy068)

Allman GJ 1871 *A Monograph of the Gymnoblastic or Tubularian Hydroids: In Two Parts. The Hydoida in General*. London: Ray Society.

Alwes F, Enjolras C & Averof M 2016 Live imaging reveals the progenitors and cell dynamics of limb regeneration. *ELife* **5** 1–18. (doi:10.7554/eLife.19766)

Amiel A & Houliston E 2009 Three distinct RNA localization mechanisms contribute to oocyte polarity establishment in the cnidarian Clytia hemisphærica. *Developmental Biology* **327** 191–203. (doi:10.1016/j.ydbio.2008.12.007)

Amiel A, Leclère L, Robert L, Chevalier S & Houliston E 2009 Conserved Functions for Mos in Eumetazoan Oocyte Maturation Revealed by Studies in a Cnidarian. *Current Biology* **19** 305–311. (doi:10.1016/j.cub.2008.12.054)

Amiel A, Chang P, Momose T & Houliston E 2010 Clytia hemisphaerica: A Cnidarian Model for Studying Oogenesis. In *Oogenesis: The Universal Process*, 1st ed, pp 81–101. Wiley-Blackwell. (doi:10.1002/9780470687970.ch3)

Amiel AR, Johnston HT, Nedoncelle K, Warner JF, Ferreira S & Röttinger E 2015 Characterization of morphological and cellular events underlying oral regeneration in the sea anemone, Nematostella vectensis. *International Journal of Molecular Sciences* **16** 28449–28471. (doi:10.3390/ijms161226100)

Anctil M 2009 Chemical transmission in the sea anemone Nematostella vectensis: A genomic perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* **4** 268–289. (doi:10.1016/j.cbd.2009.07.001)

Anderson DT 1996 *Atlas of Invertebrate Anatomy*. Sydney: UNSW Press.

Anderson PA V, Moosler A & Grimmelikhuijzen CJP 1992 The presence and distribution of Antho-RFamide-like material in scyphomedusae. *Cell and Tissue Research* **267** 67–74.

Antunes M, Pereira T, Cordeiro J V., Almeida L & Jacinto A 2013 Coordinated waves of actomyosin flow and apical cell constriction immediately after wounding. *Journal of Cell Biology* **202** 365–379. (doi:10.1083/jcb.201211039)

Appeltans W, Ahyong ST, Anderson G, Angel M V., Artois T, Bailly N, Bamber R, Barber A, Bartsch I, Berta A *et al.* 2012 The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* **22** 2189–2202. (doi:10.1016/j.cub.2012.09.036)

Arendt D 2008 The evolution of cell types in animals: Emerging principles from molecular studies. *Nature Reviews Genetics* **9** 868–882. (doi:10.1038/nrg2416)

Arvizu F, Aguilera A & Salgado LM 2006 Activities of the protein kinases STK, PI3K, MEK, and ERK are required for the development of the head organizer in Hydra magnipapillata. *Differentiation* **74** 305–312. (doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00078.x)

Augustin R, Franke A, Khalturin K, Kiko R, Siebert S, Hemmrich G & Bosch TCG 2006 Dickkopf related genes are components of the positional value gradient in Hydra. *Developmental Biology* **296** 62–70. (doi:10.1016/j.ydbio.2006.04.003)

Baader CD, Schuchert P, Schmid V, Heiermann R & Plickert G 1995 Temporally and spatially restricted expression of a gland cell gene during regeneration and in vitro transdifferentiation in the hydrozoan Podocoryne carnea. *Roux's Archives of Developmental Biology* **204** 164–171. (doi:10.1007/BF00241268)

Balasubramanian PG, Beckmann A, Warnken U, Schnölzer M, Schüler A, Bornberg-Bauer E, Holstein TW & Özbek S 2012 Proteome of Hydra nematocyst. *Journal of Biological Chemistry* **287** 9672–9681. (doi:10.1074/jbc.M111.328203)

Bardeen CR & Baetjer FH 1904 The inhibitive action of the Roentgen rays on regeneration in planarians. *Journal of Experimental Zoology* **1** 191–195. (doi:10.1002/jez.1400010107)

Baudoin JP, Alvarez C, Gaspar P & Métin C 2007 Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Developmental Neuroscience* **30** 132–143. (doi:10.1159/000109858)

Baumgarten S, Simakov O, Esherick LY, Liew YJ, Lehnert EM, Michell CT, Li Y, Hambleton EA, Guse A, Oates ME *et al.* 2015 The genome of *Aiptasia* , a sea anemone model for coral symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112** 11893–11898. (doi:10.1073/pnas.1513318112)

Bellantuono AJ, Bridge D & Martínez DE 2015 Hydra as a tractable, long-lived model system for senescence. *Invertebrate Reproduction and Development* **59** 39–44. (doi:10.1080/07924259.2014.938196)

Beloussov L V. 2008 Mechanically based generative laws of morphogenesis. *Physical Biology* **5** 015009. (doi:10.1088/1478-3975/5/1/015009)

Bely AE 1999 Decoupling of fission and regenerative capabilities in an asexual oligochaete. *Hydrobiologia* **406** 243–251. (doi:10.1023/A:1003763915697)

Bely AE 2006 Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integrative and Comparative Biology* **46** 508–518. (doi:10.1093/icb/icj051)

Bely AE & Nyberg KG 2010 Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in Ecology & Evolution* **25** 161–170. (doi:10.1016/j.tree.2009.08.005)

Bely AE & Sikes JM 2010 Acoel and platyhelminth models for stem-cell research. *Journal of Biology* **9** 2–5. (doi:10.1186/jbiol223)

Bely AE & Wray GA 2001 Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression. *Development (Cambridge, England)* **128** 2781–2791.

Benink HA & Bement WM 2005 Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *Journal of Cell Biology* **168** 429–439. (doi:10.1083/jcb.200411109)

Bergantiños C, Vilana X, Corominas M & Serras F 2010 Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *BioEssays* **32** 207–217. (doi:10.1002/bies.200900105)

Bielen H, Oberleitner S, Marcellini S, Gee L, Lemaire P, Bode HR, Rupp R & Technau U 2007 Divergent functions of two ancient Hydra Brachyury paralogues suggest specific roles for their C-terminal domains in tissue fate induction. *Development* **134** 4187–4197. (doi:10.1242/dev.010173)

Bode HR 1996 The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *Journal of Cell Science* **109** 1155–1164.

Bode HR 2003 Head regeneration in Hydra. *Developmental Dynamics* **226** 225–236. (doi:10.1002/dvdy.10225)

Bode HR 2012 The head organizer in Hydra. *International Journal of Developmental Biology* **56** 473–478. (doi:10.1387/ijdb.113448hb)

Bode PM & Bode HR 1980 Formation of pattern in regenerating tissue pieces of Hydra attenuata. I. Head-body proportion regulation. *Developmental Biology* **78** 484–496. (doi:10.1016/0012-1606(80)90348-6)

Bode H, Berking S, David CN, Gierer A, Schaller H & Trenkner E 1973 Quantitative analysis of cell types during growth and morphogenesis in Hydra. *Wilhelm Roux Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen* **171** 269–285. (doi:10.1007/BF00577725)

Bode HR, Heimfeld S, Chow MA & Huang LW 1987 Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in Hydra attenuata. *Developmental Biology* **122** 577–585. (doi:10.1016/0012-1606(87)90321-6)

Bodo F & Bouillon J 1968 Etude histologique du développement embryonnaire de quelques hydroméduses de Roscoff: Phialidium Hemisphaericum (L.), Obélia SP. Péron et Lesueur, Sarsia Eximia (Allman), Podocoryne Carnea (Sars), Gonionemus Vertens Agassiz. 69–104.

Boero F, Gravili C, Pagliara P, Piraino S, Bouillon J & Schmid V 1998 The cnidarian premises of metazoan evolution: From triploblasty, to coelom formation, to metamery. *Italian Journal of Zoology* **65** 5–9. (doi:10.1080/11250009809386722)

Bosch TCG 2007 Why polyps regenerate and we don't: Towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Developmental Biology* **303** 421–433. (doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.012)

Bosch TCG 2012 What Hydra has to say about the role and origin of symbiotic interactions. *Biological Bulletin* **223** 78–84. (doi:10.1086/BBLv223n1p78)

Bosch TCG 2014 Rethinking the role of immunity: Lessons from Hydra. *Trends in Immunology* **35** 495–502. (doi:10.1016/j.it.2014.07.008)

Bosch TCG & David CN 1987 Stem cells of Hydra magnipapillata can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Developmental Biology* **121** 182–191. (doi:10.1016/0012-1606(87)90151-5)

Bosch TCG, Anton-Erxleben F, Hemmrich G & Khalturin K 2010 The hydra polyp: Nothing but an active stem cell community. *Development Growth and Differentiation* **52** 15–25. (doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01143.x)

Bossert PE, Dunn MP & Thomsen GH 2013 A staging system for the regeneration of a polyp from the aboral physa of the anthozoan Cnidarian Nematostella vectensis. *Developmental Dynamics* **242** 1320–1331. (doi:10.1002/dvdy.24021)

Bouillon J 1956 Etude monographique du genre Limnocnida (limnomeduse). *Annales de La Société Royale Zoologique de Belgique* **87** 252–500.

Bouillon J 1966 Les cellules glandulaires des hydroPides et des hydroméduses. Leur structure et la nature de leurs sécrétions. *Cahiers de Biologie Marine* **VII** 157–205.

Bouillon J 1968 Introduction to Coelenterates. In *Chemical Zoology V2: Porifera, Coelenterate, and Platyhelminthes*. New York: Academic Press.

Boyle MJ & Seaver EC 2008 Developmental expression of foxA and gata genes during gut formation in the polychaete annelid, Capitella sp. I. *Evolution and Development* **10** 89–105. (doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00216.x)

Bradshaw B, Thompson K & Frank U 2015 Distinct mechanisms underlie oral vs aboral regeneration in the cnidarian Hydractinia echinata. *ELife* **2015** 1–19. (doi:10.7554/eLife.05506)

Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, DeSalle R & Buss LW 1992 Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89** 8750–8753.

(doi:10.1073/pnas.89.18.8750)
Bridge D, Cunningham CW, DeSalle R & Buss LW 1995 Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria: Molecular and Morphological Evidence. *Molecular Biology and Evolution* **12** 679–689.
Brockes JP & Kumar A 2003 Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *On Growth, Form and Computers* **3** 92–106. (doi:10.1016/B978-012428765-5/50038-4)
Brockes JP & Kumar A 2008 Comparative aspects of animal regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24** 525–549. (doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175336)
Brockes JP, Kumar A & Velloso CP 2001 Regeneration as an evolutionary variable. *Journal of Anatomy* **199** 3–11. (doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19910003.x)
Broun M 2005 Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* **132** 2907–2916. (doi:10.1242/dev.01848)
Broun M & Bode HR 2002 Charcaterization of the head organzer in hydra. *Development* **129** 875–884.
Brown FD, Keeling EL, Le AD & Swalla BJ 2009 Whole body regeneration in a colonial ascidian, Botrylloides violaceus. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **312** 885–900. (doi:10.1002/jez.b.21303)
Browne EN 1909 The production of new hydranths in Hydra by the insertion of small grafts. *Journal of Experimental Zoology* **7** 1–23. (doi:10.1002/jez.1400070102)
Brusca RC 2016 *Invertebrates*. Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates Inc., U.S.
Buckingham M & Rigby PWJ 2014 Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Developmental Cell* **28** 225–238. (doi:10.1016/j.devcel.2013.12.020)
Burton PM & Finnerty JR 2009 Conserved and novel gene expression between regeneration and asexual fission in Nematostella vectensis. *Development Genes and Evolution* **219** 79–87. (doi:10.1007/s00427-009-0271-2)
Buzgariu W, Al Haddad S, Tomczyk S, Wenger Y & Galliot B 2015 Multi-functionality and plasticity characterize epithelial cells in Hydra. *Tissue Barriers* **3** 1–13. (doi:10.1080/21688370.2015.1068908)
Buzgariu W, Wenger Y, Tcaciuc N, Catunda-Lemos AP & Galliot B 2018 Impact of cycling cells and cell cycle regulation on Hydra regeneration. *Developmental Biology* **433** 240–253. (doi:10.1016/j.ydbio.2017.11.003)
Byrum CA 2001 An analysis of hydrozoan gastrulation by unipolar ingression. *Developmental Biology* **240** 627–640. (doi:10.1006/dbio.2001.0484)
Campbell RD 1967 Tissue dynamics of steady state growth in Hydra littoralis. I. Patterns of cell division. *Developmental Biology* **15** 487–502. (doi:10.1016/0012-1606(67)90039-5)
Campbell RD 1974 Cell movements in Hydra. *American Zoologist* **14** 523–535. (doi:10.1093/icb/14.2.523)
Campbell LJ & Crews CM 2008 Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair: Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65** 73–79. (doi:10.1007/s00018-007-7433-z)
Carnevali MC 2006 Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. *Invertebrate Survival Journal* **3** 64–76.
Carré D & Carré C 2000 Origin of germ cells, sex determination, and sex inversion in medusae of the genus Clytia (hydrozoa, leptomedusae): The influence of temperature. *Journal of Experimental Zoology* **287** 233–242. (doi:10.1002/1097-010X(20000801)287:3<233::AID-JEZ5>3.3.CO;2-6)
Cartwright P, Halgedahl SL, Hendricks JR, Jarrard RD, Marques AC, Collins AG & Lieberman BS 2007 Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambria. *PLoS ONE* **2** 1–7. (doi:10.1371/journal.pone.0001121)
Chang ES, Neuhof M, Rubinstein ND, Diamant A, Philippe H, Huchon D & Cartwright P 2015 Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112** 14912–14917. (doi:10.1073/pnas.1511468112)
Chapman DM 1999 Microanatomy of the bell rim of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). *Canadian Journal of Zoology* **77** 34–46. (doi:10.1139/z98-193)
Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, Balasubramanian PG, Borman J, Busam D *et al.* 2010 The dynamic genome of Hydra. *Nature* **464** 592–596. (doi:10.1038/nature08830)
Chen J, Jacox LA, Saldanha F & Sive H 2017 Mouth development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **6** 1–16. (doi:10.1002/wdev.275)
Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, Martinou JC & Galliot B 2009 Apoptotic Cells Provide an Unexpected Source of Wnt3 Signaling to Drive Hydra Head Regeneration, supplementary data. *Developmental Cell* **17** 279–289. (doi:10.1016/j.devcel.2009.07.014)
Clarkson SG 1969 Nucleic acid and protein synthesis and pattern regulation in hydra. II. Effect of inhibition of nucleic acid and protein synthesis on hypostome formation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **21** 55–70.
Colasanti M, Mazzone V, Mancinelli L, Leone S & Venturini G 2009 Involvement of nitric oxide in the head regeneration of Hydra vulgaris. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **21** 164–170. (doi:10.1016/j.niox.2009.07.003)
Collins AG 2002 Phylogeny of Medosozoa and the evolution of the cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* **15** 418–432. (doi:10.1046/j.1420-9101.2002.00403.x)
Collins A, Schuchert P, Marques A, Jankowski T, Medina M & Schierwater B 2006 Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* **55** 97–115. (doi:10.1080/10635150500433615)
Conacci-Sorrell M, McFerrin L & Eisenman RN 2014 An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **4** a014357. (doi:10.1101/cshperspect.a014357)
Condamine T 2018 Étude comparative d ' expression de gènes chez un scyphozoaire (Aurelia aurita) et un hydrozoaire (Clytia hemisphaerica) : nouvelles perspectives sur certaines innovations évolutives qui caractérisent leurs stades

méduse.
Connell LE 2006 Myosin light chain kinase plays a role in the regulation of epithelial cell survival. *Journal of Cell Science* **119** 2269–2281. (doi:10.1242/jcs.02926)
Coonfield BR 1936 Regeneration in Mnemiopsis Leidy, Agassiz. *Biological Bulletin* **71** 421–428.
Cordeiro J V. & Jacinto A 2013 The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14** 249–262. (doi:10.1038/nrm3541)
Coste A, Jager M, Chambon JP & Manuel M 2016 Comparative study of Hippo pathway genes in cellular conveyor belts of a ctenophore and a cnidarian. *EvoDevo* **7** 1–19. (doi:10.1186/s13227-016-0041-y)
Crawford K & Stocum DL 1988 Retinoic acid coordinately proximalizes regenerate pattern and blastema differential affinity in axolotl limbs. *Development* **102** 687–698.
Cummings SG & Bode HR 1984 Head Regeneration and Polarity Reversal in Hydra-Attenuata Can Occur in the Absence of DNA-Synthesis. *Wilhelm Rouxs Archives of Developmental Biology* **194** 79–86.
Cutie S, Hoang AT, Payumo AY, Huang GN, Francisco S, Francisco CS & Francisco S 2017 Unconventional Functions of Muscles in Planarian Regeneration. *Developmental Cell* **43** 657–658. (doi:10.1016/j.devcel.2017.12.006)
Czarkwiani A, Ferrario C, Dylus DV, Sugni M & Oliveri P 2016 Skeletal regeneration in the brittle star Amphiura filiformis. *Frontiers in Zoology* **13** 1–17. (doi:10.1186/s12983-016-0149-x)
Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collins AG, Dawson MN, Fautin DG, France SC, Mcfadden CS, Opresko DM, Rodriguez E *et al.* 2007 The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. In: Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A. (Eds) Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. *Zootaxa* **1668** 127–182. (doi:10.1016/j.biopsych.2005.09.016)
David CN 1973 A quantitative method for maceration of Hyra tissue. *Wilhelm Roux Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen* **171** 259–268. (doi:10.1007/BF00577724)
David CN & Campbell RD 1972 Cell cycle kinetics and development of Hydra attenuata. I. Epithelial cells. *Journal of Cell Science* **11** 557–568.
David CN & Campbell RD 1974 Cell cycle kinetics and development of Hydra attenuata. II. Interstitial cells. *Journal of Cell Science* **16** 349–358.
David CN & Gierer A 1974 Cell Cycle Kinetics and Development of Hydra attenuata III. Nerve and nematocyte differentiation. *Journal of Cell Science* **375** 359–375.
David CN & Plotnick I 1980 Distribution of interstitial stem cells in Hydra. *Developmental Biology* **76** 175–184. (doi:10.1016/0012-1606(80)90370-X)
Davis LE 1974 Ultrastructural studies of the development of nerves in hydra. *Integrative and Comparative Biology* **14** 551–573. (doi:10.1093/icb/14.2.551)
Delgado I & Torres M 2017 Coordination of limb development by crosstalk among axial patterning pathways. *Developmental Biology* **429** 382–386. (doi:10.1016/j.ydbio.2017.03.006)
Denker E, Manuel M, Leclère L, Le Guyader H & Rabet N 2008 Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of Clytia hemisphaerica (Hydrozoa, Cnidaria). *Developmental Biologyology* **315** 99–113. (doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.023)
Desprat N, Supatto W, Pouille PA, Beaurepaire E & Farge E 2008 Tissue Deformation Modulates Twist Expression to Determine Anterior Midgut Differentiation in Drosophila Embryos. *Developmental Cell* **15** 470–477. (doi:10.1016/j.devcel.2008.07.009)
DuBuc TQ, Traylor-Knowles N & Martindale MQ 2014 Initiating a regenerative response; cellular and molecular features of wound healing in the cnidarian Nematostella vectensis. *BMC Biology* **12** 1–20. (doi:10.1186/1741-7007-12-24)
Duffy DJ, Plickert G, Kuenzel T, Tilmann W & Frank U 2010 Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in Hydractinia metamorphosis and regeneration. *Development* **137** 3057–3066. (doi:10.1242/dev.046631)
Dunn CW, Giribet G, Edgecombe GD & Hejnol A 2014 Animal Phylogeny and its Evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **45** 371–395. (doi:10.1146/annurev-ecolsys-120213-091627)
Echeverri K, Clarke JDW & Tanaka EM 2001 In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema. *Developmental Biology* **236** 151–164. (doi:10.1006/dbio.2001.0312)
Edgecombe GD, Giribet G, Dunn CW, Hejnol A, Kristensen RM, Neves RC, Rouse GW, Worsaae K & Sørensen M V. 2011 Higher-level metazoan relationships: Recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity and Evolution* **11** 151–172. (doi:10.1007/s13127-011-0044-4)
Egger B, Gschwentner R & Rieger R 2007 Free-living flatworms under the knife: Past and present. *Development Genes and Evolution* **217** 89–104. (doi:10.1007/s00427-006-0120-5)
Egger B, Steinke D, Tarui H, De Mulder K, Arendt D, Borgonie G, Funayama N, Gschwentner R, Hartenstein V, Hobmayer B *et al.* 2009 To be or not to be a flatworm: The Acoel controversy. *PLoS ONE* **4** 1–10. (doi:10.1371/journal.pone.0005502)
Eichinger JM & Satterlie RA 2014 Organization of the ectodermal nervous structures in medusae: Cubomedusae. *Biological Bulletin* **226** 41–55. (doi:10.1086/BBLv226n1p41)
Eilers M & Eisenman RN 2008 Myc's broad reach. *Genes and Development* **22** 2755–2766. (doi:10.1101/gad.1712408.Freely)
Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T & Roers A 2009 Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20** 517–527. (doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.009)
Endo T, Yokoyama H, Tamura K & Ide H 1997 Expression in Developing and Regenerating Limb Buds of. *Developmental Dynamics* **232** 227–232.
Fausto N, Campbell JS & Riehle KJ 2006 Liver Regeneration. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* 113–123.

(doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00007-2)
Favata M, Horiuchi K, Manos E, Daulerio A, Stradley D, Feeser W, Van Dyk D, Pitts W, Earl R, Hobbs F *et al.* 1998 Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273** 18623–18632.
Fei JF, Schuez M, Tazaki A, Taniguchi Y, Roensch K & Tanaka EM 2014 CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem Cell Reports* **3** 444–459. (doi:10.1016/j.stemcr.2014.06.018)
Felix DA, Gutiérrez-Gutiérrez Ó, Espada L, Thems A & González-Estévez C 2019 It is not all about regeneration: Planarians striking power to stand starvation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **87** 169–181. (doi:10.1016/j.semcdb.2018.04.010)
Finnerty JR, Pang K, Burton P, Paulson D & Martindale MQ 2004 Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science* **304** 1335–1337. (doi:10.1126/science.1091946)
Fischer AHL, Mozzherin D, Eren AM, Lans KD, Wilson N, Cosentino C & Smith J 2014 SeaBase: A multispecies transcriptomic resource and platform for gene network inference. *Integrative and Comparative Biology* **54** 250–263. (doi:10.1093/icb/icu065)
Flici H, Schnitzler CE, Millane RC, Govinden G, Houlihan A, Boomkamp SD, Shen S, Baxevanis AD & Frank U 2017 An Evolutionarily Conserved SoxB-Hdac2 Crosstalk Regulates Neurogenesis in a Cnidarian. *Cell Reports* **18** 1395–1409. (doi:10.1016/j.celrep.2017.01.019)
Flowers GP, Timberlake AT, Mclean KC, Monaghan JR & Crews CM 2014 Highly efficient targeted mutagenesis in axolotl using Cas9 RNA-guided nuclease. *Development* **141** 2165–2171. (doi:10.1242/dev.105072)
Forsthoefel DJ, Park AE & Newmark PA 2011 Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine. *Developmental Biology* **356** 445–459. (doi:10.1016/j.ydbio.2011.05.669)
Fourrage C, Chevalier S & Houliston E 2010 A highly conserved poc1 protein characterized in embryos of the hydrozoan Clytia hemisphaerica: Localization and functional studies. *PLoS ONE* **5** e13994. (doi:10.1371/journal.pone.0013994)
Fourrage C, Swann K, Garcia JRG, Campbell AK & Houliston E 2014 An endogenous green fluorescent protein-photoprotein pair in clytia hemisphaerica eggs shows co-targeting to mitochondria and efficient bioluminescence energy transfer. *Open Biology* **4** 130206. (doi:10.1098/rsob.130206)
Franchini A & Ottaviani E 2000 Repair of molluscan tissue injury: Role of PDGF and TGF-β. *Tissue and Cell* **32** 312–321. (doi:10.1054/tice.2000.0118)
Frank U, Leitz T & Müller WA 2001 The hydroid Hydractinia: A versatile, informative cnidarian representative. *BioEssays* **23** 963–971. (doi:10.1002/bies.1137)
Freeman G 1981a The cleavage initiation site establishes the posterior pole of the hydrozoan embryo. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **190** 123–125.
Freeman G 1981b The role of polarity in the development of the hydrozoan planula larva. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **190** 168–184. (doi:10.1007/BF00867804)
Freeman G 2005 The effect of larval age on developmental changes in the polyp prepattern of a hydrozoan planula. *Zoology* **108** 55–73. (doi:10.1016/j.zool.2004.11.002)
Freeman G & Ridgway EB 1987 Endogenous photoproteins, calcium channels and calcium transients during metamorphosis in hydrozoans. *Roux's Archives of Developmental Biology* **196** 30–50. (doi:10.1007/BF00376020)
French V, Bryant PJ & Bryant S V 1976 Pattern regulation in epimorphic fields. *Science* **193** 969–981.
Fritzenwanker JH & Technau U 2002 Induction of gametogenesis in the basal cnidarian Nematostella vectensis (Anthozoa). *Development Genes and Evolution* **212** 99–103. (doi:10.1007/s00427-002-0214-7)
Fritzenwanker JH, Saina M & Technau U 2004 Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial-mesenchymal transitions during embryonic and larval development of Nematostella vectensis. *Developmental Biology* **275** 389–402. (doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.014)
Fujisawa T 2008 Hydra Peptide Project 1993-2007. *Development Growth and Differentiation* **50** S257–S268. (doi:10.1111/j.1440-169X.2008.00997.x)
Fukazawa T, Naora Y, Kunieda T & Kubo T 2009 Suppression of the immune response potentiates tadpole tail regeneration during the refractory period. *Development* **136** 2323–2327. (doi:10.1242/dev.033985)
Fukuda I, Ooki S, Fujita T, Murayama E, Nagasawa H, Isa Y & Watanabe T 2003 Molecular cloning of a cDNA encoding a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304** 11–17. (doi:10.1016/S0006-291X(03)00527-8)
Gahan JM, Bradshaw B, Flici H & Frank U 2016 The interstitial stem cells in Hydractinia and their role in regeneration. *Current Opinion in Genetics and Development* **40** 65–73. (doi:10.1016/j.gde.2016.06.006)
Gahan JM, Schnitzler CE, DuBuc TQ, Doonan LB, Kanska J, Gornik SG, Barreira S, Thompson K, Schiffer P, Baxevanis AD *et al.* 2017 Functional studies on the role of Notch signaling in Hydractinia development. *Developmental Biology* **428** 224–231. (doi:10.1016/j.ydbio.2017.06.006)
Galle S, Yanze N & Seipel K 2005 The homeobox gene Msx in development and transdifferentiation of jellyfish striated muscle. *International Journal of Developmental Biology* **49** 961–967. (doi:10.1387/ijdb.052009sg)
Galliot B 1997 Signal molecules in regenerating Hydra. *BioEssays* **19** 37–46.
Galliot B 2012 Hydra, a fruitful model system for 270 years. *International Journal of Developmental Biology* **56** 411–423. (doi:10.1387/ijdb.120086bg)
Galliot B, Quiquand M, Ghila L, de Rosa R, Miljkovic-Licina M & Chera S 2009 Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Developmental Biology* **332** 2–24. (doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.563)
Galliot B, Crescenzi M, Jacinto A & Tajbakhsh S 2017 Trends in tissue repair and regeneration. *Development* **144** 357–364. (doi:10.1242/dev.144279)

Gardiner DM, Blumberg B, Komine Y & Bryant S V 1995 Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development (Cambridge, England)* **121** 1731–1741.
Garm A & Bielecki J 2008 Swim pacemakers in box jellyfish are modulated by the visual input. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **194** 641–651. (doi:10.1007/s00359-008-0336-0)
Garm A & Mori S 2009 Multiple photoreceptor systems control the swim pacemaker activity in box jellyfish. *Journal of Experimental Biology* **212** 3951–3960. (doi:10.1242/jeb.031559)
Garm A, O'Connor M, Parkefelt L & Nilsson D-E 2007 Visually guided obstacle avoidance in the box jellyfish Tripedalia cystophora and Chiropsella bronzie. *Journal of Experimental Biology* **210** 3616–3623. (doi:10.1242/jeb.004044)
Garm A, Oskarsson M & Nilsson DE 2011 Box jellyfish use terrestrial visual cues for navigation. *Current Biology* **21** 798–803. (doi:10.1016/j.cub.2011.03.054)
Gates GE 1950 Regeneration in an earthworm, Einsenia foetida (Savigny) 1826. III. Regeneration from simultaneous antériot and posterion transections. *Biological Bulletin* **99** 425–438.
Gauchat D, Kreger S, Holstein T & Galliot B 1998 Prdl-a, a Gene Marker for Hydra Apical Differentiation Related To Triploblastic Paired-Like Head-Specific Genes. *Development* **125** 1637–1645.
Gee L, Hartig J, Law L, Wittlieb J, Khalturin K, Bosch TCG & Bode HR 2010 B-Catenin Plays a Central Role in Setting Up the Head Organizer in Hydra. *Developmental Biology* **340** 116–124. (doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.036)
Ghosh-Roy A & Chisholm AD 2010 C. elegans: a new model organism for studies of axon regeneration. *Developmental Dynamics* **239** 1460–1464. (doi:10.1002/dvdy.22253.C.)
Ghosh S, Roy S, Séguin C, Bryant S V. & Gardiner DM 2008 Analysis of the expression and function of Wnt-5a and Wnt-5b in developing and regenerating axolotl (Ambystoma mexicanum) limbs. *Development Growth and Differentiation* **50** 289–297. (doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01000.x)
Gierer A & Meinhardt H 1972 A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* **12** 30–39.
Gierer A, S. Berking, Bode H, David CN, Flick K, Hansmann G, Schaller H & Trenker E 1972 Regeneration of Hydra from reaggregated cells. *Nature New Biology* **239** 98–101. (doi:10.1038/newbio239098a0)
Gilbert SF & Barresi MJ 2018 *Developmental Biology*. Sunderland, Massachusetts.
Glauber KM, Dana CE & Steele RE 2010 Hydra. *Current Biology* **20** 964–965. (doi:10.1016/j.cub.2010.09.054)
Gold DA & Jacobs DK 2013 Stem cell dynamics in Cnidaria: Are there unifying principles? *Development Genes and Evolution* **223** 53–66. (doi:10.1007/s00427-012-0429-1)
Gold DA, Katsuki T, Li Y, Yan X, Regulski M, Ibberson D, Holstein T, Steele RE, Jacobs DK & Greenspan RJ 2019 The genome of the jellyfish Aurelia and the evolution of animal complexity. *Nature Ecology & Evolution* **3** 96–104. (doi:10.1038/s41559-018-0719-8)
Le Grand F & Rudnicki MA 2007 Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **19** 628–633.
Gray RS, Roszko I & Solnica-Krezel L 2011 Planar Cell Polarity: Coordinating Morphogenetic Cell Behaviors with Embryonic Polarity. *Developmental Cell* **21** 120–133. (doi:10.1016/j.devcel.2011.06.011)
Green JBA & Sharpe J 2015 Positional information and reaction-diffusion: two big ideas in developmental biology combine. *Development* **142** 1203–1211. (doi:10.1242/dev.114991)
Grimmelikhuijzen CJP 1983 FMRFamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous systems of coelenterates. *Histochemistry* **78** 361–381. (doi:10.1007/BF00496623)
Grimmelikhuijzen CJP 1985 Antisera to the sequence Arg-Phe-amide visualize neuronal centralization in hydroid polyps. *Cell and Tissue Research* **241** 171–182. (doi:10.1007/BF00214639)
Grimmelikhuijzen CJP & Spencer AN 1984 FMRFamide immunoreactivity in the nervous system of the medusa Polyorchis penicillatus. *Journal of Comparative Neurology* **230** 361–371. (doi:10.1002/cne.902300305)
Grimmelikhuijzen CJP, Graff D, Koizumi O, Westfall JA & McFarlane ID 1991 Neuropeptides in coelenterates: a review. *Hydrobiologia* **216–217** 555–563. (doi:10.1007/BF00026513)
Grimmelikhuijzen CJP, Leviev I & Carstensen K 1996 Peptides in the Nervous Systems of Cnidarians: Structure, Function, and Biosynthesis. *International Review of Cytology* **167** 37–89. (doi:10.1016/S0074-7696(08)61345-5)
Grohme MA, Schloissnig S, Rozanski A, Pippel M, Young GR, Winkler S, Brandl H, Henry I, Dahl A, Powell S *et al.* 2018 The genome of Schmidtea mediterranea and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature* **554** 56–61. (doi:10.1038/nature25473)
Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B & Holstein TW 2006 The Wnt code: Cnidarians signal the way. *Oncogene* **25** 7450–7460. (doi:10.1038/sj.onc.1210052)
Guedelhoefer OC & Alvarado AS 2012 Amputation induces stem cell mobilization to sites of injury during planarian regeneration. **3520** 3510–3520. (doi:10.1242/dev.082099)
Guillot C & Lecuit T 2013 Mechanics of Epithelial Tissue. *Science* **340** 1185–1189. (doi:10.1126/science.1235249)
Gurley KA, Rink JC & Alvarado AS 2008 β-Catenin Defines Head Versus Tail Identity During Planarian Regeneration and Homeostasis. *Science* **319** 323–327. (doi:10.1126/science.1150029)
Gurska D & Garm A 2014 Cell proliferation in cubozoan jellyfish tripedalia cystophora and alatina moseri. *PLoS ONE* **9** e102628. (doi:10.1371/journal.pone.0102628)
Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y & Longaker MT 2008 Wound repair and regeneration. *Nature* **453** 314–321. (doi:10.1038/nature07039)
Haas BJ & Whited JL 2017 Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration. *Trends in Genetics* **33** 553–565. (doi:10.1016/j.tig.2017.05.006)
Hadzi J 1909 Bemerkungen zur Onto- und Phylogenie der Hydromedusen. 22–30.

Haeckel E 1865 *Die Familie Der Rüsselquallen (Geryonida)*. Leipzig: W. Engelmann.
Haeckel E 1879 *Das System Der Medusen, Erster Teil Einer Monographie Der Medusen*. Jena: Gustav Fischer.
Halanych KM 2004 The New View of Animal Phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35** 229–256. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130124)
Hamaguchi-Hamada K, Kurumata-Shigeto M, Minobe S, Fukuoka N, Sato M, Matsufuji M, Koizumi O & Hamada S 2016 Thrombospondin type-1 repeat domain-containing proteins are strongly expressed in the head region of hydra. *PLoS ONE* **11** 1–13. (doi:10.1371/journal.pone.0151823)
Hambleton P 1971 Repair of Wall Damage in Escherichia coli Recovered from an Aerosol. *Journal of General Microbiology* **69** 81–88. (doi:10.1099/00221287-69-1-81)
Han MJ, An JY & Kim WS 2001 Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. *Developmental Dynamics* **220** 40–48. (doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1085>3.0.CO;2-8)
Hand C & Uhlinger KR 1992 The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone Nematostella vectensis. *Biological Bulletin* **182** 169–176.
Hand C & Uhlinger KR 1994 The Unique, Widely Distributed, Estuarine Sea Anemone, Nematostella Vectensis Stephenson : a Review, New Facts, and Questions. *Estuaries* **17** 501–508. (doi:10.2307/1352679)
Hand C & Uhlinger KR 1995 Asexual Reproduction by Transverse Fission and Some Anomalies in the Sea Anemone Nematostella vectensis. *Invertebrate Biology* **114** 9–18.
Hansen GN, Williamson M & Grimmelikhuijzen CJ 2002 A new case of neuropeptide coexpression (RGamide and LWamides) in Hydra, found by whole-mount, two-color double-labeling in situ hybridization. *Cell and Tissue Research* **308** 157–165. (doi:10.1007/s00441-002-0534-y)
Hargitt CW 1897 Recent Experiments on Regeneration. *Zoological Bulletin* **1** 27. (doi:10.2307/1535410)
Hargitt CW 1899 Experimental Studies upon Hydromedusae. *Biological Bulletin* **1** 35. (doi:10.2307/1535838)
Hargitt GT 1902 Notes on the regeneration of Gonionema. *Biological Bulletin* **4** 1–12. (doi:10.2307/1535508)
Hargitt CW 1904 Regeneration in Rhizostoma pulmo. *Journal of Experimental Zoology* **1** 73–94. (doi:10.1002/jez.1400010103)
Hartl M, Mitterstiller A-M, Valovka T, Breuker K, Hobmayer B & Bister K 2010 Stem cell-specific activation of an ancestral myc protooncogene with conserved basic functions in the early metazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** 4051–4056. (doi:10.1073/pnas.0911060107)
Hartl M, Glasauer S, Valovka T, Breuker K, Hobmayer B & Bister K 2014 Hydra myc2, a unique pre-bilaterian member of the myc gene family, is activated in cell proliferation and gametogenesis. *Biology Open* **3** 397–407. (doi:10.1242/bio.20147005)
Harvell CD 1984 Predator-Induced Defense in a Marine Bryozoan. *Science* **224** 1357–1359. (doi:10.1126/science.224.4655.1357)
Heisenberg CP & Bellaïche Y 2013 Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* **153** 948–962. (doi:10.1016/j.cell.2013.05.008)
Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, Ott M, Rouse GW, Edgecombe GD, Martinez P, Baguñà J, Bailly X, Jondelius U *et al.* 2009 Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276** 4261–4270. (doi:10.1098/rspb.2009.0896)
Helm RR, Siebert S, Tulin S, Smith J & Dunn CW 2013 Characterization of differential transcript abundance through time during Nematostella vectensis development. *BMC Genomics* **14** 1. (doi:10.1186/1471-2164-14-266)
Helm RR, Tiozzo S, Lilley MKS, Lombard F & Dunn CW 2015 Comparative muscle development of scyphozoan jellyfish with simple and complex life cycles. *EvoDevo* **6** 6–11. (doi:10.1186/s13227-015-0005-7)
Helmkampf M, Bellinger MR, Geib SM, Sim SB & Takabayashi M 2019 Draft genome of the rice coral Montipora capitata obtained from linked-read sequencing. *Genome Biology and Evolution* **11** 2045–2054. (doi:10.1093/gbe/evz135)
Henry LA & Hart M 2005 Regeneration from injury and resource allocation in sponges and corals - A review. *International Review of Hydrobiology* **90** 125–158. (doi:10.1002/iroh.200410759)
Hensel K, Lotan T, Sanders SM, Cartwright P & Frank U 2014 Lineage-specific evolution of cnidarian Wnt ligands. *Evolution and Development* **16** 259–269. (doi:10.1111/ede.12089)
Hicklin J & Wolpert L 1973 Positional information and pattern regulation in hydra: the effect of gamma-radiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **30** 741–752.
Higgins JE, Ford MD & Costello JH 2008 Transitions in morphology, nematocyst distribution, fluid motions, and prey capture during development of the scyphomedusa Cyanea capillata. *Biological Bulletin* **214** 29–41. (doi:10.2307/25066657)
Hirata H, Gupta M, Vedula SRK, Lim CT, Ladoux B & Sokabe M 2015 Actomyosin bundles serve as a tension sensor and a platform for ERK activation. *EMBO Reports* **16** 250–257. (doi:10.15252/embr.201439140)
Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, Von Laue CC, Snyder P, Rothbächer U & Holstein TW 2000 WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* **407** 186–189. (doi:10.1038/35025063)
Hobmayer B, Jenewein M, Eder D, Eder MK, Glasauer S, Gufler S, Hartl M & Salvenmoser AW 2012 Stemness in Hydra - A current perspective. *International Journal of Developmental Biology* **56** 509–517. (doi:10.1387/ijdb.113426bh)
Holley SA, Jackson PD, Sasai Y, Lu B, Robertis EM De, Hoffmann FM & Ferguson EL 1995 A conserved system for dorso-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature* **396** 249–253.
Holstein T 1981 The morphogenesis of nematocytes in Hydra and Forsklia: An ultrastructural study. *Journal of Ultrasructure Research* **75** 276–290. (doi:10.1016/S0022-5320(81)80085-8)
Holstein T & Tardent P 1984 An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: Nematocyst discharge. *Science* **223** 830–833.

(doi:10.1126/science.6695186)
Holstein TW, Hobmayer E & David CN 1991 Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Developmental Biology* **148** 602–611. (doi:10.1016/0012-1606(91)90277-A)
Holstein TW, Mala C, Kurz E, Bauer K, Greber M & David CN 1992 The primitive metazoan Hydra expresses antistasin, a serine protease inhibitor of vertebrate blood coagulation: cDNA cloning, cellular localisation and developmental regulation. *FEBS Letters* **309** 288–292. (doi:10.1016/0014-5793(92)80791-E)
Holstein TW, Hobmayer E & Technau U 2003 Cnidarians: An evolutionarily conserved model system for regeneration? *Developmental Dynamics* **226** 257–267. (doi:10.1002/dvdy.10227)
Hotchkiss FHC 1979 Case Studies in the Teratology of Starfish. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **131** 139–157.
Houliston E, Momose T & Manuel M 2010 Clytia hemisphaerica: A jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends in Genetics* **26** 159–167. (doi:10.1016/j.tig.2010.01.008)
Howard J, Grill SW & Bois JS 2011 Turing's next steps: The mechanochemical basis of morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12** 400–406. (doi:10.1038/nrm3120)
Huggins IJ, Bos T, Gaylord O, Jessen C, Lonquich B, Puranen A, Richter J, Rossdam C, Brafman D, Gaasterland T *et al.* 2017 The WNT target SP5 negatively regulates WNT transcriptional programs in human pluripotent stem cells. *Nature Communications* **8** 1034. (doi:10.1038/s41467-017-01203-1)
Huxley TH 1859 *The Oceanic Hydrozoa; a Description of the Calycophoridæ and Physophoridæ Observed during the Voyage of HMS "Rattlesnake" in the Years 1846–50, with a General Introduction*. London: Ray Society.
Huxley JS & De Beer GR 1963 *The Elements of Experimental Embryology*. New York: HAFNER PUBLISHING COxMPANY. INC.
Hwang JS, Ohyanagi H, Hayakawa S, Osato N, Nishimiya-Fujisawa C, Ikeo K, David CN, Fujisawa T & Gojobori T 2007 The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** 14735–14740. (doi:10.1073/pnas.0703331104)
Hwang JS, Takaku Y, Momose T, Adamczyk P, Ozbek S, Ikeo K, Khalturin K, Hemmrich G, Bosch TCG, Holstein TW *et al.* 2010 Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** 18539–18544. (doi:10.1073/pnas.1003256107)
Hyman LH 1940 *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora*. New York: The McGraw-Hill Companies.
Iachetta R, Ambrosone A, Klimovich A, Wittlieb J, Onorato G, Candeo A, D'Andrea C, Intartaglia D, Scotti N, Blasio M *et al.* 2018 Real time dynamics of β-catenin expression during hydra development, regeneration and wnt signalling activation. *International Journal of Developmental Biology* **62** 311–318. (doi:10.1387/ijdb.180092ct)
Iglesias M, Gomez-Skarmeta JL, Salo E & Adell T 2008 Silencing of Smed- catenin1 generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* **135** 1215–1221. (doi:10.1242/dev.020289)
Ikmi A, McKinney SA, Delventhal KM & Gibson MC 2014 TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the early-branching metazoan Nematostella vectensis. *Nature Communications* **5** 1–8. (doi:10.1038/ncomms6486)
Jager M, Quéinnec E, Le Guyader H & Manuel M 2011 Multiple Sox genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan Clytia hemisphaerica. *EvoDevo* **2** 12. (doi:10.1186/2041-9139-2-12)
Jeon Y, Park SG, Lee N, Weber JA, Kim H-S, Hwang S-J, Woo S, Kim H, Bhak Y, Jeon S *et al.* 2019 The draft genome of an octocoral, Dendronephthya gigantea . *Genome Biology and Evolution* **11** 949–953. (doi:10.1093/gbe/evz043)
Jeuniaux C 1962 Digestion de la chitine chez les actinaires (coelentérés anthozoaires). *Cahiers de Biologie Marine* **III** 391–400.
Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A & Belmonte JCI 2010 Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* **464** 606–609. (doi:10.1038/nature08899)
Jopling C, Boue S & Belmonte JCI 2011 Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12** 79–89. (doi:10.1038/nrm3043)
Juliano CE, Reich A, Liu N, Gotzfried J, Zhong M, Uman S, Reenan RA, Wessel GM, Steele RE & Lin H 2014 PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs function in Hydra somatic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** 337–342. (doi:10.1073/pnas.1320965111)
Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J & Ohsawa R 2005 Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Experimental Cell Research* **306** 343–348. (doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.015)
Kaloulis K, Chera S, Hassel M, Gauchat D & Galliot B 2004 Reactivation of developmental programs: The cAMP-response element-binding protein pathway is involved in hydra head regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** 2363–2368. (doi:10.1073/pnas.0306512101)
Kamran Z, Zellner K, Kyriazes H, Kraus CM, Reynier JB & Malamy JE 2017 In vivo imaging of epithelial wound healing in the cnidarian Clytia hemisphaerica demonstrates early evolution of purse string and cell crawling closure mechanisms. *BMC Developmental Biology* **17** 1–14. (doi:10.1186/s12861-017-0160-2)
Kan NG, Junghans D & Belmonte JCI 2009 Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *The FASEB Journal* **23** 3516–3525. (doi:10.1096/fj.09-131730)
Kanska J & Frank U 2013 New roles for Nanos in neural cell fate determination revealed by studies in a cnidarian. *Journal of Cell Science* **126** 3192–3203. (doi:10.1242/jcs.127233)
Kao D, Lai AG, Stamataki E, Rosic S, Konstantinides N, Jarvis E, Di Donfrancesco A, Pouchkina-Stancheva N, Semon M, Grillo M *et al.* 2016 The genome of the crustacean parhyale hawaiensis, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. *ELife* **5** e20062. (doi:10.7554/eLife.20062.001)

Kass-Simon G 1976 Coordination of juxtaposed muscle layers as seen in Hydra. In *Coelenterate Ecology and Behavior*, pp 705–714. Ed GO Mackie. Springer, Boston, MA.

Kato K, Orii H, Watanabe K & Agata K 2001 Dorsal and ventral positional cues required for the onset of planarian regeneration may reside in differentiated cells. *Developmental Biology* **233** 109–121. (doi:10.1006/dbio.2001.0226)

Kawamura K, Sugino Y, Sunanaga T & Fujiwara S 2008 Multipotent epithelial cells in the process of regeneration and asexual reproduction in colonial tunicates. *Development Growth and Differentiation* **50** 1–11. (doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00972.x)

Kayal E, Roure B, Philippe H, Collins AG & Lavrov D V. 2013 Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evolutionary Biology* **13**. (doi:10.1186/1471-2148-13-5)

Kayal E, Bentlage B, Sabrina Pankey M, Ohdera AH, Medina M, Plachetzki DC, Collins AG & Ryan JF 2018 Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits. *BMC Evolutionary Biology* **18** 1–18. (doi:10.1186/s12862-018-1142-0)

Kelava I, Rentzsch F & Technau U 2015 Evolution of eumetazoan nervous systems: insights from cnidarians. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**.

Kerszberg M & Wolpert L 2007 Specifying Positional Information in the Embryo: Looking Beyond Morphogens. *Cell* **130** 205–209. (doi:10.1016/j.cell.2007.06.038)

Ben Khadra Y, Sugni M, Ferrario C, Bonasoro F, Varela Coelho A, Martinez P & Candia Carnevali MD 2017 An integrated view of asteroid regeneration: tissues, cells and molecules. *Cell and Tissue Research* **370** 13–28. (doi:10.1007/s00441-017-2589-9)

Khalturin K, Anton-Erxleben F, Milde S, Plötz C, Wittlieb J, Hemmrich G & Bosch TCG 2007 Transgenic stem cells in Hydra reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Developmental Biology* **309** 32–44. (doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.013)

Khalturin K, Shinzato C, Khalturina M, Hamada M, Fujie M, Koyanagi R, Kanda M, Goto H, Anton-Erxleben F, Toyokawa M *et al.* 2019 Medusozoan genomes inform the evolution of the jellyfish body plan. *Nature Ecology and Evolution* **3** 811–822. (doi:10.1038/s41559-019-0853-y)

Kiefer JC 2007 Back to basics: Sox genes. *Developmental Dynamics* **236** 2361–2366. (doi:10.1002/dvdy.21218)

Kikuchi K 2014 Advances in understanding the mechanism of zebrafish heart regeneration. *Stem Cell Research* **13** 542–555. (doi:10.1016/j.scr.2014.07.003)

Kim D, Langmead B & Salzberg SL 2015 HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* **12** 357–360. (doi:10.1038/nmeth.3317)

Kim H-M, Weber JA, Lee N, Park SG, Cho YS, Bhak Y, Lee N, Jeon Y, Jeon S, Luria V *et al.* 2018 The jellyfish genome sheds light on the early evolution of active predation. *BioRxiv* 449082. (doi:10.1101/449082)

Klug M, Tardent P, Smid I & Holstein T 1984 Presence and localization of chitinase in Hydra and Podocoryne (Cnidaria, Hydrozoa). *Journal of Experimental Zoology* **229** 69–72. (doi:10.1002/jez.1402290109)

Knopf F, Hammond C, Chekuru A, Kurth T, Hans S, Weber CW, Mahatma G, Fisher S, Brand M, Schulte-Merker S *et al.* 2011 Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Developmental Cell* **20** 713–724. (doi:10.1016/j.devcel.2011.04.014)

Koizumi O 2007 Nerve ring of the hypostome in hydra: Is it an origin of the central nervous system of bilaterian animals? *Brain, Behavior and Evolution* **69** 151–159. (doi:10.1159/000095204)

Koizumi O & Bode H 1991 Plasticity in the nervous system of adult hydra. III. Conversion of neurons to expression of a vasopressin-like immunoreactivity depends on axial location. *The Journal of Neuroscience* **11** 2011–2020. (doi:10.1523/jneurosci.11-07-02011.1991)

Koizumi O, Itazawa M, Mizumoto H, Minobe S, Javois LC, Grimmelikhuijzen CJP & Bode HR 1992 Nerve ring of the hypostome in Hydra. I. Its structure, development, and maintenance. *Journal of Comparative Neurology* **326** 7–21. (doi:10.1002/cne.903260103)

Koizumi O, Hamada S, Minobe S, Hamaguchi-Hamada K, Kurumata-Shigeto M, Nakamura M & Namikawa H 2015 The nerve ring in cnidarians: Its presence and structure in hydrozoan medusae. *Zoology* **118** 79–88. (doi:10.1016/j.zool.2014.10.001)

Kondo M & Akasaka K 2010 Regeneration in crinoids. *Development Growth and Differentiation* **52** 57–68. (doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01159.x)

Konstantinides N & Averof M 2014 A Common Cellular Basis for muscle regeneration in arthropods and vertebrates. *Science* **343** 788–791. (doi:10.1126/science.1243529)

Korschelt E & Heider K 1893 *Lehrbuch Der Vergleichenden Entwicklungsgeschichte Der Wirbellosen Thiere*. Jena: Gustav Fischer.

Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A & Seller JR 2004 Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *Journal of Biological Chemistry* **279** 35557–35563. (doi:10.1074/jbc.M405319200)

Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH & Tanaka EM 2009 Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* **460** 60–65. (doi:10.1038/nature08152)

Krahe M, Wenzel I, Lin KN, Fischer J, Goldmann J, Kästner M & Fütterer C 2013 Fluctuations and differential contraction during regeneration of Hydra vulgaris tissue toroids. *New Journal of Physics* **15**. (doi:10.1088/1367-2630/15/3/035004)

Kraus JE, Fredman D, Wang W, Khalturin K & Technau U 2015 Adoption of conserved developmental genes in development and origin of the medusa body plan. *EvoDevo* **6**. (doi:10.1186/s13227-015-0017-3)

Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR & Moon RT 2000 The Wnt/Ca2+ pathway. *Trends in Genetics* **16** 279–283. (doi:10.1016/s0168-9525(00)02028-x)

Künzel T, Heiermann R, Frank U, Müller W, Tilmann W, Bause M, Nonn A, Helling M, Schwarz RS & Plickert G 2010 Migration and differentiation potential of stem cells in the cnidarian Hydractinia analysed in eGFP-transgenic animals and chimeras. *Developmental Biology* **348** 120–129. (doi:10.1016/j.ydbio.2010.08.017)

Kuo T-H, Kowalko JE, DiTommaso T, Nyambi M, Montoro DT, Essner JJ & Whited JL 2015 TALEN-mediated gene editing of the thrombospondin-1 locus in axolotl . *Regeneration* **2** 37–43. (doi:10.1002/reg2.29)

Kurz E & Schmid V 1991 Effects of tumor promoters and diacylglycerol on the transdifferentiation of striated muscle cells of the medusa Podocoryne carnea to RF-amide positive nerve cells. *Hydrobiologia* **216**–**217** 11–17. (doi:10.1007/BF00026437)

Kurz EM, Holstein TW, Petri BM, Engel J & David CN 1991 Mini-collagens in Hydra Nematocytes. *The Journal of Cell Biology* **115** 1159–1169.

Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hrouda M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, Von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ *et al.* 2005 Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* **433** 156–160. (doi:10.1038/nature03158)

Lai AG & Aboobaker AA 2018 EvoRegen in animals: Time to uncover deep conservation or convergence of adult stem cell evolution and regenerative processes. *Developmental Biology* **433** 118–131. (doi:10.1016/j.ydbio.2017.10.010)

Lange RG & Müller WA 1991 SIF, A novel morphogenetic inducer in hydrozoa. *Developmental Biology* **147** 121–132. (doi:10.1016/S0012-1606(05)80012-0)

Langmead B, Trapnell C, Pop M & Salzberg SL 2009 Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10** R25. (doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25)

Lapébie P, Ruggiero A, Barreau C, Chevalier S, Chang P, Dru P, Houliston E & Momose T 2014 Differential Responses to Wnt and PCP Disruption Predict Expression and Developmental Function of Conserved and Novel Genes in a Cnidarian. *PLoS Genetics* **10**. (doi:10.1371/journal.pgen.1004590)

Layden MJ, Rentzsch F & Röttinger E 2016 The rise of the starlet sea anemone Nematostella vectensis as a model system to investigate development and regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **5** 408–428. (doi:10.1002/wdev.222)

Leclère L & Rentzsch F 2014 RGM Regulates BMP-Mediated Secondary Axis Formation in the Sea Anemone Nematostella vectensis. *Cell Reports* **9** 1921–1931. (doi:10.1016/j.celrep.2014.11.009)

Leclère L & Röttinger E 2017 Diversity of Cnidarian Muscles: Function, Anatomy, Development and Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4** 1–22. (doi:10.3389/fcell.2016.00157)

Leclère L, Jager M, Barreau C, Chang P, Le Guyader H, Manuel M & Houliston E 2012 Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian Clytia. *Developmental Biology* **364** 236–248. (doi:10.1016/j.ydbio.2012.01.018)

Leclère L, Horin C, Chevalier S, Lapébie P, Dru P, Peron S, Jager M, Condamine T, Pottin K, Romano S *et al.* 2019 The genome of the jellyfish Clytia hemisphaerica and the evolution of the cnidarian life-cycle. *Nature Ecology and Evolution* **3** 801–810. (doi:10.1038/s41559-019-0833-2)

Lee Y 2005 Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* **132** 5173–5183. (doi:10.1242/dev.02101)

Lee PN, Pang K, Matus DQ & Martindale MQ 2006 A WNT of things to come: Evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **17** 157–167. (doi:10.1016/j.semcdb.2006.05.002)

Lengfeld T, Watanabe H, Simakov O, Lindgens D, Gee L, Law L, Schmidt HA, Özbek S, Bode H & Holstein TW 2009 Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Developmental Biology* **330** 186–199. (doi:10.1016/j.ydbio.2009.02.004)

Lepourcelet M, Chen Y-NP, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW & Shivdasani R a 2004 Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* **5** 91–102. (doi:S1535610803003349 [pii])

Li B & Dewey CN 2011 RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *Bioinformatics: The Impact of Accurate Quantification on Proteomic and Genetic Analysis and Research* **12** 41–74. (doi:10.1201/b16589)

Li C, Zhao H, Liu Z & McMahon C 2014 Deer antler - A novel model for studying organ regeneration in mammals. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **56** 111–122. (doi:10.1016/j.biocel.2014.07.007)

Lilley MKS, Elineau A, Ferraris M, Thiéry A, Stemmann L, Gorsky G & Lombard F 2014 Individual shrinking to enhance population survival: Quantifying the reproductive and metabolic expenditures of a starving jellyfish, Pelagia noctiluca. *Journal of Plankton Research* **36** 1585–1597. (doi:10.1093/plankt/fbu079)

Lin G & Slack JMW 2008 Requirement for Wnt and FGF signaling in Xenopus tadpole tail regeneration. *Developmental Biology* **316** 323–335. (doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.032)

Lin YCJ, Grigoriev NG & Spencer AN 2000 Wound healing in jellyfish striated muscle involves rapid switching between two modes of cell motility and a change in the source of regulatory calcium. *Developmental Biology* **225** 87–100. (doi:10.1006/dbio.2000.9807)

Lin YC, Gallin WJ & Spencer a N 2001 The anatomy of the nervous system of the hydrozoan jellyfish, Polyorchis penicillatus, as revealed by a monoclonal antibody. *Invertebrate Neuroscience : IN* **4** 65–75. (doi:10.1007/s101580100008)

Lindsay SM 2010 Frequency of injury and the ecology of regeneration in marine benthic invertebrates. *Integrative and Comparative Biology* **50** 479–493. (doi:10.1093/icb/icq099)

Livshits A, Shani-Zerbib L, Maroudas-Sacks Y, Braun E & Keren K 2017 Structural Inheritance of the Actin Cytoskeletal Organization Determines the Body Axis in Regenerating Hydra. *Cell Reports* **18** 1410–1421.

(doi:10.1016/j.celrep.2017.01.036)
Logan CY & Nusse R 2004 the Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20** 781–810. (doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126)
Mackie GO 2003 Central circuitry in the jellyfish Aglantha digitale IV. Pathways coordinating feeding behaviour. *Journal of Experimental Biology* **206** 2487–2505. (doi:10.1242/jeb.00450)
Mackie GO 2004 Central Neural Circuitry in the Jellyfish Aglantha: A Model 'Simple Nervous System'. *NeuroSignals* **13** 5–19. (doi:10.1159/000076155)
Mackie GO & Singla CL 1975 Neurobiology of Stomotoca. I. Action Systems. *Journal of Neurobiology* **6** 339–356. (doi:10.1002/neu.480060402)
MacWilliams HK 1983a Hydra Transplantation Phenomena and the Mechanism of Hydra Head Regeneration. Properties of the Head Activation. *Developmental Biology* **96** 239–257.
MacWilliams HK 1983b Hydra transplantation Phenomena and the mechanism of Hydra Head Regeneration. Properties of the Head Inhibition. *Developmental Biology* **96** 217–238.
Maginnis TL 2006 The costs of autotomy and regeneration in animals: A review and framework for future research. *Behavioral Ecology* **17** 857–872. (doi:10.1093/beheco/arl010)
Mali B, Möhrlen F, Frohme M & Frank U 2004 A putative double role of a chitinase in a cnidarian: Pattern formation and immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **28** 973–981. (doi:10.1016/j.dci.2004.04.002)
Mango SE 2009 The Molecular Basis of Organ Formation: Insights From the C. elegans Foregut . *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25** 597–628. (doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175411)
Manuel M 2009 Early evolution of symmetry and polarity in metazoan body plans. *Comptes Rendus - Biologies* **332** 184–209. (doi:10.1016/j.crvi.2008.07.009)
Marcum BA & Campbell RD 1978 Development of Hydra lacking nerve and interstitial cells. *Journal of Cell Science* **29** 17–33.
Mariscal R, Bigger C & McLean R 1976 The form and function of Cnidarian spirocysts. *Cell And Tissue Research* **168** 465–474. (doi:10.1007/bf00215997)
Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D & Martindale MQ 2009 Anatomy and development of the nervous system of Nematostella vectensis, an anthozoan cnidarian. *Developmental Neurobiology* **69** 235–254. (doi:10.1002/dneu.20698)
Marques AC & Collins AG 2005 Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* **123** 23–42. (doi:10.1111/j.1744-7410.2004.tb00139.x)
Martin 1990 Development of nerve cells in hydrozoan planulae: III. Some interstitial cells traverse the ganglionic pathway in the endoderm. *Biological Bulletin* **178** 10–20. (doi:10.2307/1541532.)
Martin VJ 1992 Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net. *Cell & Tissue Research* **269** 431–438. (doi:10.1007/BF00353898)
Martin VJ & Chia F 1982 Fine structure of a scyphozoan planula, Cassiopeia xamachana. *Biological Bulletin* **163** 320–328.
Martin P & Leibovich SJ 2005 Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology* **15** 599–607. (doi:10.1016/j.tcb.2005.09.002)
Martin VJ & Thomas MB 1981 The origin of the nervous system in Pennaria tiarella, as revealed by treatment with colchicine. *The Biological* **160** 303–310.
Martin VJ, Littlefield CL, Archer WE & Bode HR 1997 Embryogenisis in Hydra. *The Biological Bulletin* **192** 345–363.
Martindale MQ 2004 Investigating the origins of triploblasty: `mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone Nematostella vectensis (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development* **131** 2463–2474. (doi:10.1242/dev.01119)
Martinez DE, Dirksen ML, Bode PM, Jamrich M, Steele RE & Bode HR 1997 Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Developmental Biology* **192** 523–536. (doi:10.1006/dbio.1997.8715)
Martinez VG, Menger GJ & Zoran MJ 2005 Regeneration and asexual reproduction share common molecular changes: Upregulation of a neural glycoepitope during morphallaxis in Lumbriculus. *Mechanisms of Development* **122** 721–732. (doi:10.1016/j.mod.2004.12.003)
Martínez DE 1998 Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Experimental Gerontology* **33** 217–225. (doi:10.1016/S0531-5565(97)00113-7)
Mashanov VS & García-Arrarás JE 2011 Gut regeneration in holothurians: A snapshot of recent developments. *Biological Bulletin* **221** 93–109. (doi:10.1086/BBLv221n1p93)
Matsunaga T & Rahman A 1998 What brought the adaptive immune system to vertebrates? - The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunological Reviews* **166** 177–186. (doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01262.x)
Mazza ME, Pang K, Martindale MQ & Finnerty JR 2007 Genomic Organization, Gene Structure, and Developmental Expression of Three Clustered otx Genes in the Sea Anemone Nematostella vectensis. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* **308B** 494–506. (doi:10.1002/jez.b.21158)
McCluskey J & Martin P 1995 Analysis of the Tissue Movements of Embryonic Wound Healing-DiI Studies in the Limb Bud Stage Mouse Embryo. *Developmental Biology* **170** 102–114. (doi:10.1006/dbio.1995.1199)
Megill WM 2005 The modulus of elasticity of fibrillin-containing elastic fibres in the mesoglea of the hydromedusa Polyorchis penicillatus. *Journal of Experimental Biology* **208** 3819–3834. (doi:10.1242/jeb.01765)
Meinhardt H 1983a A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs. *J. Embryol. Exp. Morph* **76** 115–137.
Meinhardt H 1983b A bootstrap model for the proximodistal pattern formation in vertebrate limbs. *J. Embryol. Exp. Morph* **76** 139–146.

Meinhardt H 1993 A model for pattern formation of hypostome, tentacles, and foot in Hydra: How to form structures close to each other, How to form them at a distance. *Developmental Biology* **157** 321–333.
Meinhardt H 2012 Turing's theory of morphogenesis of 1952 and the subsequent discovery of the crucial role of local self enhancement and long-range inhibition. *Interface Focus* **2** 407–416. (doi:10.1098/rsfs.2011.0097)
Mescher AL 1976 Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *Journal of Experimental Zoology* **195** 117–127. (doi:10.1002/jez.1401950111)
Mescher AL & Neff AW 2005 Regenerative capacity and the developing immune system. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **93** 39–66. (doi:10.1007/b99966)
Metchnikoff E 1886 *Embryologische Studien an Medusen : Ein Beitrag Zur Genealogie Der Primitiv-Organe*. Wien.
Miljkovic-Licina M, Gauchat D & Galliot B 2004 Neuronal evolution: Analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *BioSystems* **76** 75–87. (doi:10.1016/j.biosystems.2004.05.030)
Miljkovic-Licina M, Chera S, Ghila L & Galliot B 2007 Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development* **134** 1191–1201. (doi:10.1242/dev.02804)
Millane RC, Kanska J, Duffy DJ, Seoighe C, Cunningham S, Plickert G & Frank U 2011 Induced stem cell neoplasia in a cnidarian by ectopic expression of a POU domain transcription factor. *Development* **138** 2429–2439. (doi:10.1242/dev.064931)
Miller JR 2002 The Wnts. *Genome Biology* **3**.
Miller DJ & Ball EE 2008 Cryptic complexity captured: the Nematostella genome reveals its secrets. *Trends in Genetics* **24** 1–4. (doi:10.1016/j.tig.2007.10.002)
Miller CJ & Davidson L 2013 The interplay between cell signaling and mechanics in developmental processes. *Nature Reviews Genetics* **14** 733–744.
Molina MD, Saló E & Cebrià F 2007 The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Developmental Biology* **311** 79–94. (doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.019)
Molina MD, Neto A, Maeso I, Gómez-Skarmeta JL, Saló E & Cebrià F 2011 Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Current Biology* **21** 300–305. (doi:10.1016/j.cub.2011.01.016)
Momose T & Houliston E 2007 Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo. *PLoS Biology* **5** 889–899. (doi:10.1371/journal.pbio.0050070)
Momose T, Derelle R & Houliston E 2008 A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian Clytia hemisphaerica. *Development* **135** 2105–2113. (doi:10.1242/dev.021543)
Momose T, Kraus Y & Houliston E 2012 A conserved function for Strabismus in establishing planar cell polarity in the ciliated ectoderm during cnidarian larval development. *Development* **139** 4374–4382. (doi:10.1242/dev.084251)
Montgomery JR & Coward SJ 2006 On the Minimal Size of a Planarian Capable of Regeneration. *Transactions of the American Microscopical Society* **93** 386. (doi:10.2307/3225439)
Moosler A, Rinehart KL & Grimmelikhuijzen CJP 1997 Isolation of three novel neuropeptides, the Cyanea-RFamides I-III, from scyphomedusae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236** 743–749. (doi:10.1006/bbrc.1997.7022)
Morgan TH 1898 Experimental studies of the regeneration of Planaria maculata. *Archiv f??R Entwickelungsmechanik Der Organismen* **7** 364–397. (doi:10.1007/BF02161491)
Morgan TH 1899 Regeneration in the Hydromedusa , Gonionemus vertens. *The American Naturalist* **33** 939–951.
Morgan TH 1900 Regeneration in Bipalium. *Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen* **9** 563–586. (doi:10.1007/BF02156194)
Morgan TH 1901a *Regeneration*. New York: The Macmillan Company.
Morgan TH 1901b Regeneration of Proportionate Structures in Stentor. *Biological Bulletin* **2** 311. (doi:10.2307/1535709)
Morgan TH 1906 Hydranth formation and polarity in tubularia. *Journal of Experimental Zoology* **III**.
Morrison JI, Lööf S, He P & Simon A 2006 Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *Journal of Cell Biology* **172** 433–440. (doi:10.1083/jcb.200509011)
Morrison JI, Borg P & Simon A 2010 Plasticity and recovery of skeletal muscle satellite cells during limb regeneration. *The FASEB Journal* **24** 750–756. (doi:10.1096/fj.09-134825)
Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L & Wold B 2008 Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5** 621–628. (doi:10.1038/nmeth.1226)
De Mulder K, Kuales G, Pfister D, Willems M, Egger B, Salvenmoser W, Thaler M, Gorny AK, Hrouda M, Borgonie G *et al.* 2009 Characterization of the stem cell system of the acoel Isodiametra pulchra. *BMC Developmental Biology* **9** 1–17. (doi:10.1186/1471-213X-9-69)
Mullen LM, Bryant S V, Torok MA, Blumberg B & Gardiner DM 1996 Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development (Cambridge, England)* **122** 3487–3497.
Müller WA 1973 Autoradiographische Untersuchungen über die synthetische Aktivität neurosekretorischer Zellen im Gehirn von Platynereis dumerilii während der sexuellen Entwicklung und Regeneration. *Zeitschrift Für Zellforschung* **139** 487–510.
Müller WA & Leitz T 2002 Metamorphosis in the Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology* **80** 1755–1771. (doi:10.1139/z02-130)
Müller WA, Plickert G & Berking S 1986 Regeneration in Hydrozoa: distal versus proximal transformation in Hydractinia. *Roux's Archives of Developmental Biology* **195** 513–518. (doi:10.1007/BF00375892)
Müller WA, Teo R & Frank U 2004 Totipotent migratory stem cells in a hydroid. *Developmental Biology* **275** 215–224. (doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.006)
Müller W, Frank U, Teo R, Mokady O, Guette C & Plickert G 2007 Wnt signaling in hydroid development: Ectopic heads

and giant buds induced by GSK-3β inhibitors. *International Journal of Developmental Biology* **51** 211–220. (doi:10.1387/ijdb.062247wm)
Munjal A & Lecuit T 2014 Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development* **141** 1789–1793. (doi:10.1242/dev.091645)
Munjal A, Philippe JM, Munro E & Lecuit T 2015 A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis. *Nature* **524** 351–355. (doi:10.1038/nature14603)
Mydlarz LD, Holthouse SF, Peters EC & Harvell CD 2008 Cellular responses in sea fan corals: Granular amoebocytes react to pathogen and climate stressors. *PLoS ONE* **3**. (doi:10.1371/journal.pone.0001811)
Nacu E & Tanaka EM 2011 Limb Regeneration: A New Development? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27** 409–440. (doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154115)
Nacu E, Gromberg E, Oliveira CR, Drechsel D & Tanaka EM 2016 FGF8 and SHH substitute for anterior-posterior tissue interactions to induce limb regeneration. *Nature* **533** 407–410. (doi:10.1038/nature17972)
Nakamura T, Mito T, Miyawaki K, Ohuchi H & Noji S 2008 EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket Gryllus bimaculatus nymph. *Developmental Biology* **319** 46–55. (doi:10.1016/j.ydbio.2008.04.002)
Nakamura Y, Tsiairis CD, Ozbek S & Holstein TW 2011 Autoregulatory and repressive inputs localize Hydra Wnt3 to the head organizer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** 9137–9142. (doi:10.1073/pnas.1018109108)
Nakanishi N, Yuan D, Jacobs DK & Hartenstein V 2008 Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in Aurelia (Cnidaria, Scyphozoa). *Development Genes and Evolution* **218** 511–524. (doi:10.1007/s00427-008-0239-7)
Nakanishi N, Renfer E, Technau U & Rentzsch F 2012 Nervous systems of the sea anemone Nematostella vectensis are generated by ectoderm and endoderm and shaped by distinct mechanisms. *Development* **139** 347–357. (doi:10.1242/dev.071902)
Naya DE, Veloso C, Muñoz JLP & Bozinovic F 2007 Some vaguely explored (but not trivial) costs of tail autotomy in lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **146** 189–193. (doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.014)
Needham AE 1950 Determination of the Form of Regenerating Limbs in Asellus aquaticus. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **91** 401–418.
Neppi V 1917 Sulla rigenerazione nelle idromeduse. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* **2**.
Neumann PE 2017 Organ or not? prolegomenon to organology. *Clinical Anatomy* **30** 288–289. (doi:10.1002/ca.22848)
Newmark PA & Alvarado AS 2002 Not your father's planarian: A classic model enters the era of functional genomics. *Nature Reviews Genetics* **3** 210–219. (doi:10.1038/nrg759)
Newmark PA & Sánchez Alvarado A 2000 Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Developmental Biology* **220** 142–153. (doi:10.1006/dbio.2000.9645)
Niehrs C 2004 Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nature Reviews Genetics* **5** 425–434. (doi:10.1038/nrg1347)
Niehrs C 2010 On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development* **137** 845–857. (doi:10.1242/dev.039651)
Niethammer P, Grabher C, Look AT & Mitchison TJ 2009 A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459** 996–999. (doi:10.1038/nature08119)
Nilsson D-E, Gislen L, Coates MM, Skogh C & Garm A 2005 Advanced optics in a jellyfish eye Dan-E. *Nature* **435** 201–205. (doi:10.1038/nature03484.)
Nishimiya-Fujisawa C & Kobayashi S 2012 Germline stem cells and sex determination in Hydra. *International Journal of Developmental Biology* **56** 499–508. (doi:10.1387/ijdb.123509cf)
O' farrell AF & Stock A 1953 Regeneration and the moulting cycle in blattella germanica l.: I. Single regeneration initiated during the first instar. *Australian Journal of Biological Sciences* **6** 485–500. (doi:10.1071/BI9530485)
Odelberg SJ 2005 Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anatomical Record - Part B New Anatomist* **287** 25–35. (doi:10.1002/ar.b.20080)
Oderberg IM, Li DJ, Scimone ML, Gaviño MA & Reddien PW 2017 Landmarks in Existing Tissue at Wounds Are Utilized to Generate Pattern in Regenerating Tissue. *Current Biology* **27** 733–742. (doi:10.1016/j.cub.2017.01.024)
Ohdera A, Ames CL, Dikow RB, Kayal E, Chiodin M, Busby B, La S, Pirro S & Collins AG 2019 Box , stalked , and upside-down ? Draft genomes from diverse jellyfish (Cnidaria , Acraspeda) lineages : Alatina alata (Cubozoa), Calvadosia cruxmelitensis (Staurozoa), and Cassiopea xamachana (Scyphozoa). *GigaScience* **8** 0–15. (doi:10.1093/gigascience/giz069)
Okada YK 1927 Etudes sur la régénération chez les coelentérés. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale : Histoire Naturelle* **66** 497–551.
Okano H, Imai T & Okabe M 2002 Musashi: a translational regulator of cell fate. *Journal of Cell Science* **115** 1355–1359.
Olano CT & Bigger CH 2000 Phagocytic activities of the gorgonian coral Swiftia exserta. *Journal of Invertebrate Pathology* **76** 176–184. (doi:10.1006/jipa.2000.4974)
Oliveri P, Walton KD, Davidson EH & McClay DR 2006 Repression of mesodermal fate by foxa, a key endoderm regulator of the sea urchin embryo. *Development* **133** 4173–4181. (doi:10.1242/dev.02577)
Orii H & Watanabe K 2007 Bone morphogenetic protein is required for dorso-ventral patterning in the planarian Dugesia japonica. *Development Growth and Differentiation* **49** 345–349. (doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00931.x)
Otto JJ & Campbell RD 1977a Budding in Hydra attenuata: Bud stages and fate map. *Journal of Experimental Zoology* **200** 417–428. (doi:10.1002/jez.1402000311)

Otto JJ & Campbell RD 1977b Tissue economics of hydra: regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *Journal of Cell Science* **28** 117–132.
Owen JH, Wagner DE, Chen C-C, Petersen CP & Reddien PW 2015 Teashirt Is Required for Head-Versus-Tail Regeneration Polarity in Planarians. *Development (Cambridge, England)* **142** 1062–1072. (doi:10.1242/dev.119685)
Owlarn S & Bartscherer K 2016 Go ahead, grow a head! A planarian's guide to anterior regeneration. *Regeneration* **3** 139–155. (doi:10.1002/reg2.56)
Özpolat BD, Sloane ES, Zattara EE & Bely AE 2016 Plasticity and regeneration of gonads in the annelid Pristina leidyi. *EvoDevo* **7** 22. (doi:10.1186/s13227-016-0059-1)
Palmer C V., Traylor-Knowles NG, Willis BL & Bythell JC 2011 Corals use similar immune cells and wound-healing processes as those of higher organisms. *PLoS ONE* **6** 1–11. (doi:10.1371/journal.pone.0023992)
Pan TL, Gröger H, Schmid V & Spring J 1998 A toxin homology domain in an astacin-like metalloproteinase of the jellyfish Podocoryne carnea with a dual role in digestion and development. *Development Genes and Evolution* **208** 259–266. (doi:10.1007/s004270050180)
Parkefelt L & Ekström P 2009 Prominent system of RFamide immunoreactive neurons in the rhopalia of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa). *Journal of Comparative Neurology* **516** 157–165. (doi:10.1002/cne.22072)
Parkefelt L, Skogh C, Nilsson DE & Ekstköm P 2005 Bilateral symmetric organization of neural elements in the visual system of a coelenterate, Tripedalia cystophora (Cubozoa). *Journal of Comparative Neurology* **492** 251–262. (doi:10.1002/cne.20658)
Passamaneck YJ & Martindale MQ 2012 Cell proliferation is necessary for the regeneration of oral structures in the anthozoan cnidarian Nematostella vectensis. *BMC Developmental Biology* **12** 1. (doi:10.1186/1471-213X-12-34)
Patterson MJ & Landolt ML 1979 Cellular Reaction to Injury in the Anthozoan elegan tissima Anthopleura. *Journal of Invertebrate Pathology* **33** 189–196.
Peebles F 1900 Experiments in Regeneration and in Grafting of Hydrozoa .
Pellettieri J 2019 Regenerative tissue remodeling in planarians – The mysteries of morphallaxis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **87** 13–21. (doi:10.1016/j.semcdb.2018.04.004)
Petersen CP & Reddien PW 2008 Smed-βcatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* **319** 2–6.
Petersen CP & Reddien PW 2009a A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 17061–17066. (doi:10.1073/pnas.0906823106)
Petersen CP & Reddien PW 2009b Wnt Signaling and the Polarity of the Primary Body Axis. *Cell* **139** 1056–1068. (doi:10.1016/j.cell.2009.11.035)
Petersen CP & Reddien PW 2011 Polarized activation of notum at wounds inhibits Wnt signaling to promote planarian head regeneration. *Science* **332** 852–855. (doi:10.1126/science.1202143)
Philippe H, Brinkmann H, Martinez P, Riutort M & Baguñà J 2007 Acoel flatworms are not Platyhelminthes: Evidence from phylogenomics. *PLoS ONE* **2** 1–5. (doi:10.1371/journal.pone.0000717)
Pierobon P 2012 Coordinated modulation of cellular signaling through ligand-gated ion channels in Hydra vulgaris (Cnidaria, Hydrozoa). *International Journal of Developmental Biology* **56** 551–565. (doi:10.1387/ijdb.113464pp)
Piraino S, Zega G, Di Benedetto C, Leone A, Dell'Anna A, Pennati R, Candia Carnevali D, Schmid V & Reichert H 2011 Complex neural architecture in the diploblastic larva of Clava multicornis (Hydrozoa, Cnidaria). *Journal of Comparative Neurology* **519** 1931–1951. (doi:10.1002/cne.22614)
Planques A, Malem J, Parapar J, Vervoort M & Gazave E 2019 Morphological, cellular and molecular characterization of posterior regeneration in the marine annelid Platynereis dumerilii. *Developmental Biology* **445** 189–210. (doi:10.1016/j.ydbio.2018.11.004)
Plass M, Solana J, Alexander Wolf F, Ayoub S, Misios A, Glažar P, Obermayer B, Theis FJ, Kocks C & Rajewsky N 2018 Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics. *Science* **360** 1–17. (doi:10.1126/science.aaq1723)
Plickert G, Jacoby V, Frank U, Müller WA & Mokady O 2006 Wnt signaling in hydroid development: Formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning. *Developmental Biology* **298** 368–378. (doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.043)
Pouille PA, Ahmadi P, Brunet AC & Farge E 2009 Mechanical signals trigger myosin II redistribution and mesoderm invagination in drosophila embryos. *Science Signaling* **2** 1–9. (doi:10.1126/scisignal.2000098)
Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Vladimir V *et al.* 2007 Sea anemone genome reveals the gene repertoire and genomic organization of the eumetazoan ancestor. *Sience* **317** 86–94. (doi:10.1126/science.1139158)
Quiroga Artigas G, Lapébie P, Leclère L, Takeda N, Deguchi R, Jékely G, Momose T & Houliston E 2018 A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish clytia. *ELife* **7** 1–22. (doi:10.7554/eLife.29555)
Rand HW, Bovard JF & Minnich DE 1926 Localization of Formative Agencies in Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **12** 565–570. (doi:10.1073/pnas.12.9.565)
Randall JB 1981 Regeneration and autotomy exhibited by the Black Widow spider, Latrodectus variolus walckenaer - I. The legs. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **190** 230–232. (doi:10.1007/BF00848308)
Randolph H 1897 Observations and experiments on regeneration in Planarians. *Archiv Für Entwickelungsmechanik Der Organismen* **5** 352–372. (doi:10.1007/bf02162271)
Raz AA, Srivastava M, Salvamoser R & Reddien PW 2017 Acoel regeneration mechanisms indicate an ancient role for muscle in regenerative patterning. *Nature Communications* **8** 1–8. (doi:10.1038/s41467-017-01148-5)

Reber-Müller S, Ono S ichi, Wehrle-Haller M & Schmid V 1994 Transdifferentiation of striated muscle of jellyfish to smooth muscle and nerve cells: the role of cell-ECM interactions and carbohydrates revealed by a monoclonal antibody. *Differentiation* **57** 77–87. (doi:10.1046/j.1432-0436.1994.5720077.x)

Reber-Müller S, Spissinger T, Schuchert P, Spring J & Schmid V 1995 An extracellular matrix protein of jellyfish homologous to mammalian fibrillins forms different fibrils depending on the life stage of the animal. *Developmental Biology* **169** 662–672. (doi:10.1006/dbio.1995.1177)

Rebscher N, Volk C, Teo R & Plickert G 2008 The germ plasm component vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian Hydractinia echinata. *Developmental Dynamics* **237** 1736–1745. (doi:10.1002/dvdy.21562)

Reddien PW 2011 Constitutive gene expression and specification of tissue identity in. *Trends in Ecology & Evolution* **27** 277–285. (doi:10.1016/j.tig.2011.04.004)

Reddien PW & Alvarado AS 2004 Fundamentals of Planarian Regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20** 725–757. (doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114)

Reddien PW, Bermange AL, Kicza AM & Sanchez Alvarado A 2007 BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development* **134** 4043–4051. (doi:10.1242/dev.007138)

Reft AJ & Daly M 2012 Morphology, distribution, and evolution of apical structure of nematocysts in hexacorallia. *Journal of Morphology* **273** 121–136. (doi:10.1002/jmor.11014)

Reinhardt B, Broun M, Blitz IL & Bode HR 2004 HyBMP5-8b, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in hydra. *Developmental Biology* **267** 43–59. (doi:10.1016/j.ydbio.2003.10.031)

Reiter S, Crescenzi M, Galliot B & Buzgariu W 2012 Hydra, a versatile model to study the homeostatic and developmental functions of cell death. *International Journal of Developmental Biology* **56** 593–604. (doi:10.1387/ijdb.123499sr)

Reitzel AM, Burton PM, Krone C & Finnerty JR 2007 Comparison of developmental trajectories in the starlet sea anemone Nematostella vectensis: Embryogenesis, regeneration, and two forms of asexual fission. *Invertebrate Biology* **126** 99–112. (doi:10.1111/j.1744-7410.2007.00081.x)

Renfer E, Amon-Hassenzahl A, Steinmetz PRH & Technau U 2010 A muscle-specific transgenic reporter line of the sea anemone, Nematostella vectensis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** 104–108. (doi:10.1073/pnas.0909148107)

Rentzsch F, Anton R, Saina M, Hammerschmidt M, Holstein TW & Technau U 2006 Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone Nematostella vectensis: Implications for the evolution of axial patterning. *Developmental Biology* **296** 375–387. (doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.003)

Rentzsch F, Guder C, Vocke D, Hobmayer B & Holstein TW 2007 An ancient chordin-like gene in organizer formation of Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** 3249–3254. (doi:10.1073/pnas.0604501104)

Rentzsch F, Fritzenwanker JH, Scholz CB & Technau U 2008 FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian Nematostella vectensis. *Development* **135** 1761–1769. (doi:10.1242/dev.020784)

Rentzsch F, Layden M & Manuel M 2017 The cellular and molecular basis of cnidarian neurogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **6** 1–19. (doi:10.1002/wdev.257)

Rentzsch F, Juliano C & Galliot B 2019 Modern genomic tools reveal the structural and cellular diversity of cnidarian ScienceDirect Modern genomic tools reveal the structural and cellular diversity of cnidarian nervous systems. *Current Opinion in Neurobiology* **56** 87–96. (doi:10.1016/j.conb.2018.12.004)

Reuter H, März M, Vogg MC, Eccles D, Grífol-Boldú L, Wehner D, Owlarn S, Adell T, Weidinger G & Bartscherer K 2015 β-Catenin-Dependent Control Of Positional Information Along The AP body axis in planarians involves a teashirt family member. *Cell Reports* **10** 253–265. (doi:10.1016/j.celrep.2014.12.018)

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R & Weissman IL 2003 A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423** 409–414. (doi:10.1038/nature01593)

Reyes-Bermudez A & Miller DJ 2009 In vitro culture of cells derived from larvae of the staghorn coral Acropora millepora. *Coral Reefs* **28** 859–864. (doi:10.1007/s00338-009-0527-3)

Reyes-Bermudez A, Lin Z, Hayward DC, Miller DJ & Ball EE 2009 Differential expression of three galaxin-related genes during settlement and metamorphosis in the scleractinian coral Acropora millepora. *BMC Evolutionary Biology* **9** 1–12. (doi:10.1186/1471-2148-9-178)

Richards GS & Rentzsch F 2014 Transgenic analysis of a SoxB gene reveals neural progenitor cells in the cnidarian Nematostella vectensis. *Development* **141** 4681–4689. (doi:10.1242/dev.112029)

Del Rio-Tsonis K & Tsonis PA 2003 Eye regeneration at the molecular age. *Developmental Dynamics* **226** 211–224. (doi:10.1002/dvdy.10224)

De Robertis EM & Sasai Y 1996 A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* **380** 37–40. (doi:10.1038/380037a0)

Roensch K, Tazaki A, Chara O & Tanaka EM 2013 Progressive Specification Rather than. *Science* **342** 1375–1379.

Romanes G 1878 Concluding Observations on the Locomotor System of Medusae. *Proceedings of the Royal Society of London (1854-1905)* **28** 266–267.

Romanes GJ 1885 *Jelly-Fish, Star-Fish, and Sea-Urchins, Being a Research on Primitive Nervous Systems*. New York: D. Appleton.

Rosengarten RD & Nicotra ML 2011 Model systems of invertebrate allorecognition. *Current Biology* **21** R82–R92. (doi:10.1016/j.cub.2010.11.061)

Roszko I, Sawada A & Solnica-Krezel L 2009 Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20** 986–997.

Röttinger E, Dahlin P & Martindale MQ 2012 A Framework for the Establishment of a Cnidarian Gene Regulatory Network for 'Endomesoderm' Specification: The Inputs of ß-Catenin/TCF Signaling. *PLoS Genetics* **8**.

(doi:10.1371/journal.pgen.1003164)
Ruggiero A 2015 Impact of Wnt signalling on multipotent stem cell dynamics during Clytia hemisphaerica embryonic and larval development. Université Pierre et Marie Curie.
Russell JJ, Theriot JA, Sood P, Marshall WF, Landweber LF, Fritz-Laylin L, Polka JK, Oliferenko S, Gerbich T, Gladfelter A *et al.* 2017 *Non-Model Model Organisms*. BMC Biology. (doi:10.1186/s12915-017-0391-5)
Saias L, Swoger J, D'Angelo A, Hayes P, Colombelli J, Sharpe J, Salbreux G & Solon J 2015 Decrease in Cell Volume Generates Contractile Forces Driving Dorsal Closure. *Developmental Cell* **33** 611–621. (doi:10.1016/j.devcel.2015.03.016)
Saito N, Nishimura K, Makanae A & Satoh A 2019 Fgf- and Bmp-signaling regulate gill regeneration in Ambystoma mexicanum. *Developmental Biology* **452** 104–113. (doi:10.1016/j.ydbio.2019.04.011)
Saló E & Baguñà J 1984 Regeneration and pattern formation in planarians. *J. Embryol Exp. Morph.* **83** 63–80.
Saló E & Baguñà J 2002 Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives. *Journal of Experimental Zoology* **292** 528–539. (doi:10.1002/jez.90001)
Sanchez Alvarado A & Newmark PA 1998 The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. *Wound Repair and Regeneration* **6** 413–420. (doi:10.1046/j.1524-475x.1998.60418.x)
Sanchez Alvarado A, Tsonis PA, Sánchez Alvarado A & Tsonis PA 2006 Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet* **7** 873–884. (doi:10.1038/nrg1923)
Sánchez Alvarado A 2000 Regeneration in the metazoans: Why does it happen? *BioEssays* **22** 578–590. (doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200006)22:6<578::AID-BIES11>3.0.CO;2-#)
Sanders SM, Shcheglovitova M & Cartwright P 2014 Differential gene expression between functionally specialized polyps of the colonial hydrozoan Hydractinia symbiolongicarpus (Phylum Cnidaria). *BMC Genomics* **15** 1–14. (doi:10.1186/1471-2164-15-406)
Sanders SM, Ma Z, Hughes JM, Riscoe BM, Gibson GA, Watson AM, Flici H, Frank U, Schnitzler CE, Baxevanis AD *et al.* 2018 CRISPR/Cas9-mediated gene knockin in the hydroid Hydractinia symbiolongicarpus. *BMC Genomics* **19**. (doi:10.1186/s12864-018-5032-z)
Sandoval-Guzmán T, Wang H, Khattak S, Schuez M, Roensch K, Nacu E, Tazaki A, Joven A, Tanaka EM & Simon A 2014 Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell* **14** 174–187. (doi:10.1016/j.stem.2013.11.007)
Sarras MP 2012 Components, structure, biogenesis and function of the Hydra extracellular matrix in regeneration, pattern formation and cell differentiation. *International Journal of Developmental Biology* **56** 567–576. (doi:10.1387/ijdb.113445ms)
Satoh A, Gardiner DM, Bryant S V. & Endo T 2007 Nerve-induced ectopic limb blastemas in the axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. *Developmental Biology* **312** 231–244. (doi:10.1016/j.ydbio.2007.09.021)
Satoh A, Mitogawa K & Makanae A 2015 Regeneration inducers in limb regeneration. *Development Growth and Differentiation* **57** 421–429. (doi:10.1111/dgd.12230)
Satterlie RA 1979 Central control of swimming in the cubomedusan jellyfish Carybdea rastonii. *Journal of Comparative Physiology* **133** 357–367. (doi:10.1007/BF00661138)
Satterlie RA 2002 Neuronal control of swimming in jellyfish: a comparative story. *Canadian Journal of Zoology* **80** 1654–1669. (doi:10.1139/z02-132)
Satterlie RA 2008 Control of swimming in the hydrozoan jellyfish Aequorea victoria: subumbrellar organization and local inhibition. *Journal of Experimental Biology* **211** 3467–3477. (doi:10.1242/jeb.018952)
Satterlie RA & Nolen TG 2001 Why do cubomedusae have only four swim pacemakers? *The Journal of Experimental Biology* **204** 1413–1419.
Satterlie RA, Thomas KS & Gray GC 2005 Muscle organization of the cubozoan jellyfish Tripedalia cystophora Conant 1897. *Biological Bulletin* **209** 154–163. (doi:10.2307/3593133)
Scadding SR & Maden M 1994 Retinoic Acid Gradients during Limb Regeneration. *Developmental Biology* **162** 608–617. (doi:10.1006/dbio.1994.1114)
Schaffer AA, Bazarsky M, Levy K, Chalifa-Caspi V & Gat U 2016 A transcriptional time-course analysis of oral vs. aboral whole-body regeneration in the Sea anemone Nematostella vectensis. *BMC Genomics* **17** 718. (doi:10.1186/s12864-016-3027-1)
Schmid V 1974a Regeneration in Medusa buds and Medusae of Hydrozoa. *American Zoologist* **14** 773–781. (doi:10.1093/icb/14.2.773)
Schmid V 1974b Structural alterations in cultivated striated muscle cells from anthomedusae (Hydrozoa). A metaplasiaic event. *Experimental Cell Research* **86** 193–198.
Schmid V 1975 Cell transformation in isolated striated muscle of hydromedusae independent of DNA synthesis. *Experimental Cell Research* **94** 401–408. (doi:10.1016/0014-4827(75)90506-6)
Schmid V 1976 The transformational potential of striated muscle in hydromedusae. *Developmental Biology* **49** 508–517. (doi:10.1016/0012-1606(76)90192-5)
Schmid V 1978 Striated muscle: Influence of an acellular layer on the maintenance of muscle differentiation in anthomedusa. *Developmental Biology* **64** 48–59. (doi:10.1016/0012-1606(78)90059-3)
Schmid V 1988 The potential for transdifferentiation and regeneration of isolated striated muscle of medusae in vitro. *Cell Differentiation* **22** 173–182. (doi:10.1016/0045-6039(88)90009-7)
Schmid V & Alder H 1984 Isolated, mononucleated, striated muscle can undergo pluripotent transdifferentiation and form a complex regenerate. *Cell* **38** 801–809. (doi:10.1016/0092-8674(84)90275-7)
Schmid V & Bally A 1988 Species specificity in cell-substrate interactions in medusae. *Developmental Biology* **129** 573–581.

(doi:10.1016/0012-1606(88)90402-2)
Schmid V & Tardent P 1971 The reconstitutional performances of the Leptomedusa Campanularia jonstoni. *Marine Biology* **8** 99–104. (doi:10.1007/BF00350924)
Schmid B, Schmid V & Tardent P 1974 The umbrellar growth process in the leptomedusae Phialidium hemisphaericum (Syn. Campanularia johnstoni). *Experientia* **30** 1399–1400. (doi:10.1007/BF01919657)
Schmid V, Schmid B, Schneider B & Baker G 1976 Factors Effecting Manubrium-Regeneration in Hydromedusae (Coelenterata). *Roux's Archives of Developmental Biology* **56** 41–56.
Schmid V, Wydler M & Alder H 1982 Transdifferentiation and regeneration in vitro. *Developmental Biology* **92** 476–488. (doi:10.1016/0012-1606(82)90193-2)
Schmid V, Baader C, Bucciarelli A & Reber-Muller S 1993 Mechanochemical interactions between striated muscle cells of jellyfish and grafted extracellular matrix can induce and inhibit DNA replication and transdifferentiation in vitro. *Developmental Biology* **155** 483–496. (doi:10.1006/dbio.1993.1046)
Schmidt T & David CN 1986 Gland cells in Hydra: Cell cycle kinetics and development. *Journal of Cell Biology* **85** 197–215.
Schneider B 1975 Die Manubriumregeneration bei der Leptomeduse Phialidium Hemisphaericum: Einfluss der Ernährung und der Gewebespannung. Universität Zürich.
Schnitzler CE 2019 What makes a jellyfish. *Nature Ecology & Evolution* 4–5. (doi:10.1038/s41559-019-0872-8)
Scholz CB & Technau U 2003 The ancestral role of Brachyury: expression of NemBra1 in the basal cnidarian Nematostella vectensis (Anthozoa). *Development Genes and Evolution* **212** 563–570. (doi:10.1007/s00427-002-0272-x)
Schwarz RS, Hodes-Villamar L, Fitzpatrick KA, Fain MG, Hughes AL & Cadavid LF 2007 A gene family of putative immune recognition molecules in the hydroid Hydractinia. *Immunogenetics* **59** 233–246. (doi:10.1007/s00251-006-0179-1)
Scimone ML, Kravarik KM, Lapan SW & Reddien PW 2014a Neoblast specialization in regeneration of the planarian schmidtea mediterranea. *Stem Cell Reports* **3** 339–352. (doi:10.1016/j.stemcr.2014.06.001)
Scimone ML, Lapan SW & Reddien PW 2014b A forkhead Transcription Factor Is Wound-Induced at the Planarian Midline and Required for Anterior Pole Regeneration. *PLoS Genetics* **10**. (doi:10.1371/journal.pgen.1003999)
Scimone ML, Cote LE & Reddien PW 2017 Orthogonal muscle fibres have different instructive roles in planarian regeneration. *Nature* **551** 623–628. (doi:10.1038/nature24660)
Sebé-Pedrós A, Saudemont B, Chomsky E, Plessier F, Mailhé MP, Renno J, Loe-Mie Y, Lifshitz A, Mukamel Z, Schmutz S *et al.* 2018 Cnidarian Cell Type Diversity and Regulation Revealed by Whole-Organism Single-Cell RNA-Seq. *Cell* **173** 1520-1534.e20. (doi:10.1016/j.cell.2018.05.019)
Sehring IM, Jahn C & Weidinger G 2016 Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration? *Current Opinion in Genetics and Development* **40** 48–56. (doi:10.1016/j.gde.2016.05.011)
Seifert AW & Muneoka K 2018 The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Developmental Biology* **433** 190–199. (doi:10.1016/j.ydbio.2017.08.007)
Seipel K & Schmid V 2006 Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *International Journal of Developmental Biology* **50** 589–599. (doi:10.1387/ijdb.062150ks)
Seipel K, Eberhardt M, Müller P, Pescia E, Yanze N & Schmid V 2004a Homologs of vascular endothelial growth factor and receptor, VEGF and VEGFR, in the jellyfish Podocoryne carnea. *Developmental Dynamics* **231** 303–312. (doi:10.1002/dvdy.20139)
Seipel K, Yanze N & Schmid V 2004b The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish Podocoryne carnea. *International Journal of Developmental Biology* **48** 1–7. (doi:10.1387/ijdb.15005568)
Seybold A, Salvenmoser W & Hobmayer B 2016 Sequential development of apical-basal and planar polarities in aggregating epitheliomuscular cells of Hydra. *Developmental Biology* **412** 148–159. (doi:10.1016/j.ydbio.2016.02.022)
Shibata N, Rouhana L & Agata K 2010 Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Development Growth and Differentiation* **52** 27–41. (doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01155.x)
Shimizu H, Julius MA, Giarré M, Zhang Z, M.C.Brown A & Kitajewski J 1997 Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of β-catenin. *Cell Growth & Differentiation* **8** 1349–1358.
Shimizu T, Bae YK, Muraoka O & Hibi M 2005 Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Developmental Biology* **279** 125–141. (doi:10.1016/j.ydbio.2004.12.007)
Shinzato C, Shoguchi E, Kawashima T, Hamada M, Hisata K, Tanaka M, Fujie M, Fujiwara M, Koyanagi R, Ikuta T *et al.* 2011 Using the Acropora digitifera genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* **476** 320–323. (doi:10.1038/nature10249)
Shostak S & Globus M 1966 Migration of epithelio-muscular cells in hydra. *Nature* **210** 218–219. (doi:10.1038/210218a0)
Siebert S, Anton-Erxleben F & Bosch TCG 2008 Cell type complexity in the basal metazoan Hydra is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. *Developmental Biology* **313** 13–24. (doi:10.1016/j.ydbio.2007.09.007)
Siebert S, Farrell JA, Cazet JF, Abeykoon Y, Primack AS, Schnitzler CE & Juliano CE 2018 Stem cell differentiation trajectories in Hydra resolved at single-cell resolution. *BioRxiv* 460154. (doi:10.1101/460154)
Simon A & Tanaka EM 2013 Limb regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **2** 291–300. (doi:10.1002/wdev.73)
Singer II 1971 Tentacular and oral-disc regeneration in the sea anemone, Aiptasia diaphana. 3. Autoradiographic analysis of patterns of tritiated thymidine uptake. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **26** 253–270.
Singh BN, Koyano-Nakagawa N, Garry JP & Weaver C V. 2010 Heart of newt: A recipe for regeneration. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **3** 397–409. (doi:10.1007/s12265-010-9191-9)

Singh BN, Doyle MJ, Weaver C V., Koyano-Nakagawa N & Garry DJ 2012 Hedgehog and Wnt coordinate signaling in myogenic progenitors and regulate limb regeneration. *Developmental Biology* **371** 23–34. (doi:10.1016/j.ydbio.2012.07.033)

Singh BN, Koyano-Nakagawa N, Donaldson A, Weaver C V., Garry MG & Garry DJ 2015 Hedgehog signaling during appendage development and regeneration. *Genes* **6** 417–435. (doi:10.3390/genes6020417)

Singh BN, Weaver C V., Garry MG & Garry DJ 2018 Hedgehog and Wnt Signaling Pathways Regulate Tail Regeneration. *Stem Cells and Development* **27** 1426–1437. (doi:10.1089/scd.2018.0049)

Sinigaglia C, Thiel D, Hejnol A, Houliston E & Leclère L 2018 A safer, urea-based in situ hybridization method improves detection of gene expression in diverse animal species. *Developmental Biology* **434** 15–23. (doi:10.1016/j.ydbio.2017.11.015)

Skogh C, Garm A, Nilsson D-E & Erkström P 2006 Bilaterally symmetrical rhopalial nervous system of the box jellyfish Tripedalia cystophora. *Journal of Morphology* **267** 1391–1405. (doi:10.1002/jmor.10472)

Slabodnick M, Prevo B, Gross P, Sheung J & Marshall W 2013 Visualizing Cytoplasmic Flow During Single-cell Wound Healing in Stentor coeruleus Video Link. *J. Vis. Exp* **8250848** 1–7. (doi:10.3791/50848)

Slautterback DB & Fawcett DW 1959 The Development of the Cnidoblasts of Hydra: An Electron Microscope Study of Cell Differentiation. *J Cell Biol* **5** 441–452. (doi:10.1083/jcb.5.3.441)

Sonia Tarazona, Fernando Garcia-Alcalde, Dopazo J, Ferrer A & Conesa A 2011 Differential expression in RNA-seq:a matter of depth. *Genome Research* **21** 2213–2223. (doi:10.1101/gr.124321.111.Freely)

Sonnemann KJ & Bement WM 2011 Wound Repair: Toward Understanding and Integration of Single-Cell and Multicellular Wound Responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27** 237–263. (doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154251)

Spallanzani L 1768 *Prodromo Di Un' Opera Da Imprimersi Sopra Le Riproduzioni Animali*. Modena: Giovanni Montanari.

Spemann H & Mangold H 1924 über die Induktion von Embryonanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie Und Entwicklungsmechanik* **100** 559–638.

Spencer AN & Satterlie RA 1980 Electrical and dye coupling in an identified group of neurons in a coelenterate. *Journal of Neurobiology* **11** 13–19. (doi:10.1002/neu.480110103)

Spring J, Yanze N, Jösch C, Middel AM, Winninger B & Schmid V 2002 Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: A connection to the mesoderm of bilateria. *Developmental Biology* **244** 372–384. (doi:10.1006/dbio.2002.0616)

Srivastava M, Mazza-Curll KL, Van Wolfswinkel JC & Reddien PW 2014 Whole-body acoel regeneration is controlled by Wnt and Bmp-Admp signaling. *Current Biology* **24** 1107–1113. (doi:10.1016/j.cub.2014.03.042)

Stamatis S-A, Worsaae K & Garm A 2018 Regeneration of the Rhopalium and the Rhopalial Nervous System in the Box Jellyfish Tripedalia cystophora. *The Biological Bulletin* **234** 22–36. (doi:10.1086/697071)

Stancyk SE, Golde HM, Pape-Lindstrom PA & Dobson WE 1994 Born to lose. I. Measures of tissue loss and regeneration by the brittlestar Microphiopholis gracillima (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine Biology* **118** 451–462. (doi:10.1007/BF00350302)

Steinberg SN 1963 The regeneration of whole polyps from ectodermal fragments of scyphistoma larvae of Aurelia aurita. *Biological Bulletin* **124** 337–343.

Steinmetz PRH, Kraus JEM, Larroux C, Hammel JU, Amon-Hassenzahl A, Houliston E, Wörheide G, Nickel M, Degnan BM & Technau U 2012 Independent evolution of striated muscles in cnidarians and bilaterians. *Nature* **487** 231–234. (doi:10.1038/nature11180)

Steinmetz PRH, Aman A, Kraus JEM & Technau U 2017 Gut-like ectodermal tissue in a sea anemone challenges germ layer homology. *Nature Ecology and Evolution* **1** 1535–1542. (doi:10.1038/s41559-017-0285-5)

Stidwill R 1974 Inhibitions- und Induktionspheanomene bei der Manubriumregeenration der Leptomeduse Phialidium hemisphaericum (L.). Universität Zürich.

Stockard CR 1908 Studies of tissue growth. I. On experimental study of the rate of regeneration in Cassiopea xamachana (Bigelow). *Papers from the Tortugas Laboratory of the Carnegie Institution of Washington* **2** 61–102.

Stöckl AL, Petie R & Nilsson DE 2011 Setting the pace: New insights into central pattern generator interactions in box jellyfish swimming. *PLoS ONE* **6**. (doi:10.1371/journal.pone.0027201)

Stoick-Cooper CL, Moon RT & Weidinger G 2007 Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes and Development* **21** 1292–1315. (doi:10.1101/gad.1540507)

Straehler-Pohl I & Jarms G 2005 Life cycle of Carybdea marsupialis Linnaeus, 1758 (Cubozoa, Carybdeidae) reveals metamorphosis to be a modified strobilation. *Marine Biology* **147** 1271–1277. (doi:10.1007/s00227-005-0031-4)

Szczepanek S, Cikala M, David CN, Petri B, Lottspeich F & Holstein TW 2002 Poly-gamma-glutamate synthesis during formation of nematocyst capsules in Hydra. *Journal of Cell Science* **115** 745–751. (doi:10.1242/jcs.00084)

Szubinska B 1971 "New membrane" formation in amoeba proteus upon injury of individual cells: Electron microscope observations. *Journal of Cell Biology* **49** 747–772. (doi:10.1083/jcb.49.3.747)

Takahashi T & Hatta M 2011 The Importance of GLWamide Neuropeptides in Cnidarian Development and Physiology. *Journal of Amino Acids* **2011** 1–8. (doi:10.4061/2011/424501)

Takahashi T & Takeda N 2015 Insight into the molecular and functional diversity of cnidarian neuropeptides. *International Journal of Molecular Sciences* **16** 2610–2625. (doi:10.3390/ijms16022610)

Takaku Y, Hwang JS, Wolf A, Böttger A, Shimizu H, David CN & Gojobori T 2014 Innexin gap junctions in nerve cells coordinate spontaneous contractile behavior in Hydra polyps. *Scientific Reports* **4** 1–8. (doi:10.1038/srep03573)

Takeda N, Kon Y, Quiroga Artigas G, Lapébie P, Barreau C, Koizumi O, Kishimoto T, Tachibana K, Houliston E & Deguchi R 2018 Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as oocyte maturation-inducing hormones.

Development **145** dev156786. (doi:10.1242/dev.156786)
Takeo M, Lee W & Ito M 2015 Wound Healing and Skin Integrity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **5** a023267–a023267. (doi:10.1101/cshperspect.a023267)
Tanaka EM 2016 The Molecular and Cellular Choreography of Appendage Regeneration. *Cell* **165** 1598–1608. (doi:10.1016/j.cell.2016.05.038)
Tanaka EM & Reddien PW 2011 The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Developmental Cell* **21** 172–185. (doi:10.1016/j.devcel.2011.06.016)
Taub R 2004 Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5** 836–847. (doi:10.1038/nrm1489)
Technau U 2001 Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *BioEssays* **23** 788–794. (doi:10.1002/bies.1114)
Technau U & Bode HR 1999 HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development* **126** 999–1010.
Technau U & Schwaiger M 2015 Recent advances in genomics and transcriptomics of cnidarians. *Marine Genomics* **24** 131–138. (doi:10.1016/j.margen.2015.09.007)
Technau U & Steele RE 2012 Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development* **139** 4491–4491. (doi:10.1242/dev.090472)
Technau U, Cramer von Laue C, Rentzsch F, Luft S, Hobmayer B, Bode HR & Holstein TW 2000 Parameters of self-organization in Hydra aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** 12127–12131. (doi:10.1073/pnas.97.22.12127)
Teo R, Möhrlen F, Plickert G, Müller WA & Frank U 2006 An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Developmental Biology* **289** 91–99. (doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.009)
Terada H, Sugiyama T & Shigenaka Y 1988 Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XVIII. Mechanism for elimination of the interstitial cell lineage in the mutant strain sf-1. *Developmental Biology* **126** 263–269. (doi:10.1016/0012-1606(88)90137-6)
Tessmar-Raible K 2007 The evolution of neurosecretory centers in bilaterian forebrains: Insights from protostomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **18** 492–501. (doi:10.1016/j.semcdb.2007.04.007)
Tevlin P & Trainor LEH 1985 A two vector field model of limb regeneration and transplant phenomena. *Journal of Theoretical Biology* **115** 495–513. (doi:10.1016/S0022-5193(85)80137-5)
Thomas MB, Freeman G & Martin VJ 1987 The embryonic orogin of neurosensory cells and the role of nerve cells in metamorphosis in Phialidium gregarium (Cnidaria, Hydrozoa). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **11** 265–287.
Tiozzo S & Copley RR 2015 Reconsidering regeneration in metazoans: an evo-devo approach. *Frontiers in Ecology and Evolution* **3** 1–12. (doi:10.3389/fevo.2015.00067)
Tomiyama T & Ito K 2006 Regeneration of lost siphon tissues in the tellinacean bivalve Nuttallia olivacea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **335** 104–113. (doi:10.1016/j.jembe.2006.03.003)
Tomiyama T, Omori M & Minami T 2007 Feeding and growth of juvenile stone flounder in estuaries: Generality and the importance of sublethal tissue cropping of benthic invertebrates. *Marine Biology* **151** 365–376. (doi:10.1007/s00227-006-0491-1)
Torras R, Yanze N, Schmid V & González-Crespo S 2004 nanos expression at the embryonic posterior pole and the medusa phase in the hydrozoan Podocoryne carnea. *Evolution and Development* **6** 362–371. (doi:10.1111/j.1525-142X.2004.04044.x)
Trembley A 1744 *Mémoires Pour Servir à l'histoire d'un Genre de Polyes d'eau Douce, à Bras En Forme de Cornes*. Leide: Verbeek, Jean & Herman.
Trevino M, Stefanik DJ, Rodriguez R, Harmon S & Burton PM 2011 Induction of canonical Wnt signaling by alsterpaullone is sufficient for oral tissue fate during regeneration and embryogenesis in Nematostella vectensis. *Developmental Dynamics* **240** 2673–2679. (doi:10.1002/dvdy.22774)
Tsai RYL 2014 Turning a new page on nucleostemin and self-renewal. *Journal of Cell Science* **127** 3885–3891. (doi:10.1242/jcs.154054)
Tsonis PA 2007 Regeneration via transdifferentiation: The lens and hair cells. *Hearing Research* **227** 28–31. (doi:10.1016/j.heares.2006.06.011)
Tsonis PA, Madhavan M, Tancous EE & Del Rio-Tsonis K 2004 A newt's eye view of lens regeneration. *International Journal of Developmental Biology* **48** 975–980. (doi:10.1387/ijdb.041867pt)
Tu S & Johnson SL 2011 Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Developmental Cell* **20** 725–732. (doi:10.1016/j.devcel.2011.04.013)
Tucker RP, Shibata B & Blankenship TN 2011 Ultrastructure of the mesoglea of the sea anemone Nematostella vectensis (Edwardsiidae). *Invertebrate Biology* **130** 11–24. (doi:10.1111/j.1744-7410.2010.00219.x)
Tulin S, Aguiar D, Istrail S & Smith J 2013 A quantitative reference transcriptome for Nematostella vectensis early embryonic development: A pipeline for de novo assembly in emerging model systems. *EvoDevo* **4** 1. (doi:10.1186/2041-9139-4-16)
Turing AM 1952 The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciencessophical* **237** 37–72.
Tuszynskisb GP, Gasic TB & Gasic GJ 1987 Isolation and Characterization of Antistasin, an inhibitor of metastasis and coagulation. *The Journal of Biological Chemistry* **262** 9718–9723.
Umesono Y, Tasaki J, Nishimura Y, Hrouda M, Kawaguchi E, Yazawa S, Nishimura O, Hosoda K, Inoue T & Agata K 2013

The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. *Nature* **500** 73–76. (doi:10.1038/nature12359)
Urata Y, Yamashita W, Inoue T & Agata K 2018 Spatio-temporal neural stem cell behavior leads to both perfect and imperfect structural brain regeneration in adult newts. *Biology Open* **7** bio033142. (doi:10.1242/bio.033142)
Urdy S 2012 On the evolution of morphogenetic models: Mechano-chemical interactions and an integrated view of cell differentiation, growth, pattern formation and morphogenesis. *Biological Reviews* **87** 786–803. (doi:10.1111/j.1469-185X.2012.00221.x)
Vargas-Ángel B, Peters EC, Kramarsky-Winter E, Gilliam DS & Dodge RE 2007 Cellular reactions to sedimentation and temperature stress in the Caribbean coral Montastraea cavernosa. *Journal of Invertebrate Pathology* **95** 140–145. (doi:10.1016/j.jip.2007.01.003)
Vásquez-Doorman C & Petersen CP 2014 zic-1 Expression in Planarian Neoblasts after Injury Controls Anterior Pole Regeneration. *PLoS Genetics* **10**. (doi:10.1371/journal.pgen.1004452)
Vervoort M 2011 Regeneration and Development in Animals. *Biological Theory* **6** 25–35. (doi:10.1007/s13752-011-0005-3)
Vladar EK, Antic D & Axelrod JD 2009 Planar Cell Polarity Signaling : The Developing cell's compass. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. (doi:10.1101/cshperspect.a002964)
de Vlas J 1979 Secondary production by tail regeneration in a tidal flat population of lugworms (Arenicola marina), cropped by flatfish. *Netherlands Journal of Sea Research* **13** 362–393. (doi:10.1016/0077-7579(79)90012-7)
Vogg MC, Owlarn S, Pérez Rico YA, Xie J, Suzuki Y, Gentile L, Wu W & Bartscherer K 2014 Stem cell-dependent formation of a functional anterior regeneration pole in planarians requires Zic and Forkhead transcription factors. *Developmental Biology* **390** 136–148. (doi:10.1016/j.ydbio.2014.03.016)
Vogg MC, Beccari L, Ollé LI, Rampon C, Vriz S, Perruchoud C, Wenger Y & Galliot B 2019 An evolutionarily-conserved Wnt3/B-catenin/sp5 feedback loop restricts head organizer activity in Hydra. *Nature Communications* **10** 1–15. (doi:10.1038/s41467-018-08242-2)
Volkmann D & Baluška F 1999 Actin cytoskeleton in plants: From transport networks to signaling networks. *Microscopy Research and Technique* **47** 135–154. (doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19991015)47:2<135::AID-JEMT6>3.0.CO;2-1)
Vollrath F 1990 Leg regeneration in web spiders and its implications for orb weaver phylogeny. *Bulletin of the British Arachnological Society* **8** 177–184.
Wagge LE & Mittler T 1953 Shell regeneration in some british molluscs. *Nature* **171** 256–257.
Wagner DE, Wang IE & Reddien PW 2011 Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* **332** 811–816. (doi:10.1126/science.1203983)
Wang H & Simon A 2016 Skeletal muscle dedifferentiation during salamander limb regeneration. *Current Opinion in Genetics and Development* **40** 108–112. (doi:10.1016/j.gde.2016.06.013)
Wang Z, Gerstein M & Snyder M 2009 RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics in Western Equatoria State. *Nature Reviews Genetics* **10** 57.
Warner JF, Guerlais V, Amiel AR, Johnston H, Nedoncelle K & Röttinger E 2018 NvERTx: a gene expression database to compare embryogenesis and regeneration in the sea anemone Nematostella vectensis. *Development* **145** dev162867. (doi:10.1242/dev.162867)
Warner JF, Amiel AR, Johnston H & Röttinger E 2019 Regeneration is a partial redeployment of the embryonic gene network. *BioRxiv*.
Watanabe H, Fujisawa T & Holstein TW 2009 Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Development Growth and Differentiation* **51** 167–183. (doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01103.x)
Weber C 1981 Structure, histochemistry, ontogenetic development, and regeneration of the ocellus of Cladonema radiatum Dujardin (Cnidaria, Hydrozoa, Anthomedusae). *Journal of Morphology* **167** 313–331. (doi:10.1002/jmor.1051670306)
Weber C, Alder H & Schmid V 1987 In vitro transdifferentiation of striated muscle to smooth muscle cells of a medusa. *Cell Differentiation* **20** 103–115. (doi:10.1016/0045-6039(87)90424-6)
Webster G 1971 Morphogenesis and pattern formation on hydroids. *Biological Reviews* **46** 1–46. (doi:10.1111/j.1469-185x.1971.tb01178.x)
Webster BG & Hamilton S 1972 Budding in hydra: the role of cell multiplication and cell movement in bud initiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **27** 301–316.
Wehner D & Weidinger G 2015 Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends in Genetics* **31** 336–343. (doi:10.1016/j.tig.2015.03.012)
Weismann A 1883 *Die Entstehung Der Sexualzellen Bei Den Hydromedusen*. Jena.
Weismann A 1892 *Die Coninuität Des Keimplasmas Als Grundlage Einer Theorie Der Verderbung*. Jena.
Weissman IL, Anderson DJ & Gage F 2001 Stem and progénitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17** 387–403. (doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.387)
Wenemoser D & Reddien PW 2010 Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Developmental Biology* **344** 979–991. (doi:10.1016/j.ydbio.2010.06.017)
Wenger Y, Buzgariu W & Galliot B 2016 Loss of neurogenesis in Hydra leads to compensatory regulation of neurogenic and neurotransmission genes in epithelial cells.pdf. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **371**. (doi:10.1098/rstb.2015.0040)
Wenger Y, Buzgariu W, Perruchoud C, Loichot G & Galliot B 2019 Generic and context-dependent gene modulations during Hydra whole body regeneration. *BioRxiv*.
West DL 1978 The epitheliomuscular cell of hydra: Its fine structure, three-dimensional architecture and relation to morphogenesis. *Tissue and Cell* **10** 629–646. (doi:10.1016/0040-8166(78)90051-4)

Westfall JA 1966 The differentiation of nematocysts and associated structures in the cnidaria. *Zeitschrift Für Zellforschung* **75** 381–403.
Westfall JA 1973 Ultrastructural evidence for neuromuscular systems in coelenterates. *American Zoologist* **13** 237–246. (doi:10.1093/icb/13.2.237)
Westfall JA, Yamataka S & Enos PD 1971 Ultrastructural Evidence of Polarized Synapses in the Nerve Net of Hydra. *The Journal of Cell Biology* **51** 318–323. (doi:10.1083/jcb.51.1.318)
Whittaker JR 1975 Siphon regeneration in ciona. *Nature* **255** 224–225. (doi:10.1038/255224a0)
Wikelski M & Thom C 2002 Marine iguanas shrink to survive El Niño. *Nature* **403** 37–38. (doi:10.1038/47396)
Wikramanayake AH, Hong M, Lee PN, Pang K, Byrum CA, Bince JM, Xu R & Martindale MQ 2003 An ancient role for nuclearb-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* **426** 446–450.
Williams RB 1979 Studies on the nematosomes of nematostella vectensis stephenson (Coelenterata: Actiniaria). *Journal of Natural History* **13** 69–80. (doi:10.1080/00222937900770061)
Witchley JN, Mayer M, Wagner DE, Owen JH & Reddien PW 2013 Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell Reports* **4** 633–641. (doi:10.1016/j.celrep.2013.07.022)
Wittlieb J, Khalturin K, Lohmann JU, Anton-Erxleben F & Bosch TCG 2006 Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** 6208–6211. (doi:10.1073/pnas.0510163103)
Wolff E & Dubois F 1948 Sur la migration des cellules de régénération chez les Planaires. *Revue Suisse de Zoologie* **55** 218–227.
van Wolfswinkel JC, Wagner DE & Reddien PW 2014 Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell* **15** 326–339. (doi:10.1016/j.stem.2014.06.007)
Wolpert L 1969 Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of Theoretical Biology* **25** 1–47. (doi:10.1016/S0022-5193(69)80016-0)
Wolpert L 1989 Positional information revisited. *Development* **107** 3–12.
Wolpert L 1996 One hundred years of positional information. *Trends in Genetics* **12** 359–364. (doi:10.1016/S0168-9525(96)80019-9)
Wolpert L, Clarke MRB & Hornbruch A 1972 Positional signalling along hydra. *Nature New Biology* **239** 101–105. (doi:10.1038/newbio239101a0)
Wolpert L, Hornbruch A & Clarke MRB 1974 Positional information and positional signalling in hydra. *Integrative and Comparative Biology* **14** 647–663. (doi:10.1093/icb/14.2.647)
Xiao S, Yuan X & Knoll AH 2002 Eumetazoan fossils in terminal Proterozoic phosphorites? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** 13684–13689. (doi:10.1073/pnas.250491697)
Yuan D, Nakanishi N, Jacobs DK & Hartenstein V 2008 Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan Aurelia. *Development Genes and Evolution* **218** 525–539. (doi:10.1007/s00427-008-0254-8)
Zallen JA 2007 Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell* **129** 1051–1063. (doi:10.1016/j.cell.2007.05.050)
Zapata F, Goetz FE, Smith SA, Howison M, Siebert S, Church SH, Sanders SM, Ames CL, McFadden CS, France SC *et al.* 2015 Phylogenomic analyses support traditional relationships within Cnidaria. *PLoS ONE* **10** 1–13. (doi:10.1371/journal.pone.0139068)
Zeleny C 1907 The effect of degree of injury, successive injury and functional activity upon regeneration in the Scyphomedusan, Cassiopea xamachana. *Journal of Experimental Zoology* **5** 265–274. (doi:10.1002/jez.1400050206)
Zeng A, Li H, Guo L, Gao X, McKinney S, Wang Y, Yu Z, Park J, Semerad C, Ross E *et al.* 2018 Prospectively Isolated Tetraspanin + Neoblasts Are Adult Pluripotent Stem Cells Underlying Planaria Regeneration. *Cell* **173** 1593–1608. (doi:10.1016/j.cell.2018.05.006)

Annexe

Génome de *Clytia*

Au cours de ma thèse, j'ai été impliquée dans le projet de séquençage du génome de *Clytia*. J'ai réalisé une partie des ISH ayant permis de faire la figure 4, montrant la localisation de l'expression des TF enrichis dans la phase méduse. Ceux-ci sont associés aux structures nerveuses (anneaux nerveux, statocystes et ectoderme nématogénique des bulbes tentaculaires).

Les points abordés dans l'article et les principales conclusions sont les suivants :

- Les différentes phases du cycle de vie sont caractérisées par l'expression d'un set de gènes différents. Les gènes spécifiques des cnidaires ne sont pas associés à une phase particulière. Chaque phase est caractérisée par l'utilisation de gènes conservés avec les bilatériens et spécifiques des cnidaires.
- Les TF enrichis dans la phase méduse sont exprimés dans les structures nerveuses
- *Clytia* a perdu de nombreux gènes impliqués dans le patterning du pôle aboral des anthozoaires et l'axe secondaire. Ceci renforce l'hypothèse de la simplification de la planula et du polype chez les hydrozoaires

The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle

Lucas Leclère[1], Coralie Horin[1], Sandra Chevalier[1], Pascal Lapébie[1#], Philippe Dru[1], Sophie Peron[1], Muriel Jager[2], Thomas Condamine[2], Karen Pottin[2], Séverine Romano[1], Julia Steger[1#], Chiara Sinigaglia[1#], Carine Barreau[1], Gonzalo Quiroga Artigas[1#], Antonella Ruggiero[1#], Cécile Fourrage[1#], Johanna E. M. Kraus[5#], Julie Poulain[3], Jean-Marc Aury[4], Patrick Wincker[3], Eric Quéinnec[2], Ulrich Technau[5], Michaël Manuel[2], Tsuyoshi Momose[1], Evelyn Houliston[1] and Richard R. Copley[1*].

1. Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-mer (LBDV), 06230 Villefranche-sur-mer, France.
2. Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Evolution Paris-Seine (UMR7138), Case 05, 7 Quai St Bernard, 75005, Paris, France.
3. Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France.
4. Genoscope, Institut de Biologie François-Jacob, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Université Paris-Saclay, F-91057 Evry, France.
5. Department for Molecular Evolution and Development, Centre of Organismal Systems Biology, University of Vienna, Vienna A-1090, Austria.

#Current addresses:
P.L. Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Aix-Marseille Université, Marseille, France; J.S.: Department for Molecular Evolution and Development, Centre of Organismal Systems Biology, University of Vienna, Vienna A-1090, Austria; C.S. Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), École Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5242 - INRA USC 1370, 69364 Lyon cedex 07, France; G.Q.A.:The Whitney Laboratory for Marine Bioscience, University of Florida, St. Augustine, FL, 32080, USA; A.R. Centre de Recherche de Biologie cellulaire de Montpellier (CRBM), CNRS UMR 5237, Université de Montpellier, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France; C.F. Service de Génétique UMR 781, Hôpital Necker - APHP, Paris, France; J.E.M.K. Sars International Centre for Marine Molecular Biology, University of Bergen, Thormøhlensgate 55, 5006 Bergen, Norway.

* correspondence to R.R.C. copley@obs-vlfr.fr

Jellyfish (medusae) are a distinctive life-cycle stage of medusozoan cnidarians. They are major marine predators, with integrated neurosensory, muscular and organ systems. The genetic foundations of this complex form are largely unknown. We report the draft genome of the hydrozoan jellyfish *Clytia hemisphaerica* and use multiple transcriptomes to determine gene use across life-cycle stages. Medusa, planula larva and polyp are each characterised by distinct transcriptome signatures reflecting abrupt life cycle transitions, and all deploy a mixture of phylogenetically old and new genes. Medusa specific transcription factors, including many with bilaterian orthologs, associate with diverse neurosensory structures. Compared to *Clytia*, the polyp-only hydrozoan *Hydra* has lost many of the medusa-expressed transcription factors, despite similar overall rates of gene content evolution and sequence evolution. Absence of expression and gene loss among *Clytia* orthologs of genes patterning the anthozoan aboral pole, secondary axis and endomesoderm support simplification of planulae and polyps in Hydrozoa, including loss of bilateral symmetry. Consequently, although the polyp and planula are generally considered the

ancestral cnidarian forms, in *Clytia* the medusa maximally deploys the ancestral cnidarian–bilaterian transcription factor gene complement.

In most cnidarians a ciliated, worm-like planula larva settles to produce a polyp. In Anthozoa (corals and anemones), the polyp is the sexually reproductive form, but in the medusozoan branch of Cnidaria, polyps generally produce sexually reproductive jellyfish by a process of strobilation or budding. Jellyfish (medusae) are gelatinous, pelagic, radially symmetric forms found only in Medusozoa. They show complex physiology and behaviour based on neural integration of well-defined reproductive organs, digestive systems, locomotory striated muscles and sensory structures. Medusae in many species show some degree of nervous system condensation, notably the nerve rings running around the bell margin [1]. Some have considered the medusa the ancestral state of cnidarians, with anthozoans having lost this stage (e.g. [2]). Under this scenario, the polyp stage was acquired later during medusozoan evolution. Anthozoa would then have evolved from within Medusozoa, and so would have lost the medusa stage. Recent molecular phylogenies instead support Anthozoa and Medusozoa as sister groups, favouring a benthic, polyp-like adult cnidarian ancestor and an acquisition of the medusa stage in the common branch of Medusozoa [3,4]. Candidate gene expression studies have shown parallels between medusa and polyp development [5], and transcriptome comparisons between species with and without medusae have extended candidate gene lists [6,7], but in general the genetic foundations of complex medusa evolution within the cnidarian lineage are not well understood.

There are four classes of Medusozoa: the Cubozoa (box jellyfish), Scyphozoa (so-called 'true' jellyfish), Staurozoa ('stalked jellyfish') and Hydrozoa [3,8]. Life cycles in different medusozoan lineages have undergone frequent modifications, including loss of polyp, planula and medusa stages. *Hydra*, the classical model of animal regeneration, is a hydrozoan characterized by the loss of the planula and medusa stages from the life-cycle. Compared to anthozoan genomes [9–11], the *Hydra* genome is highly diverged and dynamic; it may therefore be atypical of Medusozoa and even Hydrozoa [12]. Here we report the genome of *Clytia hemisphaerica*, a hydrozoan with a typical medusozoan life-cycle, including planula, polyp and medusa stages (Fig. 1). *Clytia* is easy to maintain and manipulate, and amenable to gene function analysis [13], allowing mechanistic insight into cellular and developmental processes [8,14,15]. We analyse transcriptomes from all life cycle forms, illuminating the evolution of the planula, polyp and medusa, and demonstrate how the gene complement of the cnidarian–bilaterian ancestor provided the foundation of anatomical complexity in the medusa.

Results

Characteristics of the *Clytia* genome

We sequenced the *Clytia hemisphaerica* genome using a whole genome shotgun approach (see methods, Supplementary Tab. 1, Supplementary Fig. 1), giving an assembly with overall length of 445Mb. Staining of DNA in prophase oocytes shows the genome is packaged into 15 chromosome pairs (Supplementary Fig. 2). We predicted gene models by aligning expressed sequence reads (i.e. RNA-Seq) to the genome. We used sequences derived from a comprehensive set of stages and tissues as well as deeply sequenced mixed-stage libraries (see methods and Supplementary Tab. 1). This gave 26,727 genes and 69,083 transcripts. BUSCO analysis of the presence of 'Universal Single Copy Orthologs' indicates a genome coverage of 86% (total 'complete' sequences, with 90% for protein set coverage, Supplementary Tab. 1) [16]. Using RNA-Seq data we could confirm the trans-spliced leader sequences previously identified using ESTs [17]. We did not identify additional ones. The genome GC content is 35%, higher than *Hydra* (29%, [12]) but lower than the anthozoan *Nematostella* (39%, [9]).

Reads mapped to the genome suggested a polymorphism frequency of ~0.9%. This is likely an underestimate of heterozygosity in wild populations, as genomic DNA and mRNA for transcriptomes was derived from self-crossed laboratory-reared *Clytia* Z strains - see methods.

The complete mitochondrial genome showed the same gene order as the Hydroidolina ancestor [18] (see Supplementary Fig. 1).

The repeat content of ~39%, likely an underestimate given the difficulty of assembling these regions, revealed a rich landscape of uncharacterized interspersed elements in *Clytia.* While ~97% of the total repeat content could not be classified (~38% of genome length, see methods), MetaSINE was found to be the most abundant classifiable repeat, with over 5000 copies [19]. Many of the most abundant repeats were short (<500 nt), flanked by short inverted repeats and may represent novel or divergent MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) families. For example, 17,035 copies or fragments of the most abundant repeat were detected, with the first and last 16nt of 242nt forming an inverted repeat, and the element as a whole having no detectable sequence similarity to sequences from other species at protein or nucleic acid levels. In contrast, using the same methods, the most abundant element in the *Hydra* genome was a LINE (Long Interspersed Nuclear Element) present in ~30,000 copies or fragments and > 4kbp in length.

Patterns of gene gain and loss

We identified groups of orthologs for a selection of animals with completely sequenced genomes, and unicellular eukaryotic outgroups (see methods). Orthologous group presence or absence was used to infer a Bayesian phylogeny that recapitulated the widely accepted major groupings of bilaterian animals (Fig. 2). Cnidarians were the sister group of Bilateria, and within Cnidaria we recovered the expected monophyletic relationships: corals, anemones, anthozoans and hydrozoans. The hydrozoan branch lengths were the longest within the cnidarians, implying elevated rates of gene gain and loss in their lineage, although branches leading to several other species were noticeably longer, including the ecdysozoan models *Caenorhabditis* and *Drosophila*, the ascidian *Ciona*, as well as the ctenophore *Mnemiopsis*. *Clytia* and *Hydra* branch lengths were similar, suggesting that genome evolution has proceeded at comparable rates in these two hydrozoan lineages and that *Hydra* is not exceptional within this clade. This gene content-based phylogeny positioned sponges (represented by *Amphimedon*), not ctenophores (represented by *Mnemiopsis*), as the sister group of all other animals [20–22], though this relationship has weak support, the lowest of any node in our tree.

Among many examples of gene gain in *Clytia*, we could identify new multigene families and also instances of Horizontal Gene Transfers (HGT), as illustrated by a UDP Glucose Dehydrogenase-like (UGDH) gene (Supplementary Fig. 3). UGDH is required for the biosynthesis of various proteoglycans and so to regulate signalling pathways during metazoan embryonic development [23]. Unexpectedly, the *Clytia* genome contains two UGDH-like genes, including one acquired in Hydrozoa by HGT from a giant virus of the Mimiviridae family and expressed specifically during *Clytia* medusa formation. Interestingly, this UGDH-like xenolog, found in most available hydrozoan transcriptomes (including a close relative of *Hydra*, *Ectopleura larynx*), was lost in the *Hydra* lineage and replaced by another UGDH-like acquired through HGT from bacteria (Supplementary Fig. 3) [12]. Which reactions these enzymes catalyze and their roles during medusa formation remain to be determined. We also detected numerous gene duplications in the hydrozoan lineage, illustrated by the 39 Innexin gap junction genes (Supplementary Fig. 4), 14 Green Fluorescent Protein (GFP) and 18 Clytin photoprotein genes (Supplementary Fig. 5) found in the *Clytia* genome. The 4 GFPs and 3 Clytin sequences previously reported in *Clytia* are thus transcribed from several recently duplicated genes, likely facilitating the levels of protein production needed to achieve the high cytoplasmic concentrations required for energy transfer between Clytins and GFPs [24].

Numerous likely gene losses in the hydrozoan lineage (i.e. absent in *Clytia* and *Hydra*, but present in Anthozoa and Bilateria) were confirmed by alignment-based phylogenetic analyses. These include at least 5 Fox family members (FoxAB, FoxE, FoxG, FoxM, FoxQ1) and several homeobox-containing transcription factors involved in nervous system development in Bilateria (Gbx, Mnx,

Rax, Ro, Dbx, Pax3-7/PaxD) [25,26]. Also absent were regulators of the anthozoan directive axis (the axis orthogonal to the oral/aboral axis, possibly related to the bilaterian dorsal/ventral axis [27,28]), including HOX2 (represented in *Nematostella* by Anthox7/HoxC, Anthox8/HoxD), Gbx, Netrin and its receptor UNC-5, and Chordin. (The 'Chordin-like' gene described in *Hydra* [29], is not orthologous to bilaterian and *Nematostella* Chordin [30]). Comparisons between the two available hydrozoan genomes revealed a much higher number of lost transcription factors in the *Hydra* lineage (e.g. CnoxA, Cdx, DRGX, Ems, Emx, Eve, FezF, FoxD, FoxL2, several FoxQ2 paralogs, Hand, Hmx, Islet, Nkx6, Msxlx, PaxE, Pdx/Xlox, Pknox, POU class 2/3, Six1/2, Twist, Tbx2/3, Tbx4/5, TLX) than in the *Clytia* lineage. Remarkably, all the conserved homeodomain-containing transcription factors found in the *Hydra* genome are also present in *Clytia* while more than 20 of those present in *Clytia* are missing in *Hydra* (Supplementary Tab. 2). We identified 7 *Clytia* transcription factors specifically expressed in the medusa (Cdx, CnoxA, DRGX, FoxL2, Pdx/Xlox, Six1/2, TLX, see below) lost in *Hydra,* but still present in the transcriptome of one of its closest relatives possessing a medusoid stage, *Ectopleura larynx* (Supplementary Fig. 6, Tab. 5). These *Hydra* gene losses thus likely relate to the loss of the medusa stage.

Gene order disruption in the hydrozoan lineage

We tested conservation of gene order between *Clytia*, *Hydra*, *Nematostella* and *Branchiostoma floridae*, a bilaterian showing a particularly slow rate of loss of syntenic blocks [31], by identifying conserved adjacent pairs of orthologs (see methods) shared between two genomes. C*lytia* shares most genes in adjacent pairs with *Hydra* (340), including myc2 and its target CAD [32]. Fewer pairs were conserved between *Clytia* and either *Nematostella* (36) or *Branchiostoma* (16). Although *Nematostella, Hydra* and *Clytia*, as cnidarians, are equally distant phylogenetically from *Branchiostoma*, the number of genes in adjacent pairs in *Clytia*/*Branchiostoma* (16) or *Hydra*/*Branchiostoma* (13) is considerably smaller than in *Nematostella*/*Branchiostoma* (110). Similar trends emerged from analyses limited to orthologs identified in all four species (Ch/Hv 51; Ch/Nv 8; Ch/Bf 4; Nv/Bf 20), so our conclusions are not biased by an inability to detect more divergent orthologs. Such conservation of adjacent gene pairs possibly relates to coordinated transcription, or enhancers being embedded in adjacent genes [33]. In contrast, even though *Clytia* and *Hydra* genomes contain orthologs of most of the Wnt, Fox, NK, ParaHox or Hox anthozoan family members, none of them are found in clusters as described in both *Nematostella* and bilaterians [28,34–39] (Supplementary Tab. 2), reinforcing the idea of rapid evolution of genome organisation in the common branch of *Clytia* and *Hydra*. Although a few homeobox, Wnt and Fox are found on the same scaffold in *Clytia* or *Hydra,* further analysis suggests these pairs are not conserved, as the clustered genes were found to be either recent duplicates, or the orthologs in the second species were lost or do not cluster (Hox9-14c and parahox-like CnoxA cluster in *Clytia* only, Lhx2/9 and Lmx LIM genes cluster in *Hydra* only, Supplementary Tab. 2).

Elevated stage specific gene expression in medusae and polyps

Hydrozoan life cycles are characterised by abrupt morphological transitions: metamorphosis from the planula to polyp; and growth and budding of the compex medusa from gonozooid polyps. To address global trends in differential gene use across the life cycle we produced a comprehensive replicated transcriptome dataset from 11 samples (Fig. 1a). Principal component analysis (PCA) of the most variably expressed genes across these transcriptomes confirmed sample reproducibility and revealed clear clustering of the three distinct hydrozoan life cycle stages: 1) the gastrula and planula samples 2) the polyp and stolon samples and 3) the medusa samples (Fig. 3a). Genes with highest loadings in the first principal component included proteases, as might be expected between feeding adult stages and non-feeding larvae (supplementary data). Transcriptomes from gonozooids, which are specialized polyp structures containing developing medusae, were intermediate between the polyp and medusa ones. Inter-sample distances based on all genes presented a similar picture to the PCA (Fig. 3b). The main *Clytia* life cycle phases thus have qualitatively distinct overall profiles of gene expression, with a distance based dendrogram

showing the polyp and medusa transcriptomes closer to each other than either is to the planula stage.

By fitting the log transformed expression data for each library to the sum of two Gaussian distributions [40] (Fig 3c and Supplementary Fig. 7; see methods), we estimated the number of genes that were 'on' in a given library (e.g. P1, PH or BMF), and hence stage (i.e. planula, polyp or medusa). By these criteria, polyp and medusa stages expressed more genes than embryo and planula stages, with most distinct genes being 'on' in the primary polyp library (19801 genes) and fewest in the early gastrula (13489 genes).

The majority of predicted genes, 84% (22472/26727) were classified as 'on' in at least one of our sampled libraries (see methods; note that our gene prediction protocol includes data from deep sequencing of other mixed libraries), and 41% (10874/26727) are expressed in all libraries. We combined results from libraries of the same life-cycle stages (see methods) and found 335 genes specifically 'on' in the planula, 1534 in the polyp and 808 in the medusa, with 1932, 284 and 981 genes specifically 'off' at these stages respectively (Fig. 3d). We further filtered these data by requiring that genes also show statistically significant expression differences between stages defined as 'specifically on' and other stages, allowing a rigorous treatment of the variance between biological replicates (see methods). This test reduced these lists, but the results showed the same overall trends in numbers of genes unique to stages (Fig. 3d). We conclude that the two adult stages in the *Clytia* life cycle show greater complexity of gene expression than the planula larva.

In order to determine whether the medusa stage was enriched in genes found only in the medusozoan clade, as might plausibly be expected of an evolutionary novelty, we combined these lists of stage specific genes with a phylogenetic classification of gene age (see methods, Supplementary Fig. 8). All three main life cycle stages (planula, polyp and medusa) were enriched in '*Clytia* specific' sequences, indicating that phylogenetically 'new' genes are more likely than 'old' genes to show stage-specific expression, but are not associated with any one life cycle phase. In general, genes that evolved after the cnidarian/bilaterian split were more likely to be expressed specifically in adult (polyp/medusa) stages.

Stage specific transcription factors

To address the nature of the molecular differences between stages, we assessed enrichment of Gene Ontology (GO) terms in stage specific genes relative to the genome as a whole. Planula larvae were found to be significantly enriched in G-protein coupled receptor signalling components, while polyp and medusa were enriched in cell-cell and cell-matrix adhesion class molecules (see Supplementary Tab. 3). Medusa specific genes were unique in being significantly enriched in the "nucleic acid binding transcription factor activity" term.

Confirming the strong qualitative distinction in gene expression profiles between planula, polyp and medusa (see above Fig. 3a and 3b) clustering of transcription factor expression profiles recovers the three major life-cycle stages (Fig. 4a). The majority of transcription factors (TFs, Supplementary Tab. 4) specific to a particular stage were specific to the medusa (34, of which 11 are plausibly sex specific; Fig. 3e and Supplementary Tab. 5). 12 were polyp specific (e.g. Vsx, two Hmx orthologs) and a total of 62 TFs were expressed at polyp and/or medusa stages but not at the planula stage (12.3% of the total TF). Only 3 TFs showed expression specific to the planula. This pattern is even more striking in the case of the 72 total homeodomain-containing TFs: 27.7% are expressed at polyp and/or medusa stages but not at the planula stage, while no homeodomain-containing TFs were identified as planula specific.

Among TFs expressed strongly in the medusa, but poorly at planula stages, we noted a large number with known involvement in neural patterning during bilaterian development (Medusa only: TCF15/Paraxis, Pdx/Xlox, Cdx, TLX, Six1/2, DRGX, FoxQ2 paralogs; Polyp and Medusa: Six3/6, FoxD, FoxQ2 paralogs, FezF, Otx paralogs, Hmx, Tbx4/5, Dmbx, Nkx, Nkx6, Neurogenin1/2/3, Fig.

4b). We detected expression of these TFs in distinct cell populations of the manubrium, gonads, nerve rings and tentacle bulbs (Fig. 4c,d), structures known to mediate and coordinate feeding, spawning and swimming in response to environmental stimuli [1,41,42]. The variety of patterns shows an unanticipated degree of molecular and cellular complexity. We propose that, in *Clytia,* expression of conserved TFs in the medusa is associated with diverse cell types, notably with the neural and neurosensory functions of a complex nervous system, with continuous expression of certain transcription factors in post-mitotic neurons being necessary to maintain neuronal identity [43]. Members of the Sox, PRDL and Achaete scute (bHLH subfamily) orthology groups, commonly associated with neurogenesis [44,45] are detectable across all life cycle stages in *Clytia*, so our results are unlikely simply due to a higher production of nerve cells in the medusa.

Anthozoan larvae and bilaterian embryos express a common set of TFs at their respective aboral/anterior ends, including Six3/6, FezF, FoxD, Otx, Rax, FoxQ2, and Irx [46,47] In the *Clytia* planula, whose anterior/aboral structures are relatively simple, most orthologs of this TF set are not expressed (Six3/6, FezF, FoxD, Otx orthologs, Fig. 4b, 5b), while another, Rax, was not found in the genome. A FoxQ2 gene (CheFoxQ2a) is expressed aborally in *Clytia* planulae [48] but is not the ortholog of *Nematostella* aboral and *Platynereis* apical FoxQ2 [46,47], which are instead orthologous to CheFoxQ2b, a *Clytia* polyp-medusa specific gene (Fig. 4b, 5b Supplementary Fig. 6.2, [48]). Irx is the only member of this conserved set of anterior/aboral TFs likely to be aborally expressed in *Clytia* planulae [49].

The metamorphosis in *Clytia* from planula to polyp is drastic, and the endoderm and oral ectoderm of the morphologically simple *Clytia* planulae [50] do not show continuity with the polyp mouth and digestive structures. In contrast, *Nematostella* planulae contain developing mesenteries, mouth and pharyngeal structures [51], anticipating gradual development into a feeding polyp. Correspondingly, endoderm and mesoderm patterning genes expressed in many bilaterian larvae and *Nematostella* planulae (Cdx, Pdx/Xlox, Nkx2, Nkx6, Twist, TCF15/Paraxis, Six1/2, Hand) [52,53], are not expressed in *Clytia* planulae. In contrast, despite different gastrulation mechanisms in anthozoans and hydrozoans, orthologs of TFs associated with gastrulation and endoderm formation in *Nematostella* [54], including FoxA, FoxB, Brachyury, Snail, Gsc are also expressed in oral-derived cells at gastrula and planula stages in *Clytia* [49], as well as at polyp and medusa stage.

Discussion

Three lines of evidence suggest that the *Clytia* genome has undergone a period of rapid evolution since the divergence of Hydrozoa from their common ancestor with Anthozoa (Fig. 5a). Firstly, rates of amino acid substitution appear to be elevated in hydrozoan relative to anthozoan cnidarians [55]. Secondly, orthologous gene content analysis shows that the hydrozoans *Clytia* and *Hydra* have the longest branches within Cnidaria, with elevated rates of gene gain and loss (Fig. 2). Thirdly, analysis of adjacent gene pairs shows more conservation between Anthozoa and Bilateria than between Hydrozoa and Bilateria.

Gene expression analysis and lost developmental genes point to secondarily simplified planula and polyp structures in *Clytia*. The planula larva, in particular, shows an absence of key apical (i.e. aboral/anterior, Fig. 5b) and endomesoderm patterning genes considered ancestral on the basis of shared expression patterns in Anthozoa and bilaterian larvae [46,47,53]. Similarly, several genes with roles in patterning the directive axis of the anthozoan planula [27,30,51,56–58] are lost from the *Clytia* and *Hydra* genomes (Chordin, Hox2, Gbx, Netrin), providing support for loss of bilaterality in medusozoans [30]. Much of the directive axis-patterning gene expression lost in *Clytia* planulae (Fig. 5b) is, in *Nematostella,* likely involved in differentiating structures - mesenteries - that are maintained in the adult polyp, supporting the idea that the simple state of the *Clytia* polyp is secondary. Although bilateral symmetry is observed in a few disparate hydrozoan clades, its sporadic presence suggests convergence [59]. It will be instructive to test whether, in these cases, bilaterality is under the control of different developmental mechanisms than those reported for *Nematostella* [27,30,51,56–58].

The medusa stage, as well as being morphologically complex, expresses a notable number of transcription factors that are conserved between cnidarians and bilaterians. These genes are expressed either specifically in the medusa (eg. DRGX, Twist and Pdx), or in both polyp and medusa but not planula stages (eg. Six3/6, Otx and FoxD), with medusa expression patterns suggesting roles in establishment or maintenance of neural cell-type identity. *Hydra* has lost the medusa from its life-cycle and has lost orthologs of most transcription factors that in *Clytia* are expressed specifically in the medusa, further supporting the notion that these genes are regulating the identity of cells now restricted to the medusa.

We propose then that, in part, the rapid molecular evolution we observe at the genome scale in Hydrozoa is connected as much to the simplified planula and polyp as to the more obvious novelty of the medusa. Genomic and transcriptomic studies of the other medusozoan lineages, such as the scyphozoan *Aurelia* [60], whose polyps are less simple than those of *Clytia*, will show if the expansion of cell type and morphological complexity in the medusa phase has similarly been offset by reduction of key developmental gene usage in planula and polyp stages.

Methods

Animals and extraction of genomic DNA.

A 3-times self-crossed strain $(Z4C)^2$ (male) was used for genomic DNA extraction, aiming to reduce polymorphisms. The first wild-type Z-strain colony was established using jellyfish sampled in the bay of Villefranche-sur-Mer (France). Sex in *Clytia* is influenced by temperature [61] and some young polyp colonies can produce both male and female medusae. Male and female medusae from colony Z were crossed to make colony Z^2. Two further rounds of self-crossing produced $(Z4C)^2$ (see Supplementary Fig. 1 for relationships between colonies). For *in situ* hybridization (and other histological staining) we used a female colony Z4B, a male colony Z10 (offspring of $(Z4C)^2$ x Z4B) as well as embryos produced by crossing Z10 and Z4B strains. $(Z4C)^2$, Z4B and Z10 are maintained as vegetatively growing polyp colonies. For chromosome number determination we performed confocal (Leica SP5) microscopy of isolated fully grown oocytes, in which the duplicated and paired chromosomes are strongly condensed even before meiotic maturation. We stained oocytes with Hoechst dye 33258 and anti-tubulin antibody YL1/2 after fixation in 4% formaldehyde in HEM buffer [15] or after fixation in methanol at 20°C.

For genomic DNA extraction mature $(Z4C)^2$ medusae were cultured in artificial sea water (RedSea Salt, 37‰ salinity) then in Millipore filtered artificial sea water containing penicillin and streptomycin for 3 to 4 days. They were starved for at least 24 hours. Medusae were snap frozen in liquid nitrogen, ground with mortar and pestle into powder then transferred into a 50 ml Falcon tubes (roughly 50~100 jellyfish/tube). About 20 ml of DNA extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.0 and 20 mM EDTA, 0.5 mg/ml proteinase K and 0.1% SDS) were added and incubated at 50°C for 3 hours until the solution became uniform and less viscous. An equal volume of phenol was added, vortexed for 1 minute, centrifuged for 30 minutes at 8000 g, then supernatant was transferred to a new tube. This extraction process was repeated using chloroform. X1/10 volume of 5M NaCl then 2.5 volumes of ethanol were added to the supernatant before centrifugation for 30 min at 8000 g. The DNA precipitate was rinsed with 70% ethanol, dried and dissolved into distilled water. 210 µg of DNA was obtained from 270 male medusae.

Genome sequencing and assembly.

Libraries for Illumina & 454 sequencing were prepared by standard methods (full details in supplementary methods).

Sequence files were error corrected using Musket [62] and assembled using SOAPdenovo2 [63] with a large kmer size of 91 in an effort to separate haplotypes at this stage. We subsequently used Haplomerger2 to collapse haplotypes to a single more contiguous assembly [64].

We performed further genomic scaffolding using a *de novo* transcriptome assembly. We assembled all RNA-Seq libraries (see below) with Trinity (r20140717) using 'normalize' and 'trimmomatic' flags, with other parameters as defaults [65]. Further scaffolding was done using L_RNA_Scaffolder with these transcript sequences [66]. Within the work reported here, this transcriptome was used as the basis for additional genomic scaffolding, and the spliced-leader sequence analysis, but not for further analyses.

RNA extraction and transcriptome sequencing.

RNA samples were prepared from Z4B female and Z10 male medusae and polyps, as well as embryos generated by crossing these medusae. Animals were starved for at least 24 hours before extraction and kept in Millipore filtered artificial sea water containing penicillin and streptomycin. Then they were put in the lysis buffer (Ambion, RNAqueous® MicroKit), vortexed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until RNA preparation.

Total RNA was prepared from each sample using the RNAqueous® Microkit or RNAqueous® (Ambion). Treatment with DNase I (Q1 DNAse, Promega) for 20 min at 37°C (2 units per sample) was followed by purification using the RNeasy minElute Cleanup kit (Qiagen). See supplementary Tab. 6 for total RNA (evaluated using Nanodrop). RNA quality of all samples was checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer. The samples used to generate the expression data presented in Fig. 3a are described in Supplementary Tab. 6-9. For the 'mix' sample , purification of mRNA and construction of a non-directional cDNA library were performed by GATC Biotech®, and sequencing was performed on a HiSeq 2500 sequencing system (paired-end 100 cycles). For the other samples, purification of mRNA and construction of a non-directional cDNA library were performed by USC Genomics Center using the Kapa RNA library prep kit, and sequencing was performed using either HiSeq 2500 (single read 50 cycles) or NextSeq (single read 75 cycles).

Gene prediction and transcript prediction.

Genes were predicted from transcriptome data. Using tophat2, we mapped single end RNA-seq reads from libraries of early gastrula; 1, 2 and 3 day old planula; stolon, polyp head, gonozooid, baby medusa, mature medusa, male medusa (this study); growing oocyte and fully grown oocyte to the genomic sequence [15,67]. In addition we mapped a mixed library made from the above samples but sequenced with 100bp paired end reads, and a further mature medusa library (100bp paired end). Genes were then predicted from these mappings using cufflinks and cuffmerge [68]. Proteins were predicted from these structures using Transdecoder, with Pfam hit retention [69,70], and the protein encoded with the most exons taken as a representative for gene level analyses.

Where genes are reported as lost, we performed additional tblastn searches of representative sequences from other species directly against the *Clytia* genome sequence to confirm absence from our data [71].

Spliced-leader sequences.

A list of spliced leader sequences (short RNA leader sequences added to the 5' ends of messenger RNAs by trans-splicing) was previously identified in *Clytia* using EST data [17]. Spliced-leader sequences were searched in the Trinity transcriptome assembly (see above) following the same method as previously [17]. Common sequences of at least 12 nt present at the 5' end of at least 3 transcripts were selected and aligned manually in order to establish a list of putative spliced-leader sequences.

Repetitive elements.

A library of *de novo* identified repetitive elements was created using RepeatScout (v1.05) [72]. Elements were classified using blastn searches against RepBase (20170127), nhmmer searches against Dfam, and hits in the *Clytia* genome identified using RepeatMasker [73].

Protein data sets.

We constructed a database of metazoan protein coding genes from complete genomes, including the major bilaterian phyla, all non-bilaterian animal phyla (including 6 cnidarian species) and unicellular eukaryotic outgroups. For the majority of species, we used annotation from NCBI, and selected one representative protein per gene, to facilitate subsequent analyses (Supplementary Tab. 10). We used the proteins as the basis for an OMA analysis to identify orthologous groups, version 2.1.1, using default parameters [74]. We converted the OMA gene OrthologousMatrix.txt file into Nexus format with datatype=restriction and used it as the basis for a MrBayes analysis (v3.2.6 25/11/2015), using corrections for genes present in fewer than 2 taxa 'lset coding=noabsencesites|nosingletonpresence', and a discrete gamma distribution with four site categories 'lset rates=gamma', as described in [20]. We performed 4 MrBayes runs and assessed convergence of chains in each run as an average standard deviation of split frequencies < 0.01 (3 out of 4 runs, with all 4 runs showing the same main topology). The resulting tree was then used in a subsequent OMA run to produce Hierarchical Orthologous Groups (HOGs). These HOGs were used as the basis for the phylogenetic classification of *Clytia* genes into one category out of eukaryotic, holozoan, metazoan, planulozoan, cnidarian or hydrozoan, based on the broadest possible ranking of the constituent proteins. Genes were presumed to have evolved in the most recent common ancestor of extant leaves, and leaves under this node where the gene was not present were presumed to be losses, with the minimum number of losses inferred to explain the observed presence and absence. *Clytia* specific genes were identified as those whose encoded proteins had no phmmer hits to the set of proteins used in the OMA analysis.

Where specific genes are named in the text, orthology assignments were taken from classical phylogenetic analysis (or in a few cases pre-existing sequence database names). Signature domains (e.g. Homeobox, Forkhead, T-box, HLH) were searched against the protein set using Pfam HMM models and hmmsearch of the hmmer3 package, with the database supplied 'gathering' threshold cutoffs [75,76]. Sequence hits were extracted and aligned with MAFFT [77] and a phylogeny reconstructed using RAxML with the LG model of protein evolution and gamma correction [78].

Transcription factors were assigned via matches beneath the 'gathering' threshold to Pfam domains contained in the transcriptionfactor.org database [79], with the addition of MH1, COE1_DBD, BTD, LAG1-DNAbind and HMG_Box Pfam models.

Ectopleura larynx proteins were predicted with Transdecoder, including Pfam hit retention, from Trinity assembled reads (v.2.4.0; SRA accessions SRR923510_1 and SRR923510_2) [65,70].

Synteny analyses.

Genes were ordered on their scaffolds (using the GFF files described in Supplementary Tab. 10) based on the average of their start and end position, and for each gene, the adjacent genes recorded, ignoring order and orientation but respecting boundaries between scaffolds (i.e. terminal genes had only one neighbour). Between species comparisons were performed using the Orthologous Groups from OMA, to avoid ambiguity from 1:many and many:many genes. When both members of an adjacent pair in one species were orthologous to the members of an adjacent pair in the other species, two genes were recorded as being involved in a CAPO (Conserved Adjacent Pair of Orthologs). A consecutive run of adjacent pairs (i.e. a conserved run of 3 genes) would thus be two pairs, but count as 3 unique genes. Significance was assessed by performing the same analyses 100 times with a randomized *Clytia* gene order.

RNA-Seq analyses and stage specific expression.

RNA-seq reads were aligned to the genome using STAR (2.5.3a) with default mapping parameters [80]. Counts of reads per gene were obtained using HTSeq-count [81]. Gene level counts were further analyzed using the DESeq2 R package [82]. An estimate of the mode of row geometric means (rather than the default median) was used to calculate size factors. PCA and heatmaps were generated using regularized logarithms of counts (DESeq2 'rlog' with blind = F). Bootstrapped hierarchical clustering was performed with pvclust using the default parameters [83]. To identify genes whose expression is restricted to particular stages we used a two step procedure. We first analyzed absolute expression levels, using an approach outlined below, and identified genes that were 'on' (as opposed to 'off') in a particular library. We then filtered this list to ensure that genes that were 'on' showed a statistically significant 'up' log-fold change of expression level, relative to their 'off' stages, using standard RNA-seq approaches [82]. Planula stages were defined as any of early gastrula, 1,2 or 3 day old planula; polyp any of stolon, primary polyp, polyp head; medusa any of baby medusa, mature medusa or male medusa. The gonozooid library was ignored in this classification as inspection of its expressed genes (and PCA) indicates that it is, as expected, a composite of polyp and medusa stages. For the 'on/off' analysis, frequency plots of our log transformed expression data revealed bimodal distribution patterns (see Fig 3c and Supplementary 7). Following Hebenstreit and Teichmann [40] we fitted the the length normalized rlog -transformed gene expression datasets for each library, averaged over replicates, to a mixture of two Gaussian distributions using the mixmodel R package [84]. The total number of 'on' genes for a given library is estimated by multiplying the mixing proportion (lambda) of the 'on' (i.e. high expression) peak by the total number of genes fitted. Individual genes were defined as 'on' if they had a posterior probability > 0.5 of coming from the more highly expressed distribution. The gene was then classified as 'on' in a stage (i.e. planula, polyp, medusa) if any of the component libraries of that stage (e.g. EG, P1, P2 or P3 for planula) showed expression of that gene. Genes that were not exclusively 'off' or exclusively 'on' were then also filtered by a log-fold change analysis performed using all genes. Significant differences in gene expression were calculated via pairwise contrasts of all different 'conditions' (i.e. replicated libraries). In order to be considered 'up' in planula, polyp or medusa, a gene needed to be significantly up (lfc threshold = 0.0, alt hypothesis = 'greater') in at least one 'condition' of that stage relative to all 'conditions' of one or both of the other stages, requiring the DESeq2 adjusted $P<0.001$ across multiple pairwise comparisons. For example, if a gene was significantly more highly expressed in one day old planula (P1) than all constituent medusa or polyp stages, it was considered 'up' in planula.

This combined approach addresses two issues. Firstly, we avoid the choice of an arbitrary FPKM (Fragments per Kilobase per Million mapped reads) type value as an indicator of expression. Our frequency-distribution based approach defines gene 'on' or 'off' states independently of the total numbers of distinct transcripts expressed in a given sample, unlike FPKM values which are a measure of concentration and so for similarly expressed genes will be relatively higher for 'off' genes in samples with low overall complexity. Secondly log-fold change analyses in themselves are not reliable indicators of specificity in the sense that we are interested in, as they deal with relative expression levels: a gene could show a statistically significant difference and still be clearly expressed in both stages, if for example it has an expression level of 5 log units in stage a and 10 log units in stage b. Such differences are expected, owing to very different cellular composition between life-cycle stages. By combining these two approaches we identify genes with rigorous evidence for significant differential expression with a more easily interpretable biological meaning.

GO term enrichment.

GO terms were assigned via sequence hits to the PANTHER database using the supplied 'pantherScore2.0.pl' program. Term enrichment was tested using the 'Ontologizer' software with a 'Parent-Child-Union' calculation (the default) and Bonferroni multiple testing correction [85].

In situ hybridization.

In situ hybridization probes were synthesized from multiple types of templates, either pGEM-T Easy plasmids (following one or two rounds of insert amplification), PCR products (reverse primer comprised a T7 promoter) or EST clones [48]; see Supplementary Tab. 11 for further details. In situ hybridization was performed as previously described [86], on two-week old female medusae. Images were taken on either Zeiss Axio Imager 2 or Olympus BX61 microscopes, and processed with ImageJ 1.47v and Adobe Photoshop CS6.

Life Sciences Reporting Summary

Further information on experimental design is available in the Life Sciences Reporting Summary.

Data availability

Sequence data have been deposited at EBI under Bioproject accessions PRJEB28006 and PRJEB30490. Data downloads and a genome browser are available at http://marimba.obs-vlfr.fr/organism/Clytia/hemisphaerica (see Supplementary Section 2). There are no restrictions on data. A data archive for repeats, phylogeny and expression analysis is available at: doi:10.5281/zenodo.1470435

References

1. Koizumi, O. *et al.* The nerve ring in cnidarians: its presence and structure in hydrozoan medusae. *Zoology* **118**, 79–88 (2015).
2. Hyman, L. H. *The invertebrates: protozoa through ctenophora*. (McGraw-Hill Book Company, 1940).
3. Zapata, F. *et al.* Phylogenomic Analyses Support Traditional Relationships within Cnidaria. *PLoS One* **10**, e0139068 (2015).
4. Kayal, E. *et al.* Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits. *BMC Evol. Biol.* **18**, 68 (2018).
5. Kraus, J. E. M., Fredman, D., Wang, W., Khalturin, K. & Technau, U. Adoption of conserved developmental genes in development and origin of the medusa body plan. *Evodevo* **6**, 23 (2015).
6. Sanders, S. M. & Cartwright, P. Interspecific Differential Expression Analysis of RNA-Seq Data Yields Insight into Life Cycle Variation in Hydractiniid Hydrozoans. *Genome Biol. Evol.* **7**, 2417–2431 (2015).
7. Sanders, S. M. & Cartwright, P. Patterns of Wnt signaling in the life cycle of Podocoryna carnea and its implications for medusae evolution in Hydrozoa (Cnidaria). *Evol. Dev.* **17**, 325–336 (2015).
8. Leclère, L., Copley, R. R., Momose, T. & Houliston, E. Hydrozoan insights in animal development and evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **39**, 157–167 (2016).
9. Putnam, N. H. *et al.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **317**, 86–94 (2007).
10. Shinzato, C. *et al.* Using the Acropora digitifera genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* **476**, 320–323 (2011).
11. Baumgarten, S. *et al.* The genome of Aiptasia, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11893–11898 (2015).
12. Chapman, J. A. *et al.* The dynamic genome of Hydra. *Nature* **464**, 592–596 (2010).
13. Momose, T. *et al.* High doses of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein efficiently induce gene knockout with low mosaicism in the hydrozoan Clytia hemisphaerica through microhomology-mediated deletion. *Sci. Rep.* **8**, 11734 (2018).
14. Houliston, E., Momose, T. & Manuel, M. Clytia hemisphaerica: a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends Genet.* **26**, 159–167 (2010).
15. Quiroga Artigas, G. *et al.* A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish Clytia. *Elife* **7**, (2018).
16. Waterhouse, R. M. *et al.* BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and

phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.* (2017). doi:10.1093/molbev/msx319
17. Derelle, R. *et al.* Convergent origins and rapid evolution of spliced leader trans-splicing in metazoa: insights from the ctenophora and hydrozoa. *RNA* **16**, 696–707 (2010).
18. Kayal, E. *et al.* Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians. *Genome Biol. Evol.* **4**, 1–12 (2012).
19. Nishihara, H., Plazzi, F., Passamonti, M. & Okada, N. MetaSINEs: Broad Distribution of a Novel SINE Superfamily in Animals. *Genome Biol. Evol.* **8**, 528–539 (2016).
20. Pisani, D. *et al.* Genomic data do not support comb jellies as the sister group to all other animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15402–15407 (2015).
21. Whelan, N. V. *et al.* Ctenophore relationships and their placement as the sister group to all other animals. *Nat Ecol Evol* **1**, 1737–1746 (2017).
22. Feuda, R. *et al.* Improved Modeling of Compositional Heterogeneity Supports Sponges as Sister to All Other Animals. *Curr. Biol.* **27**, 3864–3870.e4 (2017).
23. García-García, M. J. & Anderson, K. V. Essential role of glycosaminoglycans in Fgf signaling during mouse gastrulation. *Cell* **114**, 727–737 (2003).
24. Fourrage, C., Swann, K., Gonzalez Garcia, J. R., Campbell, A. K. & Houliston, E. An endogenous green fluorescent protein-photoprotein pair in Clytia hemisphaerica eggs shows co-targeting to mitochondria and efficient bioluminescence energy transfer. *Open Biol.* **4**, 130206 (2014).
25. Lowe, C. J. *et al.* Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* **113**, 853–865 (2003).
26. Holland, L. Z. *et al.* Evolution of bilaterian central nervous systems: a single origin? *Evodevo* **4**, 27 (2013).
27. Matus, D. Q. *et al.* Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11195–11200 (2006).
28. Ryan, J. F. *et al.* Pre-bilaterian origins of the Hox cluster and the Hox code: evidence from the sea anemone, Nematostella vectensis. *PLoS One* **2**, e153 (2007).
29. Rentzsch, F., Guder, C., Vocke, D., Hobmayer, B. & Holstein, T. W. An ancient chordin-like gene in organizer formation of Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3249–3254 (2007).
30. Genikhovich, G. & Technau, U. On the evolution of bilaterality. *Development* **144**, 3392–3404 (2017).
31. Simakov, O. *et al.* Hemichordate genomes and deuterostome origins. *Nature* **527**, 459–465 (2015).
32. Hartl, M. *et al.* Stem cell-specific activation of an ancestral myc protooncogene with conserved basic functions in the early metazoan Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4051–4056 (2010).
33. Irimia, M. *et al.* Extensive conservation of ancient microsynteny across metazoans due to cis-regulatory constraints. *Genome Res.* **22**, 2356–2367 (2012).
34. Chourrout, D. *et al.* Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements. *Nature* **442**, 684–687 (2006).
35. Kamm, K., Schierwater, B., Jakob, W., Dellaporta, S. L. & Miller, D. J. Axial patterning and diversification in the cnidaria predate the Hox system. *Curr. Biol.* **16**, 920–926 (2006).
36. Sullivan, J. C., Ryan, J. F., Mullikin, J. C. & Finnerty, J. R. Conserved and novel Wnt clusters in the basal eumetazoan Nematostella vectensis. *Dev. Genes Evol.* **217**, 235–239 (2007).
37. Chiori, R. *et al.* Are Hox genes ancestrally involved in axial patterning? Evidence from the hydrozoan Clytia hemisphaerica (Cnidaria). *PLoS One* **4**, e4231 (2009).
38. Shimeld, S. M., Degnan, B. & Luke, G. N. Evolutionary genomics of the Fox genes: origin of gene families and the ancestry of gene clusters. *Genomics* **95**, 256–260 (2010).
39. Mazza, M. E., Pang, K., Reitzel, A. M., Martindale, M. Q. & Finnerty, J. R. A conserved cluster of three PRD-class homeobox genes (homeobrain, rx and orthopedia) in the Cnidaria and Protostomia. *Evodevo* **1**, 3 (2010).
40. Hebenstreit, D. *et al.* RNA sequencing reveals two major classes of gene expression levels in metazoan cells. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 497 (2011).
41. Mackie, G. O., Singla, C. L. & Stell, W. K. Distribution of nerve elements showing FMRFamide-like immunoreactivity in hydromedusae. *Acta Zool.* **66**, 199–210 (1985).
42. Takeda, N. *et al.* Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as oocyte maturation-inducing hormones. *Development* **145**, (2018).
43. Kerk, S. Y., Kratsios, P., Hart, M., Mourao, R. & Hobert, O. Diversification of C. elegans Motor Neuron Identity via Selective Effector Gene Repression. *Neuron* **93**, 80–98 (2017).
44. Jager, M., Quéinnec, E., Le Guyader, H. & Manuel, M. Multiple Sox genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan Clytia hemisphaerica. *Evodevo* **2**, 12 (2011).
45. Rentzsch, F., Layden, M. & Manuel, M. The cellular and molecular basis of cnidarian

neurogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **6**, (2017).
46. Sinigaglia, C., Busengdal, H., Leclère, L., Technau, U. & Rentzsch, F. The bilaterian head patterning gene six3/6 controls aboral domain development in a cnidarian. *PLoS Biol.* **11**, e1001488 (2013).
47. Marlow, H. *et al.* Larval body patterning and apical organs are conserved in animal evolution. *BMC Biol.* **12**, 7 (2014).
48. Chevalier, S., Martin, A., Leclère, L., Amiel, A. & Houliston, E. Polarised expression of FoxB and FoxQ2 genes during development of the hydrozoan Clytia hemisphaerica. *Dev. Genes Evol.* **216**, 709–720 (2006).
49. Lapébie, P. *et al.* Differential responses to Wnt and PCP disruption predict expression and developmental function of conserved and novel genes in a cnidarian. *PLoS Genet.* **10**, e1004590 (2014).
50. Bodo, F. & Bouillon, J. Étude histologique du développement embryonnaire de quelques hydroméduses de Roscoff: Phialidium hemisphaericum (L.), Obelia sp. Péron et Lesueur, Sarsia eximia (Allman), Podocoryne carnea (Sars), Gonionemus vertens Agassiz. *Cah. Biol. Mar.* (1968).
51. Leclère, L. & Rentzsch, F. RGM regulates BMP-mediated secondary axis formation in the sea anemone Nematostella vectensis. *Cell Rep.* **9**, 1921–1930 (2014).
52. Martindale, M. Q., Pang, K. & Finnerty, J. R. Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone Nematostella vectensis (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development* **131**, 2463–2474 (2004).
53. Steinmetz, P. R. H., Aman, A., Kraus, J. E. M. & Technau, U. Gut-like ectodermal tissue in a sea anemone challenges germ layer homology. *Nat Ecol Evol* **1**, 1535–1542 (2017).
54. Röttinger, E., Dahlin, P. & Martindale, M. Q. A framework for the establishment of a cnidarian gene regulatory network for 'endomesoderm' specification: the inputs of ß-catenin/TCF signaling. *PLoS Genet.* **8**, e1003164 (2012).
55. Simion, P. *et al.* A Large and Consistent Phylogenomic Dataset Supports Sponges as the Sister Group to All Other Animals. *Curr. Biol.* **27**, 958–967 (2017).
56. Saina, M., Genikhovich, G., Renfer, E. & Technau, U. BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18592–18597 (2009).
57. Genikhovich, G. *et al.* Axis Patterning by BMPs: Cnidarian Network Reveals Evolutionary Constraints. *Cell Rep.* (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.02.035
58. He, S. *et al.* An axial Hox code controls tissue segmentation and body patterning in Nematostella vectensis. *Science* **361**, 1377–1380 (2018).
59. Manuel, M. Early evolution of symmetry and polarity in metazoan body plans. *C. R. Biol.* **332**, 184–209 (2009).
60. Gold, D. A. *et al.* The genome of the jellyfish Aurelia and the evolution of animal complexity. *Nat Ecol Evol* **3**, 96–104 (2019).
61. Carré, D. & Carré, C. Origin of germ cells, sex determination, and sex inversion in medusae of the genus Clytia (Hydrozoa, leptomedusae): the influence of temperature. *J. Exp. Zool.* **287**, 233–242 (2000).
62. Liu, Y., Schröder, J. & Schmidt, B. Musket: a multistage k-mer spectrum-based error corrector for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **29**, 308–315 (2013).
63. Luo, R. *et al.* SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* **1**, 18 (2012).
64. Huang, S., Kang, M. & Xu, A. HaploMerger2: rebuilding both haploid sub-assemblies from high-heterozygosity diploid genome assembly. *Bioinformatics* **33**, 2577–2579 (2017).
65. Grabherr, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 644–652 (2011).
66. Xue, W. *et al.* L_RNA_scaffolder: scaffolding genomes with transcripts. *BMC Genomics* **14**, 604 (2013).
67. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36 (2013).
68. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578 (2012).
69. Haas, B. J. *et al.* De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **8**, 1494–1512 (2013).
70. *TransDecoder*. (Github).
71. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
72. Price, A. L., Jones, N. C. & Pevzner, P. A. De novo identification of repeat families in large genomes. *Bioinformatics* **21 Suppl 1**, i351–8 (2005).

73. SMIT & A., F. A. Repeat-Masker Open-3.0. *http://www.repeatmasker.org* (2004).
74. Train, C.-M., Glover, N. M., Gonnet, G. H., Altenhoff, A. M. & Dessimoz, C. Orthologous Matrix (OMA) algorithm 2.0: more robust to asymmetric evolutionary rates and more scalable hierarchical orthologous group inference. *Bioinformatics* **33**, i75–i82 (2017).
75. Eddy, S. R. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002195 (2011).
76. Finn, R. D. *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* **44**, D279–85 (2016).
77. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780 (2013).
78. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
79. Wilson, D., Charoensawan, V., Kummerfeld, S. K. & Teichmann, S. A. DBD--taxonomically broad transcription factor predictions: new content and functionality. *Nucleic Acids Res.* **36**, D88–92 (2008).
80. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
81. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
82. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
83. Suzuki, R. & Shimodaira, H. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* **22**, 1540–1542 (2006).
84. Benaglia, T., Chauveau, D., Hunter, D. & Young, D. mixtools: An R package for analyzing finite mixture models. *J. Stat. Softw.* **32**, 1–29 (2009).
85. Bauer, S., Grossmann, S., Vingron, M. & Robinson, P. N. Ontologizer 2.0--a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics* **24**, 1650–1651 (2008).
86. Sinigaglia, C., Thiel, D., Hejnol, A., Houliston, E. & Leclère, L. A safer, urea-based in situ hybridization method improves detection of gene expression in diverse animal species. *Dev. Biol.* **434**, 15–23 (2018).
87. Kubota, S. The life-history of Clytia edwardsi (Hydrozoa; Campanulariidae) in Hokkaido, Japan. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser.* **21**, 317–354 (1978).

Acknowledgments

We thank Danielle Carré, who first suggested that *Clytia hemisphaerica* would be a convenient cnidarian species for experimentation, and isolated our founder adult medusae from the Villefranche plankton. We thank Iain Mathieson (UPenn) and Richard Mott (UCL) for statistical advice, and S. Collet, L Gissat and L. Gilletta for animal maintenance. Initial sequencing was funded directly by the Genoscope-CEA. Other funding was provided by the CORBEL European Research Infrastructure cluster project, grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV2-0008 "OOCAMP" and ANR-13-PDOC-0016 "MEDUSEVO"), a Marie Curie training network (FP7-PEOPLE-2012-ITN 317172 "NEPTUNE"), a grant of the Austrian Science Fund (FWF; P27353) to U.T., EMBRC-France (ANR-10-INBS-0002), André Picard Network, as well as core CNRS and Sorbonne University funding to the LBDV. Part of the imaging was performed at the Villefranche-sur mer imaging platform (PIV).

Author Contributions

R.R.C., L.L. and E.H. conceived the study, contributed to the analyses and wrote the paper. R.R.C. assembled the genome and performed the initial RNA-seq analysis. L.L., R.R.C. and C.S. prepared the figures. C.H. generated the Marimba database. All the authors contributed to data generation and/or analyses.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

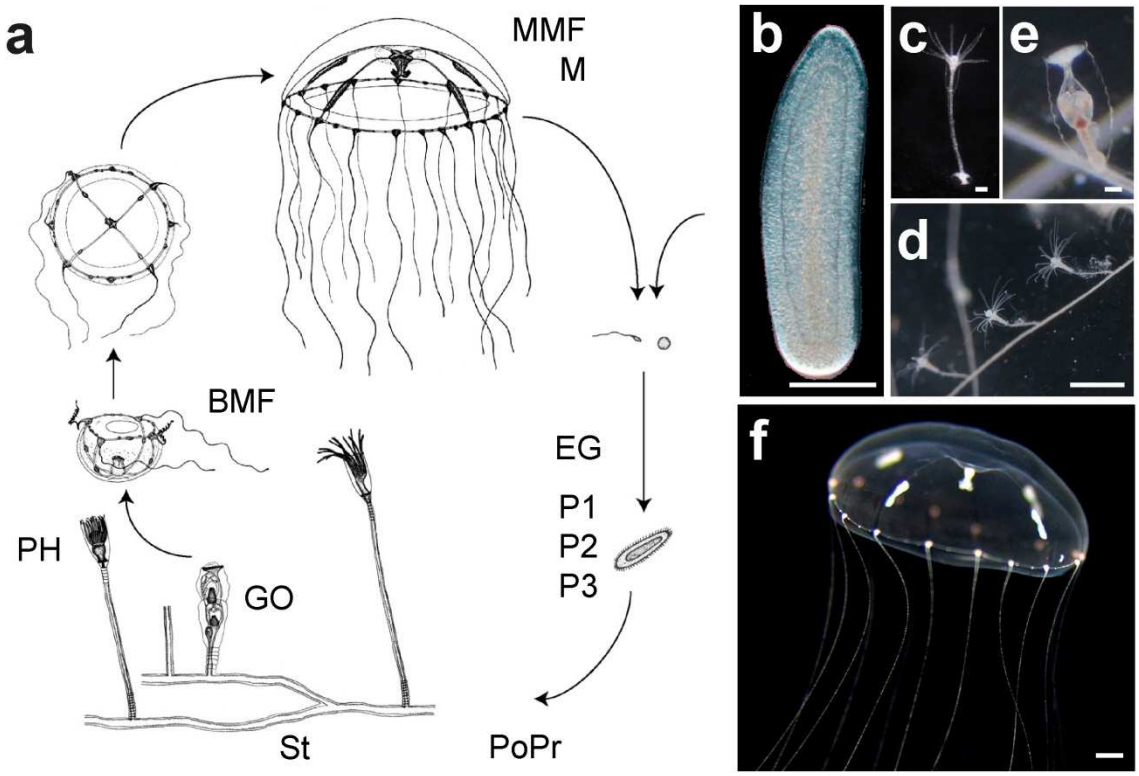


Figure 1. **The *Clytia hemisphaerica* life cycle.** In the *Clytia* life cycle (a), the planula larva (b) develops from a fertilized egg, and metamorphoses into a primary polyp (c). The polyp then extends asexually forming a colony composed of (d) feeding polyps (gastrozooids) attached through a common stolon, and gonozooids (e) that release swimming medusae (f). Scale bars, b,c,e: 100µm; d,f: 1mm. Abbreviations in (a) correspond to the mRNA libraries in Supplementary Tab. 6 : EG: early gastrula; P1/P2/P3: Planula 24h-post-fertilization/48hpf/72hpf; PoPr: Primary polyp; St: Stolon: GO: Gonozooid: PH: Gastrozooid/Polyp head; BMF: Baby Female Medusae 1d old: MMF: Mature Female Medusa; M: Mature Male Medusa. Drawings in (a) adapted from [87] with permission, (b,f) adapted from [14] with permission.

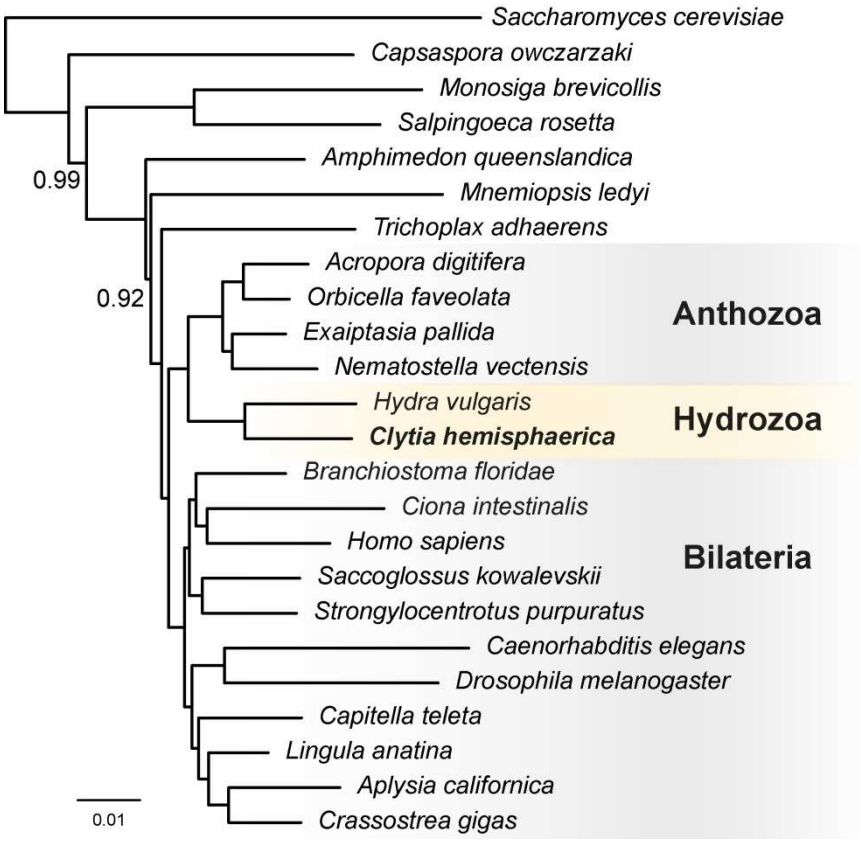


Figure 2. Bayesian phylogeny inferred using presence and absence of orthologous genes. The tree was rooted with *Saccharomyces cerevisiae*. All nodes have a posterior probability of 1 unless indicated. A binary restriction site model and discrete gamma distribution with four site rate categories was used in conjunction with an ascertainment bias correction. See methods for details.

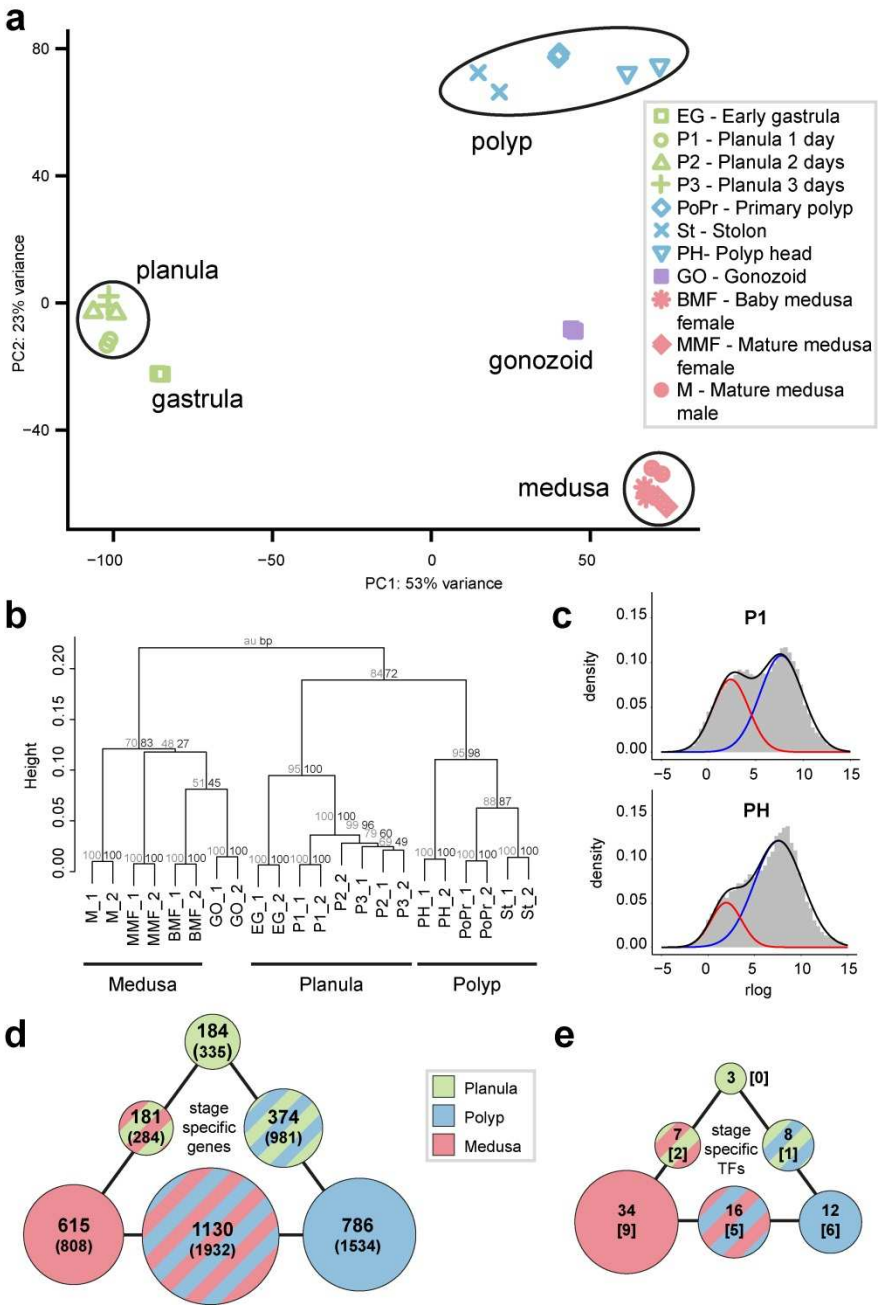


Figure 3. Gene expression data identifies major life cycle stages. (a) PCA of all libraries from staged mRNA samples. (b) Distance based clustering of all libraries. AU/BP values are 100 for all nodes unless indicated. Library names are as described in Fig. 1 and methods. (c) Gene expression levels can be partitioned into 'on' and 'off' categories. Red and blue lines show fitted log-normal distributions and the black line their sum. The blue lines represents genes that we describe as 'on', and the red 'off'. Grey bars correspond to the empirically observed distribution of expression levels. Two example libraries are shown here, P1 and PH. All sample distributions are shown in Supplementary Fig. 7. (d,e) Numbers of *Clytia* genes specific to a single stage (vertices) and genes expressed in two out of three stages (edges). Circle area is proportional to the number of genes. In (d), top numbers correspond to the total of genes 'on and up' in a given stage and 'off' in the other stages. Lower bracketed numbers were obtained without the 'up' filter. In (e), number of stage specific TFs ('on and up' filtering) are indicated. Bracketed numbers correspond to homeodomain containing TFs. Abbreviations - EG: early gastrula; P1/P2/P3: Planula 24h-post-fertilization/48hpf/72hpf; PoPr: Primary polyp; St: Stolon: GO: Gonozooid: PH: Gastrozooid/Polyp head; BMF: Baby Female Medusae 1d old: MMF: Mature Female Medusa; M: Mature Male Medusa.

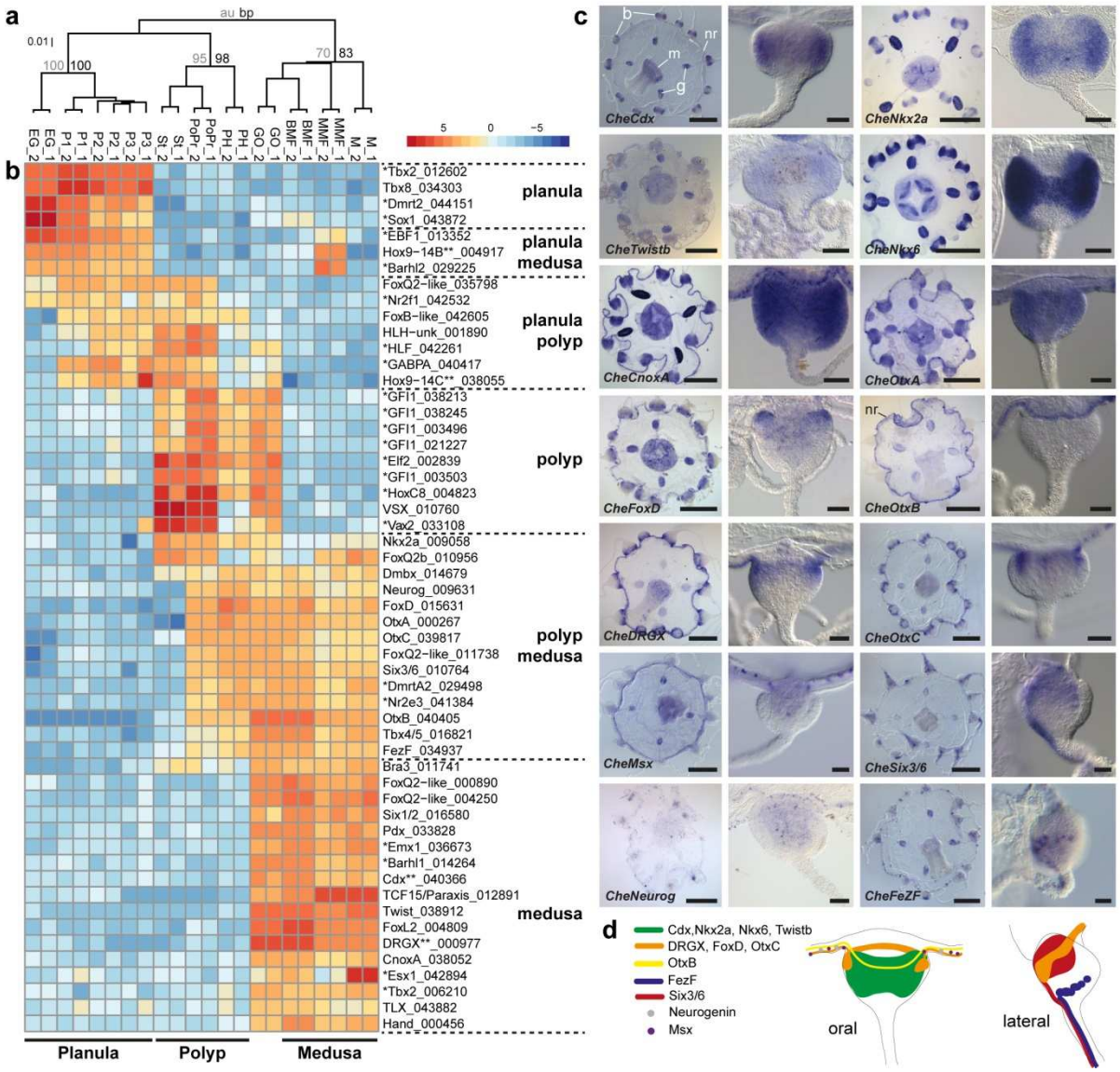


Figure 4. Transcription factors show stage-specific enrichment. (a) Clustering of libraries by transcription factor expression distances. n=505 transcription factors. AU/BP values shown. (b) Heatmap showing major classes of transcription factor differential expression. Gene names are taken from orthology assignments of this work. In cases where assignment was not clear, names preceded by * are taken from best human Blast hits. Those followed by ** are genes for which an assignment in *Clytia* existed in Genbank prior to this study (e.g. Cdx, DRGX). Trailing numbers are unique gene identifiers from this project. Expression units are rlog values from DESeq2 with the row means subtracted. Library names are as described in Fig. 1 and methods: EG: early gastrula; P1/P2/P3: Planula 24h-post-fertilization/48hpf/72hpf; PoPr: Primary polyp; St: Stolon: GO: Gonozooid: PH: Gastrozooid/Polyp head; BMF: Baby Female Medusae 1d old: MMF: Mature Female Medusa; M: Mature Male Medusa. (c) *in situ* hybridization of medusa enriched TFs; whole female medusa (left, scale bar: 500μm) and tentacle bulb (right, scale bar: 50μm). These show a variety of distributions in relation to prominent medusa organs (m: manubrium, g: gonad), and notably with the nerve rings that run around the bell rim and the associated tentacle bulbs (nr: nerve ring, b: bulb). (d) Oral and lateral view schematics of *Clytia* medusa tentacle bulbs indicating TF expression territories.

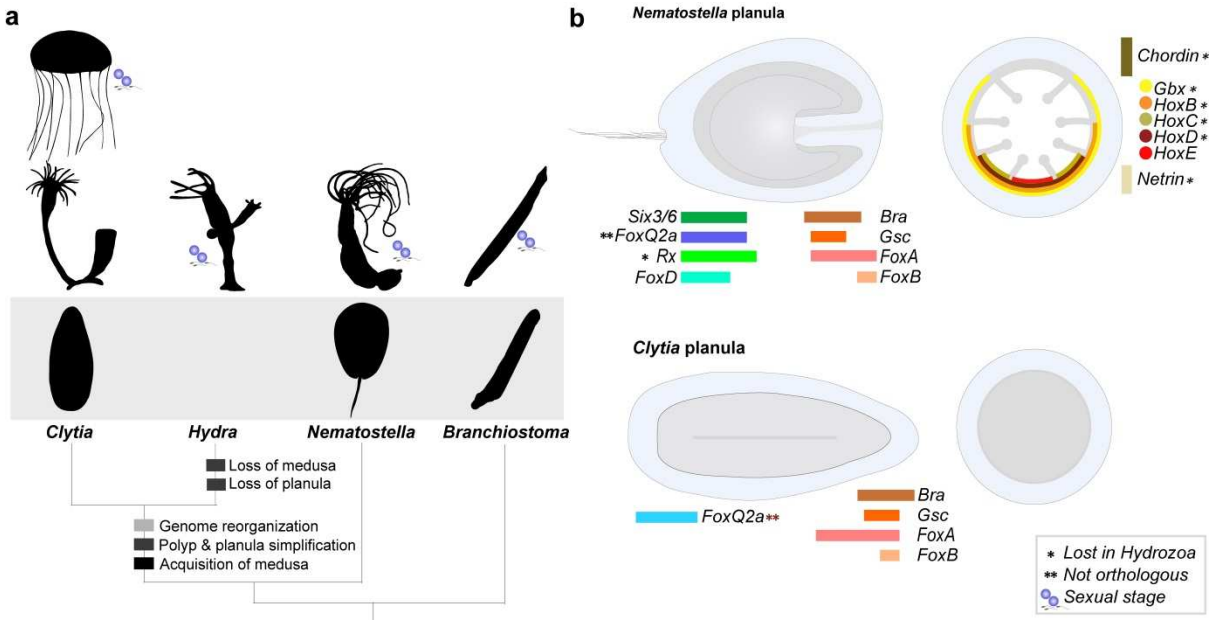


Figure 5. Simplification of polyp and planula stages in the hydrozoan lineage. (a) *Clytia hemisphaerica* displays the typical hydrozoan tri-phasic life cycle, comprising a planula larval stage (bottom), a colonial polyp stage (middle), and a sexually reproducing medusa form (top). Both planula and medusa stages have been lost in the *Hydra* lineage. Hydrozoan planulae and polyps are morphologically simpler than those of Anthozoa (e.g. *Nematostella*). The comparison of *Clytia* and *Hydra* genomes with that of *Nematostella* shows that the hydrozoan lineage underwent important genome reorganization (see discussion). (b) The planula larva of *Nematostella* (top) presents a well-defined endoderm and ectoderm, and bears an aboral apical organ. The eight internal mesenteries and the pharynx manifest the directive polarity axis, orthogonal to the oral-aboral one. A number of studies have identified a set of conserved transcription factors responsible for setting up the polarity axes and patterning the body. The *Clytia* planula (bottom) is radially symmetric and has a simpler morphology, with an ectodermal layer surrounding a mass of endodermal cells. Though the oral pole shares a set of developmental regulators with the planula of *Nematostella* (*Bra, Gsc, FoxA, FoxB*), the aboral pole appears to be highly divergent: expression of these known aboral transcription factors could not be detected – with the exception of *CheFoxQ2a* which does not belong to the *NvFoxQ2a* orthology group. Most of *Nematostella* directive axis regulators have been lost in Hydrozoa. Colored bars represent expression domains.