



HAL
open science

Rôle des protocadhérines dans la genèse des cellules stromales, composant majeur de la première niche d'hématopoïèse définitive chez le poisson zèbre

Anne-Lou Touret

► **To cite this version:**

Anne-Lou Touret. Rôle des protocadhérines dans la genèse des cellules stromales, composant majeur de la première niche d'hématopoïèse définitive chez le poisson zèbre. Biologie du développement. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS388 . tel-03626841

HAL Id: tel-03626841

<https://theses.hal.science/tel-03626841v1>

Submitted on 31 Mar 2022

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

École doctorale Complexité du Vivant ED515

UMR3738 Unité Macrophages et Développement de l'Immunité – Institut Pasteur

Rôle des protocadhérines dans la genèse des cellules stromales, composant majeur de la première niche d'hématopoïèse définitive chez le poisson zèbre.

Par Anne-Lou TOURET

Thèse de doctorat de Biologie du développement

Dirigée par Philippe HERBOMEL et co-encadrée par Emi MURAYAMA

Présentée et soutenue publiquement le 22 Septembre 2021

Devant un jury composé de :

Dr. Sylvie SCHNEIDER-MAUNOURY, Directrice de Recherche Inserm

Présidente

Dr. Jacky GOETZ, Directeur de Recherche Inserm

Rapporteur

Dr. Marc BAJENOFF, Directeur de Recherche CNRS

Rapporteur

Dr. Michèle CROZATIER-BORDE, Directrice de Recherche CNRS

Examinatrice

Dr. Charles DURAND, Professeur d'Université

Examinateur

Dr. Philippe HERBOMEL, Directeur de recherche CNRS

Directeur de thèse

A mon frère, en espérant devenir ce chercheur qui trouve.

Remerciements

La thèse est une expérience enrichissante durant laquelle on développe son expertise professionnelle grâce à une sensibilisation à la démarche scientifique, à l'esprit d'analyse et de réflexion, et permet aussi un développement personnel grâce à la rencontre de gens admirables. Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réussite ce travail et m'ont soutenue durant ces quatre années de doctorat.

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de consacrer du temps pour lire et évaluer mon travail. En particulier, mes rapporteurs M. Jacky Goetz et M. Marc Bajénoff qui me feront des retours sur la lecture du manuscrit ainsi qu'à mes examinateurs Mme. Sylvie Schneider-Maunoury, Mme. Michèle Crozatier-Borde et M. Charles Durand qui prendront part à la discussion lors de ma soutenance de thèse, et la rendront sans aucun doute passionnante.

Je souhaite également exprimer mes remerciements à mon directeur de thèse, M. Philippe Herbomel qui m'a accueilli dans son laboratoire et permis de travailler sur un très beau modèle de la biologie du développement, le poisson zèbre. J'étais depuis longtemps attirée par la microscopie optique et j'ai beaucoup apprécié les moments passés au microscope Nomarski à observer les différents types de cellules immunitaires durant mon stage de Master II. L'accès à du matériel de qualité pour effectuer la microscopie à fluorescence *in vivo* a été tout à fait bénéfique à la réalisation de ma thèse. Je souhaite aussi souligner votre implication quant à l'amélioration de la rédaction de ce manuscrit de thèse et je vous en remercie.

Un remerciement tout spécial à mon encadrante de thèse, Mme. Emi Murayama, qui m'a transmis sa passion pour la recherche et l'envie d'aller toujours plus loin. Nous avons décidé ensemble de présenter ce projet à l'école doctorale et Emi, je te remercie de m'avoir fait confiance. Ton envie d'explorer et d'aller en profondeur pour accéder aux détails m'a appris tant de choses et m'a donné cette étincelle qui m'a motivée pendant ces quatre années. J'ai aimé nos discussions, scientifiques ou quotidiennes, ta générosité, ta bienveillance. Cuisinière hors pair, tes délices japonais et tes gâteaux merveilleux me manqueront beaucoup.

Une dédicace particulière à mes collègues formidables. Une mention spécifique pour Catherine qui a été d'un réel soutien moral. Les pauses café et séances de sport de la « WISH

team » resteront inoubliables. Merci aussi à ton expertise au laboratoire, mes immunos et in situ n'ont jamais été aussi belles qu'avec tes conseils. Je me souviendrai de ces moments précieux et de nos rigolades. Il ne faudra pas pleurer quand je partirai car la petite doctorante est devenue grande et ce, en partie grâce à toi. Anne, merci pour ton expertise scientifique et tes suggestions qui ont permis de faire avancer le projet. Je remercie aussi Laurent, Jean-Pierre, Emma, Léa, Doris-Lou et Valerio pour les bons moments passés ensemble et nos discussions, aussi bien professionnelles qu'amicales. Sans les techniciens animaliers, je n'aurai tout simplement rien pu faire, et je souhaite, Yohann, Jocelyne et Noël, vous remercier pour le travail immense que vous fournissez tous les jours pour vous occuper de nos poissons si précieux. Mille mercis aux anciens membres du laboratoire : Mylène pour m'avoir initiée à la microscopie et avoir passé du temps avec moi lorsque je suis arrivée, Sara pour ta gentillesse infinie et ton altruisme, et Pedro pour tes propositions lors des réunions de labo, sans oublier tes talents musicaux.

Merci aussi aux membres de mon comité de thèse, Mme. Sylvie Schneider-Maunoury, M. Gael Moneron et M. Philippe Chavrier pour avoir suivi l'évolution de mes recherches, donné de bons conseils sur l'établissement de collaborations et aidé à clarifier mes idées.

Je n'aurai pas pu réaliser mon doctorat sans aides financières. Je souhaite remercier l'école doctorale Complexité du Vivant de Sorbonne Université pour m'avoir soutenue lors de mes trois premières années et le LabEx Revive pour avoir financé ma quatrième année de thèse, ce qui a été une aide immense pour l'aboutissement du projet.

La famille et les amis sont sans doute l'un des éléments les plus importants pour tenir émotionnellement et se changer les idées. La thèse n'est pas « un long fleuve tranquille », il y a des périodes de doutes et parfois, de découragements.

Merci à ma famille qui a su être là quand il fallait.

Merci à Alix, Flavien et Laure, thésards en même temps que moi.

Et enfin, un immense merci à mes amis de longue date. Vous m'avez soutenue sans relâche et pour cela je vous en serai éternellement reconnaissante.

Il paraît que je serai bientôt Docteure et que c'est en partie grâce à vous. Tout simplement merci.

Table des matières

RESUME.....	I
ABSTRACT	II
LISTE DES ABREVIATIONS.....	III
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	VI
INTRODUCTION	1
1. Le poisson zèbre – un modèle en biologie du développement	1
1.1. L’utilisation du poisson zèbre et ses avantages	1
1.1.1. Un organisme qui se prête à l’expérimentation en laboratoire.....	1
1.1.2. Des caractéristiques intéressantes pour la microscopie in vivo.....	4
1.2. Développement embryonnaire et parallèle avec les mammifères.....	8
1.2.1. Les premières étapes du développement embryonnaire.....	8
1.2.2. Les mécanismes de la somitogenèse	10
1.2.3. Neurulation et spécification des types cellulaires au sein du somite.....	12
2. Le rôle des molécules d’adhésion cellulaire lors du développement.....	15
2.1. Caractérisation des molécules d’adhésion cellulaire	15
2.1.1. La découverte des molécules d’adhésion cellulaire	15
2.1.2. Les différentes molécules d’adhésion cellulaire.....	16
2.2. La superfamille des cadhérines.....	17
2.2.1. Les cadhérines classiques.....	18
2.2.2. Les protocadhérines.....	21
2.2.3. Les protocadhérines $\delta 2$: PCDH10 et PCDH18.....	24
2.3. L’implication des molécules d’adhésion lors d’évènements morphogénétiques.....	27
2.3.1. Segmentation du mésoderme pré-somitique lors de la somitogenèse	27
2.3.2. La transition épithélio-mésenchymateuse	28
3. La migration cellulaire et sa régulation	31
3.1. Les mécanismes de la modulation de l’actine.....	31
3.1.1. La dynamique de l’actine et son contrôle.....	31
3.1.2. Les protrusions des cellules en migration	33
3.2. La migration cellulaire et ses régulations extrinsèques	35

3.2.1. Les mécanismes de la migration dirigée	36
3.2.2. La migration cellulaire collective et coordonnée	40
3.3. Migration cellulaire et formation de métastases lors des cancers.....	43
3.3.1. Invasion cellulaire et implication des chimiokines	44
3.3.2. Angiogenèse et implication des facteurs de croissance.....	45
3.3.3. Rôle de la matrice extracellulaire	46
4. L'hématopoïèse et les niches des cellules souches hématopoïétiques.....	48
4.1. Niches des cellules souches hématopoïétiques chez les mammifères	48
4.1.1. Les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines	48
4.1.2. Le foie fœtal, niche transitoire de l'hématopoïèse	50
4.1.3. Architecture de la moelle osseuse	52
4.1.4. Les cellules périvasculaires stromales réticulaires	55
4.2. Le tissu hématopoïétique caudal chez le poisson zèbre	57
4.2.1. L'hématopoïèse du poisson zèbre	57
4.2.2. Le développement du tissu hématopoïétique caudal	59
4.2.3. Régulation de l'hématopoïèse dans le tissu hématopoïétique caudal.....	60
4.2.4. Origine des cellules stromales.....	63
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	67
RESULTATS	69
1. Préliminaires.....	69
1.1. Contraintes et outils utilisés pour l'imagerie dynamique <i>in vivo</i> des processus étudiés.....	69
1.1.1. Imagerie de la migration des progéniteurs des cellules stromales	69
1.1.2. Imagerie du développement du tissu hématopoïétique caudal	72
1.2. Molécules d'adhésion potentiellement impliquées dans le développement des cellules stromales.....	73
1.2.1. pcdh10b et pcdh18a sont exprimés dans les progéniteurs des cellules stromales.....	74
1.2.2. Validation de l'efficacité des morpholinos utilisés	75
1.2.3. Manipulation difficile de pcdh10b	78
1.2.4. Pcdh18a, une cible prometteuse ?	81
2. Rôle de Pcdh18a dans le développement des cellules stromales	86
2.1. Trajectoires cellulaires et vitesses de migration	86
2.2. Dynamique de l'actine au cours de la migration cellulaire.....	88
2.2.1. Distribution et taille des filopodes.....	88
2.2.2. Mutation du domaine WIRS de Pcdh18a	91
2.3. Modulation des interactions entre cellules stromales	93

2.3.1. Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆ favorise la rétention des contacts entre cellules	93
2.3.2. La rupture des contacts homophiles ne modifie pas le développement de la niche	95
2.4. Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆ affecte la production des cellules stromales	98
2.4.1. Effet de Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆ sur la cinétique d'apparition des cellules stromales	98
2.4.2. Effet de Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆ sur le taux de division cellulaire.....	100
3. Implication de Pcdh18a dans le développement du tissu hématopoïétique caudal.....	103
3.1. Développement du plexus veineux caudal.....	103
3.2. Altération de l'angiogenèse et de la morphologie du plexus par l'expression de Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆	106
4. Maturation des cellules stromales et interaction avec les cellules endothéliales du plexus veineux	109
4.1. Implication de Pcdh18a dans la différenciation des cellules stromales	109
4.2. Impact de Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆ sur l'expression de pdgfr β	111
4.3. Nature moléculaire des contacts entre cellules stromales et endothéliales.....	114
5. Implication de la protéine de matrice extracellulaire fibronectine	117
5.1. La fibronectine permet de compartimenter le somite et d'isoler les progéniteurs.....	117
5.2. La fibronectine est surexprimée en condition Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆	118
5.3. Pcdh18a- Δ CP ₁₀₆ modifie le dépôt de fibronectine sur le plexus vasculaire.....	120
6. Conséquences sur le développement des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques dans le THC.....	123
DISCUSSION	125
PERSPECTIVES	137
MATERIELS ET METHODES	140
1. Elevage et maintien des lignées	140
1.1. Croisements.....	140
1.2. Traitement des embryons en vue des expériences	141
1.3. Maintien des larves destinées à l'élevage	141
1.4. Euthanasie des poissons adultes.....	142
1.5. Anesthésie des embryons	142
1.6. Fixation des embryons	143
1.7. Lignées transgéniques utilisées.....	143
2. Création des constructions génétiques par biologie moléculaire	144
2.1. Outils et traitement des séquences	144

2.2. Génération des fragments d'ADN par PCR et clonages intermédiaires	145
2.3. Création des vecteurs d'expression par clonage Gibson.....	146
3. Transgénèse et établissement de lignées stables	150
3.1. Synthèse de l'ARNm de la transposase	150
3.2. Etablissement d'une lignée transgénique stable.....	151
4. Micro-injection dans le zygote.....	152
4.1. Dispositif d'injection et préparation des capillaires.....	152
4.2. Injection des vecteurs d'expression	152
4.3. Activation de l'expression des constructions <i>hsp70</i> par choc thermique	153
4.4. Injection des morpholinos	153
5. PCR quantitative	155
5.1. Préparation des tissus provenant des embryons.....	155
5.2. Extraction d'ARN	155
5.3. Synthèse d'ADN complémentaire	156
5.4. Amorces pour la PCR quantitative et mesure de leur efficacité	157
5.5. Quantification par utilisation de SYBR green	158
5.6. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt	158
6. Marquages histologiques	159
6.1. Synthèse des sondes pour hybridation in situ	159
6.2. Hybridation in situ sur embryon entier	160
6.3. Immunohistochimie	162
6.4. Révélation de l'apoptose par la méthode TUNEL.....	164
7. Microscopie	165
7.1. Caractéristiques des microscopes utilisés	165
7.2. Montage des échantillons.....	166
7.3. Acquisitions au microscope confocal	167
7.4. Acquisitions au microscope confocal à disque tournant ou spinning disk	167
7.5. Acquisitions d'images de microscopie VE-DIC/Nomarski	168
7.6. Analyse d'images.....	168
7.6.1. Traitement des acquisitions	168
7.6.2. Détection des filopodes avec Filopodyan.....	168
8. Analyses statistiques.....	169
8.1. Graphiques et tests statistiques	169
8.2. Histogramme circulaire et modèle linéaire à effets mixtes.....	169

RÉFÉRENCES 171

ANNEXE - ARTICLE EN PREPARATION 186

Résumé

Les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CSPH) émergent à partir de l'aorte dorsale chez l'embryon de poisson zèbre, comme chez d'autres vertébrés. Elles entrent dans la circulation sanguine puis s'installent dans leur première niche, le tissu hématopoïétique caudal (THC), comparable en cela au foie fœtal des mammifères, où elles se multiplient et se différencient. Notre laboratoire a identifié les cellules stromales réticulaires (CSR) et le plexus veineux caudal comme les composants clés de la niche. La partie ventrale des somites caudaux donne naissance aux progéniteurs des cellules stromales, qui migrent ventralement avec les cellules endothéliales, pour constituer une niche hématopoïétique fonctionnelle. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus sont encore peu connus.

Les travaux de thèse présentés ici démontrent que la protocadhérine-18a (Pcdh18a), exprimée par les progéniteurs des cellules stromales, joue un rôle important dans leur migration, puis dans la formation de la niche hématopoïétique. La migration des cellules stromales, exprimant une Pcdh18a dont une majeure partie du domaine cytoplasmique est manquante (Pcdh18a- Δ CP₁₀₆), est compromise. Normalement, les projections des filopodes sont concentrées vers l'avant de la cellule, tandis que leur genèse est aléatoire chez les cellules exprimant Pcdh18a- Δ CP₁₀₆. De plus, les connexions cellulaires lors de leur migration semi-collective sont plus durables lorsque Pcdh18a est mutée. Ces résultats suggèrent que le domaine cytoplasmique de Pcdh18a est essentiel à la régulation de l'actine-F et qu'il est impliqué dans la médiation de la répulsion cellulaire.

Ensuite, les cellules stromales changent de partenaires de liaison et interagissent étroitement avec les cellules endothéliales qui vont former le plexus veineux. L'analyse *in vivo* a démontré que Pcdh18a est impliquée dans l'interaction physique des cellules stromales avec ces cellules endothéliales. L'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ par les cellules stromales altère le comportement des cellules endothéliales et la morphogenèse du plexus veineux, et conduit à une niche hématopoïétique non fonctionnelle. L'expression de la fibronectine 1b est fortement augmentée dans cette région chez les embryons Pcdh18a- Δ CP₁₀₆, et cela contribue probablement à la morphogenèse anormale du plexus veineux. Enfin, nous avons découvert qu'un motif à quatre acides aminés REDV, présent dans la région extracellulaire de Pcdh18a, est requis pour la fixation physique des cellules stromales sur les vaisseaux et leur différenciation en cellules stromales périvasculaires (CSP). Ces résultats contribuent à élucider des questions fondamentales concernant l'interaction entre les cellules stromales et les cellules endothéliales dans la construction d'une niche fonctionnelle pour les cellules souches hématopoïétiques.

Abstract

Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) emerge from the ventral floor of the dorsal aorta in zebrafish embryos, as in other vertebrates. HSPCs then settle in their first niche, the caudal hematopoietic tissue (CHT), where they expand and undergo multilineage differentiation. Our lab previously identified somite-derived stromal reticular cells (SRCs) and the caudal venous plexus as the key components of the CHT niche. The ventral side of caudal somites give rise to stromal cell progenitors which migrate ventralwards together with endothelial cells to build a functional hematopoietic niche. However, little is known about the molecular mechanisms involved in these processes.

This work demonstrates that protocadherin-18a (Pcdh18a) is expressed by the stromal cell progenitors and plays important roles in their migration and subsequent hematopoietic niche formation. Migration of stromal cells, expressing a Pcdh18a that lacks a major part of the cytoplasmic domain (Pcdh18a- Δ CP₁₀₆), was compromised. This phenotype was linked to the fact that the projection of filopodia is usually concentrated in the leading edge, whereas it occurs randomly in stromal cells expressing Pcdh18a- Δ CP₁₀₆. In addition, during their semi-collective migration, stromal cells expressing Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ retained the connections among each other for a longer time compared to the control group. These results suggest that the cytoplasmic domain of Pcdh18a is essential for F-actin regulation and is also involved in cell-contact-mediated repulsion.

Subsequently, stromal cells switch binding partners to endothelial cells that will form the venous plexus. *In vivo* analysis demonstrated that Pcdh18a is involved in the physical interaction of stromal cells with endothelial cells. The expression of Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ in stromal cells induces severe defects in the venous plexus. The expression of fibronectin 1b is strongly increased in the Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ embryos in this region, and this is likely one of the factors causing the abnormal morphogenesis of the venous plexus. Finally, we found that a four-amino-acid motif REDV, present in the extracellular region of Pcdh18a, appears required for the physical attachment of stromal cells on the vessels, and their differentiation in stromal perivascular cells (SPCs). These results contribute to the elucidation of fundamental questions regarding the interaction between hematopoietic stromal cells and endothelial cells, the two main components in the formation of a functional hematopoietic stem cell niche.

Liste des abréviations

Actine-F	Actine filamenteuse
Actine-G	Actine globulaire
AGM	Aorte-gonade-mésonephros
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
Angptl3	Angiopoietin-like protein 3
Arp2/3	Actin-related protein 2/3 complex
ATF4	Activating transcription factor 4
BMP	Bone morphogenetic protein
CAMs	Molécules d'adhésion cellulaire
CAR	CXCL12 abundant reticular
Ccl	Chimiokine [motif C-C] ligand
CCN	Cellules de la crête neurale
Ccr	Chimiokine [motif C-C] receptor
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CHT	Caudal hematopoietic tissue
CIL	Contact inhibition locomotion
CMN	Cellules mésenchymateuses de la nageoire
CSH	Cellule souche hématopoïétique
Cspg4	Chondroïtin sulfate proteoglycan 4
CSPH	Cellules souches et progénitrices hématopoïétiques
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
CSPM	Cellules souches progénitrices mésenchymateuses
CSP	Cellules stromales périvasculaires

CSR	Cellules stromales réticulaires
Cxcl	Chimiokine [motif C-X-C] ligand
Cxcr	Chimiokine [motif C-X-C] receptor
DIC	Contraste interférentiel différentiel
EC	Extracellulaire
E-cadhérine	Cadhérine épithéliale
ECM	Matrice extra cellulaire
Etsrp	ETS variant transcription factor 2
FGF	Fibroblast growth factor
Fmnl3	Formin-like protein 3
Fn1a/Fn1b	Fibronectine 1a/1b
Fzd	Frizzled
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
hpf	Heures post fécondation
Ig-CAMs	Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules
jpf	Jours post fécondation
Klf6a	Kruppel-like factor 6a
LEPR	Leptin receptor
MO	Morpholino
N-cadhérine	Cadhérine neurale
PAPC	Protocadhérine paraxiale
Pax	Paired box protein
PCDH	Protocadhérine
PCP	Planar cell polarity
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	PI-3 kinase

ROS	Reactive oxygen species
SCA-1	Stem cell antigen-1
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SPC	Stromal perivascular cells
SRC	Stromal reticular cells
TEH	Transition endothélio-hématopoïétique
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	Transforming growth factor- β
THC	Tissu hématopoïétique caudal
TME	Transition mésenchymo-épithéliale
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
WIRS	WAVE interacting receptor sequence
WISH	Whole mount in situ hybridization
Wnt	Wingless integration
WRC	WAVE regulatory complex

Index des figures et tableaux

I : Introduction, R : Résultats, D : Discussion, M : Matériels et méthodes

Figure I1 – Nombre de publications indexées « zebrafish » par année.....	2
Figure I2 – Transgénèse aléatoire <i>Tol2</i> chez le poisson zèbre	6
Figure I3 – Somitogenèse et segmentation du mésoderme pré-somitique.....	11
Figure I4 – Spécification des types cellulaires au sein du somite chez les amniotes.....	13
Figure I5 – Les molécules d’adhésion cellulaire et leurs interactions	17
Figure I6 – Dimérisation et interactions des cadhérines et protocadhérines.....	19
Figure I7 – Voie de signalisation Wnt/PCP et recrutement de la β -caténine.....	20
Figure I8 – Structure des protocadhérines.....	22
Figure I9 – La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	29
Figure I10 – La dynamique de l’actine et ses régulations.....	33
Figure I11 – Adhésion focale et protrusions membranaires	35
Figure I12 – Facteurs influençant la directionnalité de la migration cellulaire	38
Figure I13 – Migration collective des cellules épithéliales et mésenchymateuses	41
Figure I14 – Différenciation des cellules souches hématopoïétiques chez les mammifères....	49
Figure I15 – Niches ostéoblastique et vasculaire de la moelle osseuse	53
Figure I16 – Cellules périvasculaires stromales des sinusoides et des artérioles.....	56
Figure I17 – Migration des CSPH dans les différentes niches hématopoïétiques	59
Figure I18 – Composition du tissu hématopoïétique caudal	60
Figure I19 – Régulation du devenir des CSH dans le tissu hématopoïétique caudal.....	63
Figure I20 – Emergence et migration des progéniteurs des cellules stromales	65
Figure I21 – Cellules stromales de la niche et mésenchymateuses de la nageoire	66

Figure R1 – Contraintes physiques et imagerie des stades précoces de développement des progéniteurs des cellules stromales	71
Figure R2 – Imagerie du développement du tissu hématopoïétique caudal.....	72
Figure R3 – Profil d’expression de <i>pcdh10b</i> et <i>pcdh18a</i>	74
Figure R4 – Efficacité et mode d’action des morpholinos.....	77
Figure R5 – Effets phénotypiques du morpholino <i>pcdh10b</i>	79
Figure R6 – <i>Pcdh10b-ΔCPT</i> altère le développement du THC	81
Figure R7 – Profil d’expression de <i>pcdh18a</i> à différents stades du développement	82
Figure R8 – Profil d’expression de <i>Pcdh18a</i> à 26 hpf.....	83
Figure R9 – Effets phénotypiques du morpholino <i>pcdh18a</i>	85
Figure R10 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> affecte le comportement des cellules stromales lors de leur migration	87
Figure R11 – Détection des filopodes et normalisation	89
Figure R12 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> modifie l’orientation et la taille des filopodes	90
Figure R13 – La mutation du domaine WIRS de <i>Pcdh18a</i> induit l’apoptose	92
Figure R14 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> favorise les contacts entre cellules stromales	94
Figure R15 – La construction <i>Pcdh18a-ΔCPT-GFP</i> est sécrétée par les cellules	96
Figure R16 – <i>Pcdh18a-ΔCPT</i> n’a pas d’effet sur le développement des cellules stromales....	97
Figure R17 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> provoque une diminution du nombre de cellules stromales....	99
Figure R18 – Taux de division cellulaire lors de la migration et de la maturation des progéniteurs des cellules stromales	101
Figure R19 – Formation du plexus veineux caudal.....	104
Figure R20 – Interactions entre cellules stromales et cellules endothéliales	105
Figure R21 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> altère la formation du plexus veineux caudal	107
Figure R22 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> modifie la morphologie du plexus veineux caudal	108
Figure R23 – Distinction morphologique des différents types cellulaires.....	110

Figure R24 – Expression de <i>pdgfrβ:mCherry</i> à 50 hpf chez les embryons contrôle ou exprimant <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i>	113
Figure R25 – Le motif REDV est nécessaire à l'étalement des cellules stromales	115
Figure R26 – La fibronectine isole les progéniteurs du reste du somite lors de leur spécification	118
Figure R27 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> induit une augmentation de l'expression de la fibronectine.	119
Figure R28 – Régulation du dépôt de fibronectine sur les cellules endothéliales à 36 hpf ...	121
Figure R29 – <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i> altère la fonction du THC	124
Figure D1 – <i>Pcdh18a</i> contribue à la migration des cellules stromales.....	127
Figure D2 – La partie cytoplasmique de <i>Pcdh18a</i> est nécessaire à la régulation du contact homophile.....	131
Figure D3 – <i>Pcdh18a</i> dans le développement et la différenciation des cellules stromales....	133
Figure D4 – Réponse des cellules endothéliales à l'expression de <i>Pcdh18a-ΔCP₁₀₆</i>	136
Figure M1 – Cycle de reproduction du poisson zèbre en laboratoire	142
Tableau M2 – Lignées transgéniques utilisées pour les expériences	143
Tableau M3 – Amorces utilisées pour le clonage intermédiaire des fragments de <i>pcdh18a</i>	146
Figure M4 – Cartes des plasmides utilisés pour les constructions génétiques.....	147
Tableau M5 – Amorces utilisées pour la technique de clonage Gibson	148
Tableau M6 – Caractéristiques des vecteurs créés.....	149
Tableau M7 – Lignées transgéniques stables créées au cours de ce travail de thèse.....	151
Tableau M8 – Morpholinos utilisés pour les expériences.....	154
Tableau M9 – Séquences et efficacité des couples d'amorces de PCRq	157
Tableau M10 – Amorces et références pour la synthèse des sondes d'hybridation in situ....	160
Tableau M11 – Anticorps utilisés pour les immunohistochimies	163
Tableau M12 – Propriétés des systèmes de microscopie confocale utilisés	165
Figure M13 – Technique de montage des échantillons pour la microscopie inversée.....	166

Introduction

1. Le poisson zèbre – un modèle en biologie du développement

1.1. L'utilisation du poisson zèbre et ses avantages

Le *Danio zébré* (*Danio rerio*), plus communément appelé poisson zèbre, est un poisson d'eau douce originaire d'Inde. Ses caractéristiques ont fait de lui un modèle de plus en plus prisé en laboratoire au cours des dernières décennies. Les applications utilisant cet organisme sont diverses, aussi bien en biologie du développement qu'en cancérologie, toxicologie et pharmacologie.

1.1.1. Un organisme qui se prête à l'expérimentation en laboratoire

Importé au début des années 1900, le *Danio zébré* était prisé des aquariophiles. En 1934, Charles W. Creaser proposa son utilisation pour l'étude du développement embryonnaire. Néanmoins, il est resté pendant des années un modèle de poisson parmi tant d'autres, dont le Médaka. Par la suite dans les années 70, le généticien George Streisinger commença à utiliser le poisson zèbre pour étudier le développement du système nerveux des vertébrés (Varga, 2018). Au début des années 80, il introduisit la technique de mutagenèse aléatoire par rayonnement ultraviolet (UV) et créa les premiers mutants homozygotes, notamment un mutant dépigmenté. Cette technique consiste à irradier des spermatozoïdes afin d'induire des mutations de manière non ciblée dans leur séquence d'ADN puis à identifier une population d'individus, issue d'une seule femelle, qui partage un même phénotype. Dans la plupart des cas, la mutation d'un gène est responsable du phénotype observé (Streisinger et al., 1981). Par la suite, Charles B. Kimmel prit le relais et réalisa des études fondatrices sur le développement embryonnaire du poisson zèbre avec toute une série d'articles de 1985 (Kimmel and Law, 1985) jusqu'à la publication de la synthèse en 1995, auquel tout biologiste du développement, travaillant sur le poisson zèbre, se réfère aujourd'hui (Kimmel et al., 1995). Il reçut le prix « George Streisinger Award » en 2016 en reconnaissance de sa contribution exceptionnelle dans l'avancée de la compréhension du modèle. La communauté prit conscience que le poisson zèbre pouvait représenter un modèle robuste pour les dépistages génétiques à grande échelle afin d'étudier les fonctions de nombreux gènes et plusieurs équipes ont identifié des mutations affectant le

développement (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996). L'ensemble des travaux réalisés a participé à l'engouement, au cours des dernières années, de l'utilisation de cet organisme dans différents domaines de la biologie. En effet, depuis les années 90 le nombre de publications utilisant ce modèle ne cesse d'augmenter (**Figure I1**).

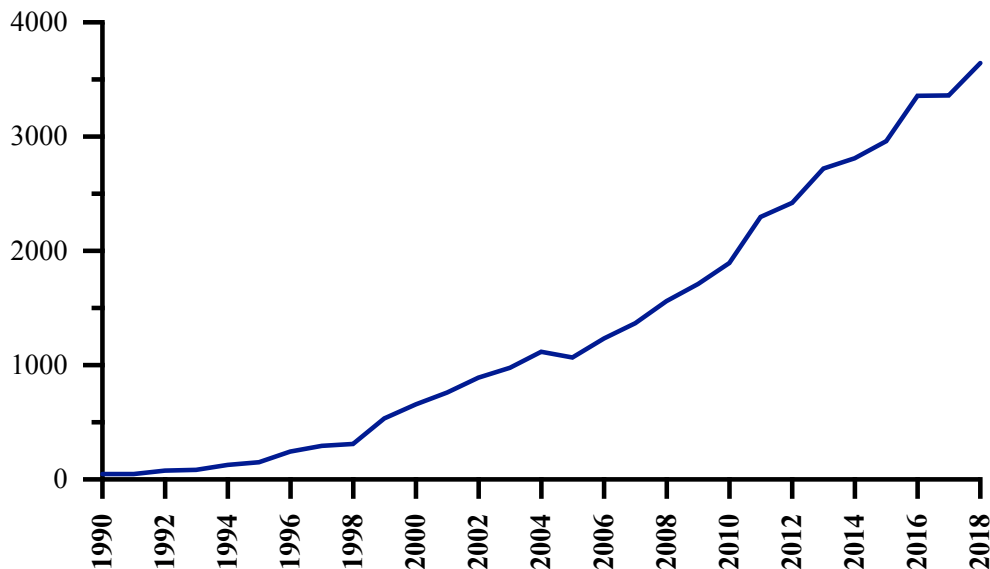


Figure I1 – Nombre de publications indexées « zebrafish » par année

Ce graphique montre l'augmentation du nombre de publications utilisant le poisson zèbre dans le domaine biomédical entre 1990 et 2018. Les données brutes ont été générées grâce au site Medline Trend (<http://dan.corlan.net/medline-trend.html>) qui a permis d'obtenir le nombre de publications indexées « zebrafish » par PubMed pour chaque année.

Date de visite du site internet : 25/06/2021

Le poisson zèbre répond à plusieurs critères essentiels pour caractériser un organisme comme bon modèle d'expérimentation. En termes de praticité, sa petite taille (environ 4 à 5 cm adulte) et son comportement grégaire permettent de le maintenir dans des infrastructures de superficies raisonnables et son élevage ne requiert pas de technique particulière. Pour l'expérimentation, son temps de génération est relativement court (3 à 4 mois), ce qui est plus rapide que chez d'autres espèces de poissons et intéressant pour la génération de lignées transgéniques. Aussi, un point essentiel est la facilité d'obtention d'œufs fécondés, du fait de la danse d'accouplement induite par la lumière du matin. Une femelle est capable de pondre jusqu'à 200 œufs toutes les semaines, ce qui est important pour augmenter le nombre de répliques biologiques avec peu de variabilité interindividuelle lors d'une même expérience, ainsi que de pouvoir répéter l'expérience rapidement dans les mêmes conditions de fond génétique. Les atouts décisifs pour son utilisation en biologie du développement sont : le développement externe, la petite taille (initialement 0,5 mm) et la transparence de l'embryon, ce qui rend

accessible toutes les étapes clés. De plus, cela est rapide puisque l'ensemble des processus majeurs du développement survient dans les 3 jours qui suivent la fécondation, notamment la gastrulation de 5 à 10 hpf (pour « hours post fertilization ») et la segmentation de 10 à 24 hpf, pour donner naissance à un stade larvaire à partir de 3 jours. La température de développement de référence est de 28°C et une diminution de température à 24°C provoque un retard de développement de 25%, au contraire, une augmentation à 33°C entraîne un développement avancé de 25% (Kimmel et al., 1995).

Le projet de séquençage du génome du poisson zèbre a commencé en 2001 au « Wellcome Trust Sanger Institute » qui publia, une décennie plus tard, le premier assemblage du génome, appelé GRCz9. Dans cette première version, 26 000 gènes codants pour des protéines ont été identifiés. En comparaison avec la séquence de référence humaine, au moins 70% des gènes humains ont un orthologue chez le poisson zèbre, ce qui est important pour translater les études réalisées à d'éventuelles applications à l'homme (Howe et al., 2013). Puis en 2014, une nouvelle version GRCz10 est sortie, et la dernière version en date est la GRCz11, publiée en 2017 avec plus de 1000 séquences de clones en plus, et la résolution de problèmes majeurs. Le séquençage du génome d'un organisme modèle est d'une importance capitale pour l'étude des maladies génétiques afin de comprendre dans quelles mesures les mutations retrouvées sont transposables aux orthologues humains. A contrario en génétique inverse, il est aujourd'hui possible de mimer une maladie en introduisant la même mutation mise en cause dans le génome de l'organisme. Enfin en biologie moléculaire, cela permet d'avoir accès à l'ensemble des informations nécessaires pour cloner des gènes et modifier génétiquement les organismes.

Le génome du poisson zèbre comporte 25 chromosomes qui contiennent à eux tous $1,7.10^9$ paires de bases d'ADN, ce qui correspond à environ la moitié du génome humain. Il est diploïde, c'est-à-dire qu'il comporte deux copies de chaque chromosome, comme le génome humain. Il y a environ 320-350 millions d'années, une duplication entière du génome des téléostéens s'est produite, conduisant à la génération de gènes homologues. Puis, l'évolution a conduit à des réarrangements chromosomiques et à la divergence des séquences géniques par accumulation de mutations. Les paralogues ainsi formés ont souvent des fonctions différentes qui peuvent être complémentaires ou nouvelles (Glasauer and Neuhauss, 2014). Chez le poisson zèbre, de nombreux gènes ont conservé leurs paralogues et il est donc important de les distinguer car ils ne sont pas exprimés dans les mêmes tissus et ont des rôles différents. Il

convient de les différencier par « a » et « b » et de vérifier d'éventuelles compensations lors d'études fonctionnelles.

Les conventions d'écriture des gènes et protéines pour lesquelles ils codent sont différentes selon les espèces. Prenons l'exemple de la protocadhérine 18, il conviendra de noter pour le gène et la protéine respectivement : chez l'homme *PCDH18* et PCDH18, chez la souris *Pcdh18* et PCDH18 et chez le poisson zèbre *pcdh18a/pcdh18b* et Pcdh18a/Pcdh18b.

1.1.2. Des caractéristiques intéressantes pour la microscopie *in vivo*

L'embryon de poisson zèbre est naturellement transparent aux stades précoces et la production plus tardive de pigments peut être inhibée de façon génétique ou chimique. C'est pourquoi il se prête particulièrement à la microscopie non invasive *in vivo*, que ce soit aux stades embryonnaires ou chez l'adulte. La microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC ou « Nomarski ») est un outil qui a été prisé pour étudier les processus de développement embryonnaire chez l'embryon vivant. C'est d'ailleurs cette technique, couplée à des marquages cellulaires grâce à des colorants fluorescents, qui a été utilisée par Kimmel et al. Pour l'étude détaillée de l'embryogenèse du poisson zèbre (Kimmel et al., 1995). Plus tard, l'introduction d'une caméra vidéo tri-CCD dans le dispositif d'imagerie, a permis d'accéder à des niveaux de contraste et de grossissement plus élevés, permettant de visualiser des détails non accessibles auparavant (Herbomel et al., 1999).

Ensuite, l'introduction de la transgénèse et la découverte des protéines fluorescentes a permis de marquer spécifiquement et durablement des types cellulaires, afin de suivre, au cours du temps, leur devenir par microscopie à fluorescence. La GFP (pour « green fluorescent protein ») a été observée pour la première fois chez la méduse *Aequorea victoria*. Elle a été purifiée dans les années 60 puis clonée et utilisée comme marqueur de l'expression de gènes dans les années 90 (Shimomura et al., 1962; Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994). En 2008, les travaux sur la GFP valurent le prix Nobel de chimie à Osamu Shimomura et Martin Chalfie, ainsi qu'à Roger Y. Tsien qui contribua en déclinant la palette de couleurs possibles, permettant de marquer plusieurs molécules ou cellules avec différentes couleurs (Zhang et al., 2002).

Aujourd'hui, de nombreuses protéines fluorescentes sont disponibles, dérivant de la GFP ou d'autres molécules, avec des propriétés distinctes. Les facteurs les plus limitants pour l'utilisation des protéines fluorescentes en microscopie *in vivo* sont leur temps de maturation,

leur taille et leur temps de fluorescence. En effet, plus la maturation du tag fluorescent (fusion d'une protéine fluorescente à une protéine d'intérêt) est longue et moins il est possible de visualiser la protéine d'intérêt rapidement, ce qui induit un décalage temporel. Dans le cas particulier d'une fusion de protéine avec un tag, sa taille et sa conformation sont très importantes car il peut masquer des sites de liaison à des interactants ou empêcher la bonne maturation de la protéine d'intérêt. Aussi, pour suivre les protéines dans le temps, il est nécessaire que le tag ne blanchisse pas trop rapidement, afin de garder un signal fluorescent même après plusieurs acquisitions. Cela est d'autant plus vrai lorsque l'expression de la construction n'est pas continue dans le temps. Un bon nombre d'études se sont attardées à optimiser les propriétés des tags fluorescents, en induisant des modifications dans la séquence des gènes (Zhang et al., 1996; Plamont et al., 2016; Duwé and Dedecker, 2019). Aussi, l'utilisation de composés chimiques qui sont plus petits et à activation de fluorescence quasi instantanée promet de révolutionner certaines applications. En plus de marquer des cellules entières ou des protéines dont l'expression exogène est forcée, il est possible de marquer des éléments endogènes de la cellule grâce à des peptides spécifiques ou des anticorps qui s'y fixent. C'est le cas de Lifeact qui est un petit peptide de 17 acides-aminés, permettant de marquer dynamiquement l'actine filamenteuse afin de suivre le cytosquelette de la cellule au cours du temps (Riedl et al., 2008). Enfin, il existe des protéines photoactivables ou photoconvertibles qui sont particulièrement intéressantes pour tracer le devenir des cellules ou le lignage cellulaire (Lukyanov et al., 2005; Habuchi et al., 2008).

La transgénèse permet de faire exprimer des constructions génétiques, créées par biologie moléculaire, aux cellules d'un organisme. Elle est définie comme l'insertion d'un matériel génétique exogène dans le génome. Si cette insertion se fait au niveau des cellules germinales, la transgénèse est dite stable car le transgène pourra être transmis aux générations suivantes. Chez le poisson, les éléments transposables *Tol2* ont été découverts pour la première fois chez le Médaka (Koga et al., 1996). Ce sont des séquences flanquées de sites *Tol2*, dits donneurs, qui requièrent la présence de la transposase pour être mobiles de façon autonome (Kawakami et al., 1998). Cette technique est utilisée dans les laboratoires afin de marquer des types cellulaires précis en choisissant le promoteur adéquate, ou pour marquer des protéines d'intérêt grâce aux protéines de fusion (**Figure I2**). Les techniques de modification du génome de manière ciblée sont de plus en plus en vogue, notamment l'utilisation de CRISPR/Cas9 qui offre de belles possibilités (Adli, 2018). La stratégie est différente puisqu'elle permet d'insérer de petits tags dans le génome afin de marquer les protéines endogènes et de rester en conditions

physiologiques. En effet, la transgénèse induit une surexpression ou une expression ectopique de la protéine étudiée qui peut introduire des biais.

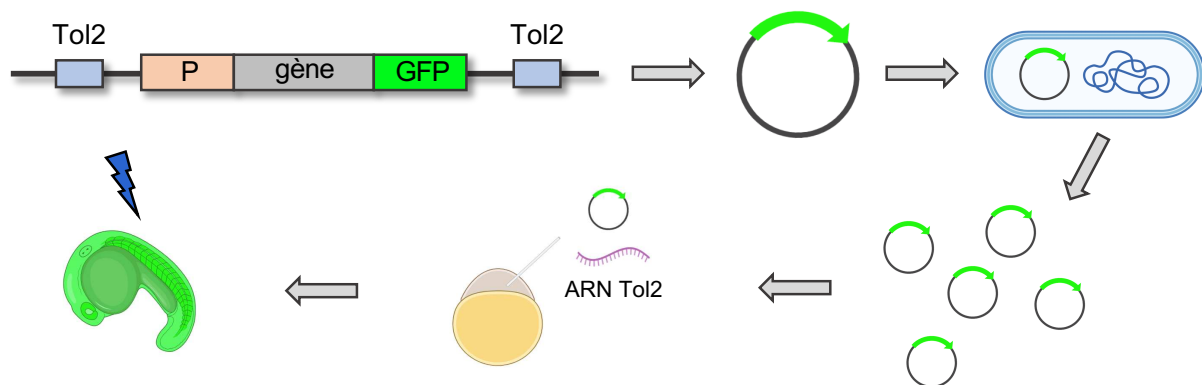


Figure I2 – Transgénèse aléatoire *Tol2* chez le poisson zèbre

Dans un premier temps, la construction est produite par biologie moléculaire en choisissant le promoteur adéquat (orange), le gène d'intérêt (gris) et la protéine fluorescente (vert). L'ensemble est inséré dans un vecteur muni des sites *Tol2* et des éléments appropriés, notamment l'origine et les gènes de résistance aux antibiotiques. Le vecteur est ensuite transformé dans des bactéries qui servent d'intermédiaire de multiplication du matériel. Finalement, la construction est injectée avec l'ARNm de la transposase au stade une cellule des œufs fécondés. Le transgène est inséré de manière aléatoire dans le génome des embryons de génération F0. Si l'insertion s'effectue dans les cellules germinales, il y aura transmission stable à la génération F1 ce qui est nécessaire pour créer une nouvelle lignée transgénique.

Le poisson zèbre se prête à la quasi-totalité des applications de microscopie à fluorescence *in vivo*. Allant du champ large ordinaire à la super-résolution, les techniques de microscopie sont diverses et permettent d'acquérir de plus en plus vite et en profondeur. Cette liste non exhaustive d'applications permet de démontrer la puissance du modèle dans divers domaines de la biologie qui ont des besoins différents.

Dans le domaine de la cancérologie, il existe des modèles de poisson zèbre pour de nombreux types de tumeurs comme le mélanome, le cancer du foie ou du pancréas et les leucémies (Stoletov and Klemke, 2008). Le mutant casper est très utilisé pour l'imagerie du poisson zèbre adulte puisque des mutations dans les gènes des pigments le rendent totalement transparent (White et al., 2008). Il est possible d'induire la formation de tumeurs chez le poisson par l'introduction de mutations dans des oncogènes ou par l'utilisation de lignées transgéniques (Langenau, 2003; Berghmans et al., 2005). Aussi, les xéno greffes de cellules cancéreuses humaines sont actuellement étudiées et il a été montré que ces cellules sont capables de répondre à certains signaux du poisson (Haldi et al., 2006; Konantz et al., 2012). Dans le cas du gliome, la xéno greffe est utilisée pour comprendre le comportement des cellules cancéreuses humaines du cerveau (Hamilton et al., 2016; Vittori et al., 2016). En temps réel, les différents

types cellulaires de la tumeur sont accessibles afin d'étudier leurs interactions (Tobia et al., 2013). Cela permet de suivre l'évolution tumorale au cours du temps et les éventuelles métastases qui surviendraient (Osmani and Goetz, 2019).

Le poisson zèbre est également très prisé depuis quelques années dans le domaine de la toxicologie et de la découverte des nouveaux médicaments. En effet il se place à l'interface des études *in vitro* et des études sur les mammifères. Bien qu'il ne puisse pas se substituer aux études murines, il permet de réaliser en première ligne des cribles de molécules à grande échelle et d'étudier leur toxicité sur le développement embryonnaire et sur les tissus. Un point important est que 82% des gènes associés avec des maladies humaines ont un homologue chez le poisson zèbre (Cassar et al., 2020).

Dans le domaine des neurosciences, ce vertébré est utilisé aussi bien pour des études de comportement que pour visualiser, à haute résolution, des événements cellulaires précis. Bien qu'il soit aujourd'hui possible de faire de la microscopie confocale live sur le cerveau murin, cela nécessite une chirurgie invasive lourde et du matériel spécifique. Chez l'adulte casper, le cerveau est accessible sans chirurgie invasive et la microscopie deux photons permet d'acquérir suffisamment en profondeur pour suivre les divisions au cours du temps des cellules souches neurales (Dray et al., 2015).

Depuis quelques années, la microscopie à fluorescence a connu une révolution grâce à l'introduction de deux méthodes. La microscopie super-résolutive, qui comporte plusieurs techniques, permet de dépasser les limites de la diffraction de la lumière et d'obtenir une résolution optique allant jusqu'à 10 nm (Schermelleh et al., 2019). Cette découverte a valu le prix Nobel de chimie en 2014 à Stefan W. Hell, Eric Betzig et William E. Moerner. Alors que la microscopie super-résolutive s'applique surtout sur des cellules en culture, l'utilisation du poisson zèbre connaît quelques applications, notamment pour la localisation membranaire de molécules uniques par microscopie TIRF ou pour l'imagerie dynamique des neurones du cerveau (Schaaf et al., 2009; Turcotte et al., 2019). La microscopie à feuillet de lumière (ou « light sheet microscopy ») est, quant à elle, une technique d'épifluorescence où l'échantillon est illuminé et scanné de manière globale, ce qui permet de réduire la toxicité lumineuse et d'augmenter la vitesse d'acquisition (Power and Huisken, 2017). C'est une technique robuste en biologie du développement car elle donne accès au suivi d'un phénomène dans son ensemble et dans le temps, avec une bonne résolution. De par sa transparence, son développement externe et sa petite taille, l'embryon de poisson zèbre est idéal, par exemple pour imager la formation

du système cardiaque ou du système vasculaire au cours du temps (Kyu Park et al., 2015; Weber and Huisken, 2015).

1.2. Développement embryonnaire et parallèle avec les mammifères

L'embryogenèse est un processus unique lors duquel un embryon est formé à partir d'une cellule unique, issue de la rencontre de deux gamètes. Le développement d'un organisme pluricellulaire fait appel à des mécanismes biologiques et des événements cellulaires assez complexes. Entre les différentes espèces animales, le développement embryonnaire présente des traits qui ont été conservés, mais également des différences qui sont apparues au cours de l'évolution.

1.2.1. Les premières étapes du développement embryonnaire

Dès la fécondation, le développement embryonnaire se met en place. C'est un processus dynamique qui est plus ou moins rapide selon les espèces. Chez le poisson zèbre, le développement est rapide, les stades correspondent à des heures après la fécondation (hpf) tandis que chez la souris, celui-ci est plus lent et les stades correspondent à des jours après la fécondation. Tout d'abord, le stade zygote se situe entre le moment de la fécondation – rencontre des gamètes – et la première division cellulaire. Ce stade dure $\frac{3}{4}$ d'heure chez le poisson et un jour chez la souris. Chez le poisson zèbre, le développement initial est méroblastique, c'est-à-dire que l'œuf est segmenté de façon incomplète. L'embryon entier se développe du côté du pôle animal, tandis que le pôle végétal n'est composé que de vitellus (Kimmel et al., 1995). Ceci est différent chez d'autres espèces comme le xénope, où l'œuf est asymétrique avec un pôle animal qui génère les futurs ectoderme et mésoderme, et le pôle végétal qui est à l'origine du futur endoderme.

La période qui suit est appelée clivages – divisions cellulaires synchrones rapides sans augmentation visible de la taille de l'œuf – et, est suivie par le stade blastula. Chez le poisson, les divisions se font toutes les 15 minutes jusqu'à atteindre le stade 128 cellules à 2 $\frac{1}{4}$ hpf qui est défini comme la fin de la période de clivage et l'entrée au stade blastula. Les clivages des blastomères sont synchrones jusqu'au stade 1024 cellules, puis les cycles cellulaires se désynchronisent et s'allongent progressivement. Cette transition mid-blastuléenne est importante lors du développement et, est retrouvée chez plusieurs espèces d'insectes et de vertébrés. Elle est caractérisée par quatre points essentiels : 1) la perte de la synchronie des divisions à partir du dixième cycle, 2) l'allongement des cycles cellulaires qui deviennent

complets avec l'ensemble des phases, 3) l'activation de la transcription où, pour la première fois, les cellules vont exprimer leur génome et 4) l'acquisition d'une motilité cellulaire avec la formation de filopodes (Kane et al., 1992; Kane and Kimmel, 1993). Le stade épibolie commence à environ 4 hpf et s'étend jusqu'à 10 hpf avec un chevauchement de la période de gastrulation. Le blastoderme se forme et constitue une fine couche de cellules qui vont migrer. Il va s'étendre et se propager progressivement pour recouvrir les cellules du sac vitellin (Kimmel et al., 1995). Chez la souris, les divisions cellulaires sont plus lentes et le stade blastula est atteint à E4.5 avec formation du blastocyste, qui est composé d'une masse cellulaire interne entourée du trophectoderme et d'une cavité (Kojima et al., 2014).

Pendant la gastrulation, la monocouche du blastoderme est réorganisée et répartie en trois feuillets : le feuillet externe appelé ectoderme, le feuillet du milieu appelé mésoderme et le feuillet interne appelé endoderme. Chez le poisson zèbre, cette période dure cinq heures, de 5 à 10 hpf. Elle fait appel à des mouvements morphogénétiques dont la propagation et l'amincissement des couches cellulaires pendant l'épibolie, l'internalisation des cellules progénitrices du mésoderme et l'extension convergente selon l'axe antéro-postérieur du corps (Warga and Kimmel, 1990). Chez la souris, la gastrulation commence au stade E6.5 et se termine au stade E7.5. Il a été démontré que les progéniteurs de chaque feuillet sont localisés à des endroits spécifiques et qu'il existe un stade pré-gastrula de E5.5 à E6, lors duquel les cellules sont spécifiées (Tam and Behringer, 1997; Kojima et al., 2014).

L'organogenèse survient après la gastrulation et permet la formation des organes à partir des trois feuillets déterminés lors de la gastrulation. Pendant cette phase, les interactions cellulaires et la communication entre les différents tissus sont primordiales. Des cellules, dites inductrices, vont diriger le devenir d'autres groupes de cellules afin de former un nouveau tissu. Les couches cellulaires des feuillets vont permettre de développer des organes en se courbant ou en se condensant, ce qui va permettre de générer des structures qui vont se remanier par la suite. Parmi les exemples bien décrits, nous pouvons citer la formation du tube neural et de la notochorde à partir de la plaque neurale qui dérive de l'ectoderme, ainsi que la formation des somites à partir du mésoderme pré-somitique.

1.2.2. *Les mécanismes de la somitogenèse*

La somitogenèse correspond à la formation des somites, structures de type épithélial de part et d'autre du tube neural et de la notochorde, qui jouent un rôle de protection. Lors de ce processus, le mésoderme paraxial, ou mésoderme pré-somitique, est segmenté au niveau de sa partie antérieure afin de générer des paires de somites (**Figure 13**). Les cellules mésenchymateuses du mésoderme pré-somitique vont entamer une transition dite mésenchymo-épithéliale. Leur épithélialisation est nécessaire à la formation du nouveau somite.

Chez le poisson zèbre, un somite se forme toutes les 30 minutes, allant de 10 à 24 hpf, pour un nombre total de 33 somites (Stickney et al., 2000). Néanmoins les six premiers somites se forment plus rapidement, au rythme de trois par heure, de sorte qu'il y a 18 somites à 18 hpf (Kimmel et al., 1995). Cela implique un décalage spatio-temporel du degré de maturation des somites. Les somites les plus antérieurs, dits rostraux, sont plus matures et avancés dans leur processus de différenciation que les somites postérieurs, dits caudaux, proches du mésoderme pré-somitique. Les structures épithéliales sont de plus en plus visibles sur le bord du somite avec un cœur de cellules d'aspect mésenchymateux au milieu. Au fur et à mesure que les somites sont formés, le mésoderme pré-somitique s'allonge du côté postérieur. Chez la souris, la somitogenèse commence à E8.0 et se termine à E13.0 et un somite est formé toutes les deux heures, ce qui peut légèrement varier en fonction de la place du somite selon l'axe antéro-postérieur, pour un nombre total de 65 somites. Chez le poulet, il faudra 90 minutes pour générer un nouveau somite, pour un nombre total de 52 somites (Aulehla and Herrmann, 2004). Enfin chez l'homme, il est estimé qu'un somite se forme toutes les 4 à 5 heures jusqu'à un nombre total de 38 à 44 somites (Müller and O'Rahilly, 1986). De nombreux éléments sont impliqués dans la genèse des somites, notamment l'expression oscillante de gènes et des molécules d'adhésion.

Depuis quelques années, de nombreuses études ont cherché à caractériser les mécanismes impliqués dans la genèse des somites. Un modèle d'horloge moléculaire, impliquant l'expression oscillante de gènes, a été proposé et petit à petit, de nouveaux acteurs ont été découverts. Le modèle est aujourd'hui appelé « Clock and wavefront model » où un gradient d'expression moléculaire se déplace tel une onde, de manière rostro-caudale au niveau du mésoderme pré-somitique. Il ralentit progressivement et se restreint dans l'espace pour déterminer les segments où il y aura formation d'une limite physique et création d'une paire de

somites (**Figure I3**). Les cellules du mésoderme génèrent ce gradient dans le temps de manière cyclique ce qui explique que la somitogenèse soit régulière (Aulehla and Pourquié, 2010; Pourquié, 2011).

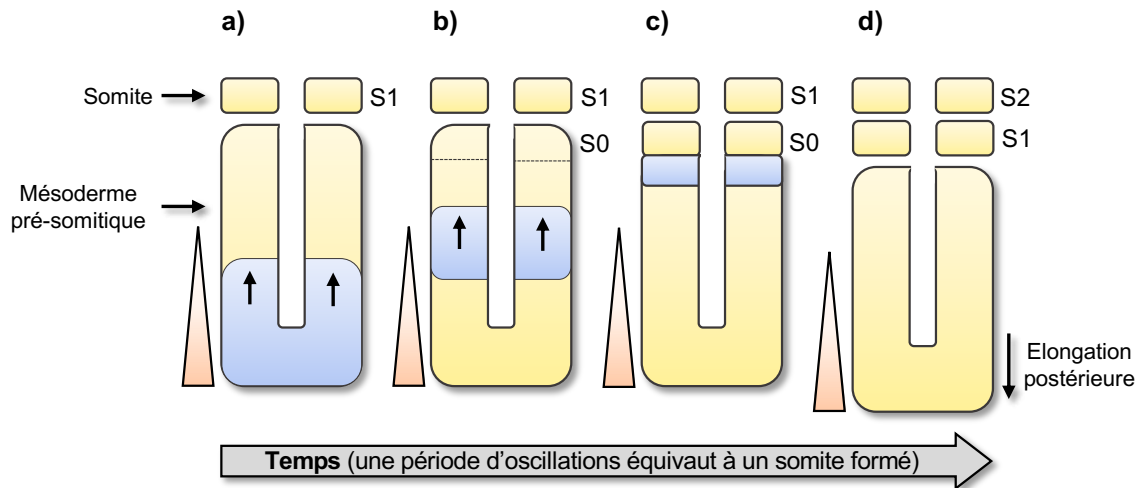


Figure I3 – Somitogenèse et segmentation du mésoderme pré-somitique

a) L’oscillation représentée en bleu correspond à l’activité oscillatoire de l’expression de gènes et des voies de signalisation. Elle est générée à partir de la partie dorsale du mésoderme pré-somitique. **b)** Puis, l’activité oscillatoire des cellules se propage le long de l’axe antéro-postérieur tout en ralentissant et en se restreignant spatialement. Il y a détermination d’un nouveau segment. **c)** Le front de l’oscillation détermine la position de la limite postérieure du somite en formation. **d)** La séparation physique, qui fait intervenir des molécules d’adhésion et la matrice extracellulaire, permet la formation d’un nouveau somite. De plus, il y a élancement du mésoderme pré-somitique, ce qui lui permet de garder une taille constante tout au long du processus.

Figure réalisée à partir de (Aulehla and Pourquié, 2010; Yabe and Takada, 2016)

L’activation rythmique de plusieurs voies de signalisation induit l’expression oscillante d’un groupe de gènes. En collaboration, des gradients de signalisation au sein du mésoderme pré-somitique déterminent le front de l’onde. Ensemble, ces acteurs permettent d’induire la segmentation du mésoderme pré-somitique. L’horloge moléculaire est assez plastique car les gènes et les voies de signalisation impliqués ne sont pas exactement les mêmes selon les espèces (Krol et al., 2011). Chez la souris, des gradients de Wnt et FGF (pour « Fibroblast growth factor »), exprimés par les cellules, déterminent la position du front de l’onde. L’élancement du mésoderme pré-somitique provoque la diminution progressive de l’expression dans la partie caudale et le recul du front de l’onde vers la partie rostrale. Ces gradients sont importants car des modifications de leur intensité provoque des décalages spatiaux des limites somitiques. L’expression de Notch est régulée de façon périodique et, est primordiale pour la segmentation (Pourquié, 1999). Il régule l’expression du gène *Hes1*, et tous deux sont impliqués dans la détermination des compartiments antérieur et postérieur au sein du somite formé. *Notch2* est exprimé dans la partie antérieure du somite et *Hes1* dans la partie

postérieure de façon complémentaire (Jouve et al., 2000). Les régulations mises en jeux sont complexes et cette description ne constitue qu'un aperçu, pour revue (Hubaud and Pourquié, 2014). Aussi, une étude récente sur des cellules humaines de mésoderme pré-somitique, induites en culture, montre qu'elles sont capables de reproduire les oscillations de l'horloge moléculaire de façon rythmique toutes les 5 heures. Ce processus est sous le contrôle des gènes *FGF*, *Wnt* et *Notch* et est donc conservé (Diaz-Cuadros et al., 2020).

1.2.3. *Neurulation et spécification des types cellulaires au sein du somite*

Chez le poisson zèbre, la somitogenèse et la neurulation s'effectuent au même moment, ce qui est aussi le cas chez la souris où la formation du tube neural s'effectue aux alentours des stades E11.0 et 12.0. Lors de la neurulation primaire, il y a formation de la plaque neurale à partir de l'ectoderme grâce à des mouvements cellulaires d'élongation. Puis, la plaque neurale se courbe, ce qui participe à la formation du sillon neural. Finalement, les deux plis neuronaux fusionnent sur la ligne médiane, ce qui crée le tube neural (Schoenwolf, 1984). Chez le poisson, cela est légèrement différent car il y a, en plus des réarrangements morphologiques, des divisions cellulaires au niveau de la ligne médiane (Kimmel et al., 1994). Après la fermeture du tube neural, les cellules de la crête neurale émergent à partir de la partie dorsale du tube. Elles migrent en périphérie pour se différencier en cellules pigmentaires, cellules neurales et ganglionnaires, ainsi qu'en cellules cartilagineuses (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008). Les motoneurons sont générés à partir de la partie ventrale du tube neural. Celle-ci est divisée en plusieurs domaines, en fonction des types de progéniteurs présents, à l'origine de l'innervation de tissus distincts (Davis-Dusenbery et al., 2014). La notochorde, quant à elle, provient du mésoderme axial et, est formée précocement lors du développement embryonnaire. Elle sécrète la molécule Sonic hedgehog (Shh) qui génère un gradient actif ventro-dorsal. L'activité de Shh est notamment impliquée dans la détermination du devenir des cellules neurales de la partie ventrale du tube (Liem Jr et al., 2000). Les somites en formation se situent de chaque côté du tube neural et de la notochorde.

Après la segmentation, les cellules du somite vont se spécifier en progéniteurs de différents lignages cellulaires. Cela participe à l'établissement d'une carte de territoires où chaque cellule progénitrice a une place bien définie au sein du somite. Chez les amniotes, elles ségrègent notamment par leur profil d'expression des facteurs de transcription Pax, impliqués dans la détermination des différents lignages cellulaires, mais également dans le maintien du stade progéniteur (**Figure I4**). Cette famille de gènes joue un rôle très important dans le

développement embryonnaire et participe à la formation de nombreux organes et tissus. Ses membres contiennent un domaine particulier de fixation à l'ADN et ils sont considérés comme des régulateurs majeurs de la transcription (Blake and Ziman, 2014).

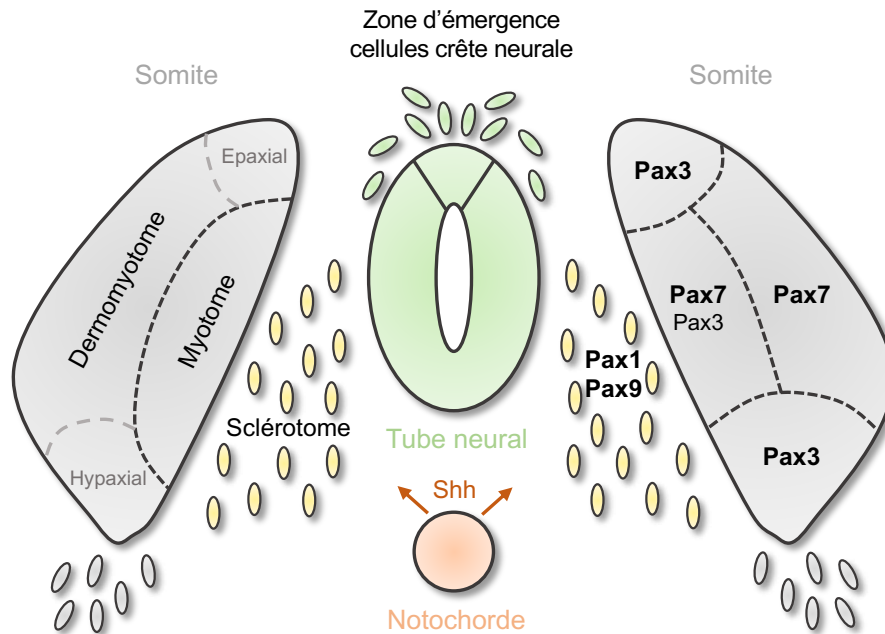


Figure I4 – Spécification des types cellulaires au sein du somite chez les amniotes

Lors de la maturation des somites, les cellules se spécifient en progéniteurs multipotents de différents types. Les cellules du sclerotome expriment *Pax1* et *Pax9* et sont à l'origine des chondroblastes et ostéoblastes. Les cellules du myotome, partie médiale du somite, expriment *Pax7* et *Pax3* qui permettent de maintenir l'état indifférencié des progéniteurs à l'origine des fibres musculaires. Le dermatomyotome est la partie latérale du somite et génère les myoblastes, les cellules satellites, les cellules endothéliales et les cellules du derme. Elle exprime *Pax7* au centre, qui participe au maintien de l'état progéniteur, et *Pax3* dans les parties épaxiale et hypaxiale du somite. Les myoblastes émergent de la partie hypaxiale et migrent ventralement vers les zones de formation des membres. La notochorde sécrète Sonic hedgehog (Shh) qui forme un gradient, important pour spécifier les types cellulaires du somite et déterminer le devenir des cellules ventrales du tube neural.

Après fusion des plis neuronaux et fermeture du tube neural, les cellules de la crête neurale vont émerger de la partie dorsale du tube et migrer jusqu'à leur zone de différenciation.

Figure réalisée à partir de (Blake and Ziman, 2014)

Certaines cellules de la partie ventro-médiale des somites perdent leur caractéristique épithéliale puis, migrent et se condensent pour former le sclerotome. L'expression des gènes *Pax1* et *Pax9* est dépendante de la sécrétion de Shh par la notochorde. Ils sont nécessaires au maintien de la réserve de précurseurs et permettent aux cellules d'acquérir un programme de développement spécifique du sclerotome. Elles vont se différencier en chondroblastes, à l'origine du cartilage et en ostéoblastes, à l'origine des vertèbres (Blake and Ziman, 2014).

D'autres cellules, toujours en place dans la partie médiale des somites, vont générer le myotome qui constitue les progéniteurs des fibres musculaires squelettiques. La partie latérale

va, quant à elle, constituer le dermomyotome qui regroupe des progéniteurs multipotents à l'origine des myoblastes et des cellules satellites, de cellules endothéliales et de cellules dermiques. Lorsque le somite est immature, *Pax3* est exprimé dans l'ensemble du somite puis, au fur et à mesure, son expression se régionalise dans la partie dorsale (épaxiale) et la partie ventrale (hypaxiale) du somite. Les myoblastes émergent de la partie hypaxiale et migrent ventralement jusqu'aux zones de formation des membres pour constituer des réserves de progéniteurs. Le mutant *Pax3* présente des défauts d'organisation du myotome et dermomyotome au sein du somite et de lourds problèmes de développement des muscles (Tremblay et al., 1998).

Pax7 est exprimé par les cellules latérales du dermomyotome au centre du somite. Ces cellules peuvent entrer en division asymétrique et les cellules filles générées migrent vers la région du myotome (Ben-Yair et al., 2011). Les cellules qui coexpriment *Pax3* et *Pax7* contribuent au maintien d'un réservoir de cellules progénitrices. Il y a un équilibre entre les gènes qui participent à la rétention de l'état progéniteur et les gènes de différenciation en myocytes. Lorsque le programme est activé, les gènes de différenciation sont davantage exprimés et il y aura une différenciation en cellules satellites, qui se situent à la périphérie des fibres musculaires (Blake and Ziman, 2014). Les gènes *pax3* et *pax7* sont également exprimés chez le poisson zèbre et des signaux d'induction musculaire inhibent leur expression, ce qui favorise l'activation des facteurs myogéniques (Hammond et al., 2007).

Chez le poisson-zèbre, et probablement chez les autres espèces pourvues de nageoires (poissons et amphibiens), il a récemment été montré que le sclérotome est constitué de deux domaines, un domaine ventral homologue de celui présent chez les tétrapodes, et un domaine plus petit situé symétriquement au bord dorsal des somites (Ma et al., 2018).

Comme mentionné précédemment, la segmentation du mésoderme pré-somitique implique de nombreuses régulations transcriptionnelles mais également des molécules d'adhésion cellulaire. Ces molécules ont un rôle primordial dans la médiation des contacts cellulaires, dans la signalisation, mais aussi dans les événements morphogénétiques qui doivent faire face aux contraintes de l'environnement.

2. Le rôle des molécules d'adhésion cellulaire lors du développement

2.1. Caractérisation des molécules d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs pour « cell adhesion molecules ») sont des protéines transmembranaires qui permettent la formation de jonctions entre cellules adjacentes ou avec la matrice extracellulaire (ECM pour « extra-cellular matrix ») et participent au maintien de l'architecture des tissus. Ces molécules sont également impliquées dans la motilité et la migration cellulaire, essentielles lors de la formation et la réorganisation des tissus. C'est un processus dynamique, qui s'adapte aux contraintes de l'environnement et joue un rôle primordial lors du développement embryonnaire.

2.1.1. La découverte des molécules d'adhésion cellulaire

L'importance de l'adhésion cellulaire a émergé au vingtième siècle où les scientifiques s'intéressèrent aux groupes de cellules qui composent les tissus et organes, ainsi qu'aux éventuelles communications intercellulaires qui coordonnent l'ensemble. La cellule seule n'est plus considérée comme un élément fonctionnel autonome, et il y eut une prise de conscience sur la place des interactions dans la régulation du devenir des populations cellulaires et leur importance dans la structuration des tissus. En 1952, des expériences de dissociation/réagrégation montrèrent qu'un tissu totalement désintégré en culture avait la capacité de reformer des agrégats cellulaires (Moscona and Moscona, 1952). Quelques années plus tard, des travaux sur la sélectivité des interactions ont montré que des groupes hétérogènes de cellules dissociées en culture pouvaient s'agréger *de novo*, de manière spécifique entre cellules de mêmes types, et qu'il y avait alors une sélectivité de l'adhésion cellulaire (Townes and Holtfreter, 1955).

La découverte des intégrines et des cadhérines dans les années 70 et 80, ainsi que la caractérisation de nombreuses autres CAMs dans les années qui ont suivi, ont permis d'expliquer la sélectivité de l'adhésion cellulaire par l'existence de molécules d'adhésion différentes (Horwitz, 2012). Une cellule donnée est capable d'exprimer de nombreuses molécules distinctes au même moment mais toutes les cellules ne vont pas exprimer les mêmes molécules. Ceci est régulé de manière très fine lors du développement dans le temps et l'espace selon les évènements et les types cellulaires mis en jeu.

2.1.2. *Les différentes molécules d'adhésion cellulaire*

Aujourd'hui, nous avons une vue d'ensemble des différentes molécules qui régissent l'adhésion cellulaire (**Figure I5**). Il existe quatre superfamilles de molécules d'adhésion, les cadhérines qui seront détaillées dans la partie suivante, les intégrines, les lectines qui interviennent dans la reconnaissance du système immunitaire et les immunoglobuline-CAMs (Horstkorte and Fuss, 2012). Découverts dans les années 1980s, les protéoglycanes sont aussi considérés comme des molécules d'adhésion (Couchman, 2010).

Les intégrines permettent à la cellule d'interagir avec la matrice extracellulaire. C'est le plus grand groupe de molécules qui agit en tant que récepteurs des molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la fibronectine. Une intégrine est composée de deux sous-unités de glycoprotéines transmembranaires, α et β , associées de manière non covalente à la membrane. Elles sont importantes pour sonder le microenvironnement autour de la cellule et captent des signaux. Elles permettent d'ancrer la cellule à la matrice extracellulaire et définissent le pôle basal des cellules épithéliales. Aussi, elles ont une fonction clé lors de la migration cellulaire pour permettre à la cellule d'avoir des points de contact et d'ancrage (Pan et al., 2016).

Les immunoglobuline-CAMs (Ig-CAMs) appartiennent à la famille des immunoglobulines et sont transmembranaires. Elles sont importantes pour la surveillance immunitaire par reconnaissance cellule-cellule et pour l'adhésion et la migration des leucocytes. La protéine ALCAM (pour « activated leukocyte cell adhesion molecule »), exprimée par plusieurs types cellulaires, est retrouvée dans les cellules stromales lors de la progression des cancers. Présente dans le microenvironnement, elle favorise le développement de métastases et la croissance des tumeurs (Willrodt et al., 2017; Zhou et al., 2018).

Les protéoglycanes sont des protéines ancrées à la membrane plasmique et liées à des chaînes de glycosaminoglycanes. Les syndécans sont les plus représentés, avec quatre membres mais il existe aussi quelques autres protéines. Ils jouent le rôle de corécepteurs pour faciliter les interactions ligand/récepteur, notamment avec les facteurs de croissance. Ils sont aussi impliqués dans l'adhésion cellulaire en se fixant à des molécules de la matrice extracellulaire. (Couchman, 2010).

Les CAMs n'ont pas seulement un rôle structurel dans la génération d'interactions physiques cellule-cellule ou cellule-matrice. Elles modulent aussi des signalisations mécaniques et biochimiques, impliquées dans de nombreux processus cellulaires : régulation de gènes, survie/apoptose, prolifération, différenciation et migration (Buckley et al., 1998).

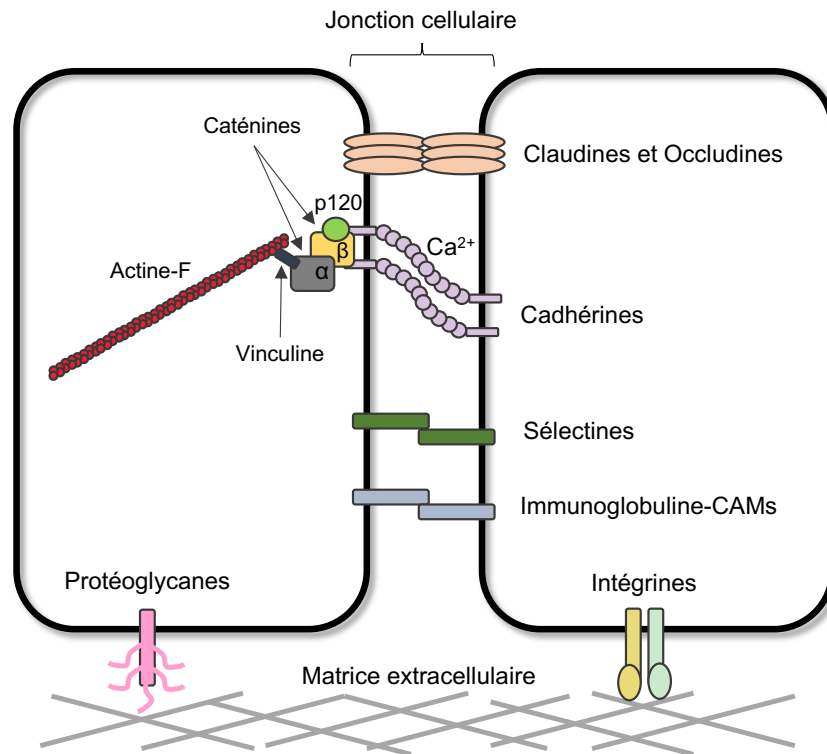


Figure I5 – Les molécules d’adhésion cellulaire et leurs interactions

Les molécules d’adhésion cellulaire sont impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. La structure et les interactions des molécules diffèrent pour chaque famille. La plupart des CAMs sont capables d’interagir avec le cytosquelette (actine ou autres molécules) grâce à un échafaudage moléculaire qui peut varier. Les cadhérines classiques se lient à la β -caténine, ce qui recrute l’ α -caténine à la membrane et permet l’interaction avec l’actine. Cela permet de moduler le cytosquelette d’actine, important pour de nombreux processus cellulaires. *Figure réalisée à partir de (Thiery and Sleeman, 2006)*

2.2. La superfamille des cadhérines

La famille des cadhérines est très vaste puisqu’elle comprend plus de 100 membres chez les vertébrés. Ce sont des protéines transmembranaires qui comportent une répétition de domaines EC (pour « extracellular ») dans leur partie extracellulaire qui peut varier d’une protéine à l’autre (Ringwald et al., 1987; Yagi and Takeichi, 2000). Le mécanisme d’adhésion est dépendant de la présence de calcium (Ca^{2+}) dans l’environnement extracellulaire. Les deux types d’adhésion – dépendant ou indépendant du calcium – ont été mis en évidence en 1977. De plus, les protéines mises en présence de calcium étaient résistantes à la dégradation par la trypsine (Takeichi, 1977, 1990). Les domaines EC comportent des sites de liaison aux ions

Ca²⁺, et cela permet à la protéine d'acquérir une conformation propice à la liaison avec son homologue. C'est un phénomène réversible car la suppression du calcium entraîne la perte des interactions cellule-cellule, et son ajout permet de rétablir les contacts cellulaires.

Cette famille comporte les cadhérines dites classiques avec cinq domaines EC, des cadhérines non classiques avec davantage de domaines EC, des cadhérines constituées de sept hélices transmembranaires qui ont été décrites plus récemment, ainsi que les protocadhérines qui comportent six à sept domaines EC (Halbleib and Nelson, 2006). Tandis que la partie extracellulaire est globalement bien conservée, la partie cytoplasmique est, quant à elle, très différente entre les protéines de classes différentes. Cette partie cytoplasmique permet de lier de nombreux interactants moléculaires impliqués dans l'activation de certaines voies de signalisation ou dans la liaison des protéines au cytosquelette de la cellule.

2.2.1. Les cadhérines classiques

Les cadhérines classiques ont des fonctions physiologiques importantes aussi bien dans le maintien de l'architecture des tissus que dans leur remaniement lors d'évènements morphogénétiques. Elles possèdent cinq domaines EC dans leur partie extracellulaire, qui ont la capacité de médier des interactions cellule-cellule dépendantes du calcium. Les liaisons sont de préférences homophiles, c'est-à-dire qu'une protéine se lie le plus souvent à son homologue. Des interactions hétérophiles, avec d'autres protéines de la famille des cadhérines, sont rares mais possibles (Oda and Takeichi, 2011).

Ces protéines s'associent en dimères *Cis* au niveau de la membrane plasmique, et interagissent en *Trans* avec les protéines situées sur la cellule voisine (**Figure I6-a**). L'assemblage se fait selon un modèle dit en fermeture éclair où, chaque dimère à la surface d'une cellule peut interagir avec deux dimères qui lui font face sur la cellule opposée. Ces interactions élémentaires peuvent s'additionner de proche en proche le long des membranes plasmiques, permettant d'établir une zone d'interaction forte entre les cellules adjacentes, appelée jonction adhérente (Takeichi, 1995). Le domaine N-terminal EC1 diffère légèrement des quatre autres. Il est nécessaire pour permettre l'interaction : sa délétion entraîne une suppression des interactions entre les cellules. Cependant, il n'est pas exclu que les autres domaines aient une importance dans l'adhésion en *Cis* lors de l'association des dimères ou bien, puissent jouer le rôle d'intercalants pour optimiser les interactions *Trans* entre les cellules (Shan et al., 1999).

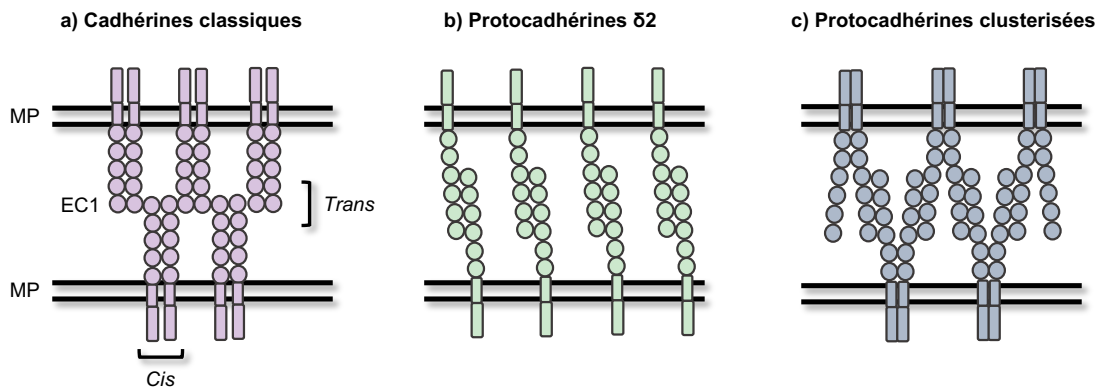


Figure I6 – Dimérisation et interactions des cadhérines et protocadhérines

a) Les cadhérines classiques s’associent en *Cis* deux à deux puis interagissent en *Trans* avec le dimère de la cellule opposée via leur domaine EC1. Les interactions sont de préférence de type homophile. b) Les protocadhérines δ2 ne forment pas de dimères en *Cis* mais interagissent avec les protéines opposées pour former des dimères *Trans* via leurs quatre premiers domaines EC. Les interactions sont de préférence homophiles. c) Les protocadhérines clusterisées peuvent interagir en *Cis* via leur dernier domaine EC puis interagissent en *Trans* avec les protéines de la cellule opposée.

Figure réalisée à partir de (Harrison et al., 2020)

Les deux cadhérines les plus connues sont la E-cadhérine (pour cadhérine épithéliale) et la N-cadhérine (pour cadhérine neurale). Elles ont été nommées en fonction du tissu dans lequel elles ont été découvertes. De façon intéressante, il a été montré que des cellules souches embryonnaires de souris en culture, délétées de la E-cadhérine, étaient capables de reformer un épithélium lorsqu’elles étaient transfectées avec la E-cadhérine tandis qu’elles avaient tendance à se différencier en cellules de neuro-épithélium ou de cartilage lorsqu’elles étaient transfectées avec la N-cadhérine. Cela a permis de mettre en évidence que l’expression d’une cadhérine précise était capable, à elle seule, d’induire la différenciation en un type cellulaire spécifique (Larue et al., 1996). Comme évoqué précédemment, les cadhérines sont capables de générer et de transduire des signaux en fonction de ce qui est capté en extracellulaire, entraînant des événements cellulaires comme la différenciation, présentée dans l’exemple précédent.

La partie cytoplasmique de la protéine est bien conservée au sein de la famille des cadhérines classiques. Elle est capable de se lier à la β-caténine, à l’α-caténine et à la caténine p120, qui forment un complexe capable, avec d’autres molécules, de lier les cadhérines au réseau de filaments d’actine. Cet échafaudage moléculaire est nécessaire pour permettre aux cadhérines d’exercer pleinement leur fonction d’adhésion (Kemler, 1993). Beaucoup de cadhérines sont exprimées dans le système nerveux central et plus particulièrement, sont impliquées dans l’assemblage et le maintien de la stabilité des synapses. Les N-cadhérines sont localisées aussi bien en pré-synaptique qu’en post-synaptique, permettant de maintenir une

proximité des membranes et de favoriser une rapide fixation du neurotransmetteur sur son récepteur. L'utilisation d'un anticorps pour bloquer les interactions homophiles induit de lourds défauts au niveau de la formation des dendrites, et la délétion de l' α -caténine provoque une réduction de l'intensité des interactions, ce qui démontre l'importance du complexe cadhérine-caténine dans la stabilité des synapses (Takeichi and Abe, 2005).

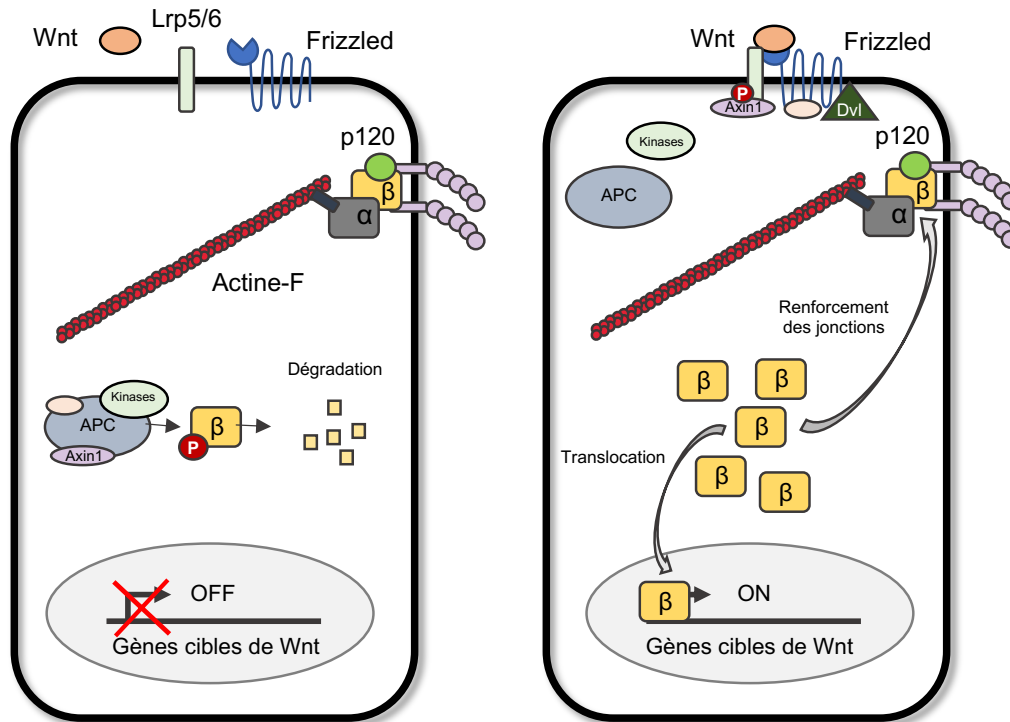


Figure I7 – Voie de signalisation Wnt/PCP et recrutement de la β -caténine

La voie Wnt/PCP dépend de l'état protéolytique de la β -caténine cytoplasmique. Dans l'état Wnt-OFF, la β -caténine se trouve à la membrane plasmique, complexée avec les domaines cytoplasmiques des cadhérines classiques. Le niveau cytoplasmique de la β -caténine est bas car l'activité constitutive du complexe de destruction de la β -caténine la phosphoryle ce qui entraîne sa destruction par le protéasome. La fixation de Wnt sur son ligand Frizzled (Fzd) entraîne le passage à l'état Wnt-ON. L'Axine 1 est alors recrutée à la membrane grâce à la fixation de Dvl sur Fzd, ce qui favorise la phosphorylation de Lrp5/6, entraînant la dissociation du complexe de destruction. Il y a alors une diminution de la phosphorylation de la β -caténine qui n'est plus dégradée, ce qui entraîne son accumulation dans le cytoplasme. L'augmentation du pool de β -caténine provoque sa translocation vers le noyau, ce qui active la transcription d'une grande variété de gènes cibles de Wnt. La β -caténine peut également être utilisée pour renforcer les jonctions à la membrane.

Figure réalisée à partir de (Mah and Weiner, 2017)

Plus précisément, lorsque la cadhérine est stable à la membrane plasmique, la β -caténine est capable de se fixer sur son extrémité C-terminale, ce qui permet de recruter l' α -caténine. Celle-ci peut se lier directement à l'actine ou via la vinculine qui est une molécule intermédiaire. Cependant, la β -caténine n'est pas exclusivement impliquée dans ce mécanisme, elle est retrouvée dans la voie de signalisation Wnt canonique et représente un facteur clé de transduction du signal au noyau (Mah and Weiner, 2017). En temps normal, la β -caténine

cytoplasmique est phosphorylée, ce qui entraîne sa dégradation par un complexe de destruction. Cependant, lorsque la voie Wnt est activée par la fixation du ligand sur son récepteur Frizzled (récepteur couplé à une protéine G), il y a alors inhibition de la phosphorylation de la β -caténine, ce qui stabilise la protéine et provoque une augmentation du pool de protéines dans le cytoplasme. La β -caténine libre est alors soit recrutée au niveau des jonctions adhérentes pour leur renforcement, soit transloquée au noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription et réguler l'expression de gènes cibles (**Figure I7**). Il a été montré que la transfection de la β -caténine stabilisée dans des cellules pouvait augmenter de moitié la demi-vie des jonctions adhérentes (Jamora and Fuchs, 2002). Ce mécanisme complexe fait intervenir la même protéine dans plusieurs voies, ce qui implique que le contrôle de son homéostasie doit être rigoureux. Cet exemple de molécule ayant un rôle central est loin d'être isolé, c'est pourquoi il est parfois difficile d'étudier la place d'une molécule dans une voie de signalisation définie.

2.2.2. *Les protocadhérines*

Avec plus de 80 membres, les protocadhérines (pcdh) sont le sous-groupe le plus vaste de la famille des cadhérines. Elles ont été décrites pour la première fois en 1993 suite à l'isolement de deux ADNc dont les séquences présentaient des similitudes avec la partie extracellulaire des cadhérines. Mais, tandis que cette partie est similaire et contient six ou sept répétitions du domaine EC, la partie cytoplasmique est, quant à elle, différente. Les protéines décrites sont localisées au niveau de la membrane plasmique et leur partie extracellulaire est aussi capable de former des agrégats. Leur expression est particulièrement forte dans le cerveau (Sano et al., 1993).

Les protocadhérines sont classées en deux grands groupes selon leur place dans le génome : les « clusterisées », regroupées en tandem sur un chromosome, et les « non-clusterisées », dispersées sur plusieurs chromosomes. Les clusterisées sont divisées en trois sous-groupes et possèdent six domaines EC. Les non-clusterisées sont divisées en deux sous-groupes, les $\delta 1$ qui possèdent sept domaines EC et les $\delta 2$ qui possèdent six domaines EC. Elles ont des peptides très conservés CM1 et CM2 dans leur domaine cytoplasmique et le sous-groupe $\delta 1$ possède en plus un troisième motif CM3 (**Figure I8**).

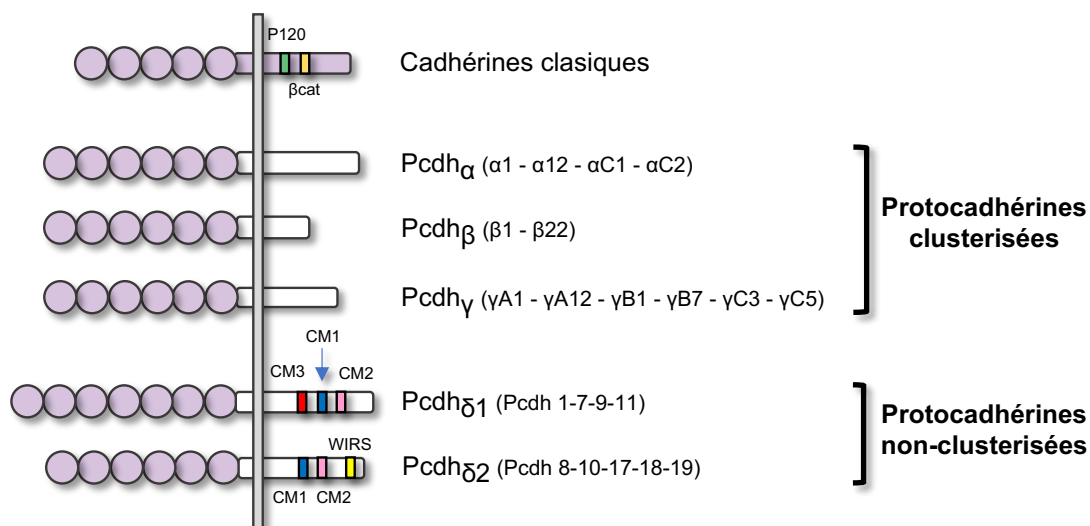


Figure I8 – Structure des protocadhérimnes

Les protocadhérimnes sont divisées en deux groupes. Les protocadhérimnes clusterisées sont regroupées en tandem sur le même chromosome. Ce groupe comporte trois sous-groupes : les Pcdh α , les Pcdh β et les Pcdh γ qui possèdent chacun six domaines extracellulaires EC. Les protocadhérimnes non-clusterisées sont dispersées sur le génome. Ce groupe comporte deux sous-groupes : Les Pcdh δ 1 qui possèdent sept domaines EC dans leur partie extracellulaire et les trois motifs conservés CM1, CM2 et CM3 dans leur partie cytoplasmique, Les Pcdh δ 2 qui possèdent six domaines EC dans leur partie extracellulaire et les deux motifs CM1 et CM2 dans leur partie cytoplasmique. En plus, ce groupe comporte le peptide WIRS qui permet à la protocadhérimne d'interagir avec l'actine via le complexe WAVE en comparaison avec les cadhérimnes classiques qui ont des sites de liaison avec la β -caténine et la caténine P120.

Figure réalisée à partir de (Hayashi and Takeichi, 2015)

Comme mentionné précédemment, les gènes des cadhérimnes clusterisées sont localisés en tandem sur le génome. Ils possèdent de nombreux exons qui vont être partagés entre les membres de la sous-famille. Ils vont coder différentes isoformes, par épissage alternatif, c'est-à-dire que pour un gène donné il y aura plusieurs possibilités de protéines générées, suivant l'épissage réalisé et le choix des promoteurs pour la sélection des exons. Ainsi chez la souris, il a été rapporté que les gènes des protocadhérimnes clusterisées possèdent des régions constantes qui codent pour une région partagée en C-terminal mais que chaque sous-groupe a la possibilité de sélectionner différents exons qui codent pour la partie extracellulaire, la partie transmembranaire et la partie variable de la région cytoplasmique. Les Pcdh α ont 14 exons variables et les deux groupes des Pcdh β et Pcdh γ en ont 22 (Thu et al., 2014; Hayashi and Takeichi, 2015). Par contraste, les protocadhérimnes δ ont des exons uniques qui ne sont pas partagés par les différents membres de la sous-famille. Le mécanisme d'épissage alternatif permet tout de même de générer des isoformes (Redies et al., 2005).

Tout comme les cadhérimnes classiques, les protocadhérimnes sont impliquées dans l'adhésion cellulaire. Cependant, il a été montré que l'intensité des interactions cellule-cellule

est plus faible lorsque les protocadhérines sont mises en jeu plutôt que les cadhérines. Les protocadhérines clusterisées sont capables de générer des interactions homophiliques. Dans leur étude, Thu et al., ont montré que l'ensemble des isoformes possibles (12 pour les Pcdh α , 22 pour les Pcdh β et 19 pour les Pcdh γ) étaient capables de former des agrégats de différentes tailles, dépendant du niveau d'expression de la protéine et de l'affinité d'interaction. Egalement, la co-expression de plusieurs isoformes au sein d'une même cellule peut générer de nouvelles spécificités d'interactions (Thu et al., 2014). Ces résultats sont intéressants car physiologiquement, la cellule n'exprime pas un type mais une multitude de protéines d'adhésion qui peuvent coopérer pour fournir une nouvelle fonction. Les études *in vitro* permettent de simplifier le modèle mais il est important de garder à l'esprit que le mécanisme est plus complexe *in vivo*. Les protocadhérines δ peuvent elles aussi interagir de façon homophile. Une étude similaire a montré que deux groupes cellulaires exprimant la même protocadhérine sont capables de former des agrégats mais que des groupes cellulaires exprimant des protocadhérines différentes ségrégent. En augmentant progressivement la vitesse de centrifugation des agrégats de façon à dissocier progressivement les cellules, les auteurs ont quantifié la force d'interaction selon les protéines exprimées. Les protéines ont des affinités d'adhésion différentes, par exemple la Pcdh7 est capable de générer des interactions plus fortes que la Pcdh1 ou la Pcdh17 (Bisogni et al., 2018). Les différentes protocadhérines sont exprimées dans des tissus distincts et à des moments différents. Selon le profil de molécules exprimé, les propriétés adhésives peuvent être régulées et changées au cours du temps, ce qui est important pour procurer une plasticité cellulaire et des capacités d'adaptation.

Les protocadhérines interagissent en *Trans* avec leurs homologues grâce à leurs quatre premiers domaines EC en N-terminal (**Figure I6-b et I6-c**). Alors que les protocadhérines clusterisées sont capables de former des dimères *Cis*, les protocadhérines non-clusterisées n'en sont pas capables. Elles vont alors former des dimères *Trans* en antiparallèles, ce qui a été révélé par cristallographie, chez le poisson zèbre et chez l'homme (Cooper et al., 2016; Modak and Sotomayor, 2019). Les protocadhérines clusterisées vont s'associer en *Cis* via leurs deux derniers domaines EC mais les quatre autres domaines n'interagissent pas. C'est une association qui présente des similitudes avec le modèle en fermeture éclair des cadhérines classiques mais qui semble moins compacte. Il est possible de visualiser les interactions physiques des molécules par microscopie électronique et technique de tomographie au niveau des membranes des liposomes (Brasch et al., 2019; Harrison et al., 2020). Beaucoup de protocadhérines sont

exprimées au niveau du système nerveux de façon stochastique, procurant des caractéristiques propres aux cellules pour sonder et interagir avec leur environnement.

2.2.3. Les protocadhérines $\delta 2$: PCDH10 et PCDH18

La sous-classe des protocadhérines $\delta 2$ a été définie pour la première fois en 2001. Alors que la PCDH8 était déjà décrite et caractérisée, l'identification d'un motif de 17 acides aminés présent dans trois autres protéines a permis d'inclure les PCDH10, PCDH18 et PCDH19 dans la même sous-classe (Wolverton and Lalande, 2001). Aujourd'hui elle comporte cinq membres qui ont des fonctions différentes et des études montrent que des mutations sont à l'origine de dysfonctionnements.

Tout d'abord, il a été rapporté que des mutations de la séquence de ces protocadhérines peuvent être à l'origine de désordres neurologiques. Une délétion dans la séquence de la PCDH10 a été mise en cause dans les troubles autistes (Morrow et al., 2008) et des mutations de la PCDH17 sont plus associées avec des troubles de la personnalité comme la schizophrénie (Dean et al., 2007; Chang et al., 2018). La PCDH19 est localisée sur le chromosome X et sa mutation est connue pour être responsable d'un large spectre de désordres touchant la population féminine comme des retards cognitifs et des convulsions, retrouvé dans l'épilepsie (Dibbens et al., 2008; Hynes et al., 2010; Smith et al., 2018).

Mais surtout, les protocadhérines sont décrites comme des suppresseurs de tumeur et leurs mutations ont été relatés comme étant à l'origine de nombreux cancers. Souvent, c'est au niveau épigénétique que les dysfonctionnements sont présents avec des dérégulations des méthylation de l'ADN entraînant l'inhibition ou la sur-activation de l'expression de gènes. La liste non exhaustive qui suit se veut donner un aperçu de la multitude de cancers dans lesquels les mutations des protocadhérines sont mises en cause. La PCDH8 est impliquée dans les cancers du sein et du foie (Yu et al., 2008; Zhang et al., 2016). La PCDH10 est associée à de mauvais pronostics chez les patients ayant développé un cancer et ces mutations sont retrouvées aussi bien dans les lymphomes, les cancers de la vessie que dans les cancers gastriques (Li et al., 2012b; Ma et al., 2013; Bing et al., 2018; Curia et al., 2019). Il a été montré qu'une dérégulation de l'expression de la PCDH10 avait des conséquences sur la régulation de la voie Wnt/ β -caténine et donc sur l'expression des gènes cibles, ce qui est mis en cause dans le cancer de l'endomètre utérin et le myélome (Zhao et al., 2014; Xu et al., 2015). En plus des régulations épigénétiques, la région promotrice de PCDH10 a été identifiée et caractérisée, et au moins

deux facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de l'expression basale de PCDH10 (Li et al., 2011). Les PCDH18 et PCDH19 sont, quant à elles, retrouvées dans le cancer hépatique et du colon (Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Contrairement aux cadhérines, les protocadhérines $\delta 2$ ne sont pas capables d'interagir avec les caténines pour se lier au cytosquelette d'actine. Néanmoins, il a été montré que toutes les protocadhérines $\delta 2$ ont dans leur partie cytoplasmique, un peptide de six acides aminés (FSTFGK) appelé WIRS (pour « WAVE interacting receptor sequence ») qui permet à la protéine d'interagir avec le complexe WAVE, impliqué dans la nucléation de l'actine. Cet autre mécanisme procure lui aussi un effet régulateur des protocadhérines sur la dynamique de l'actine. La liaison directe ou indirecte des molécules d'adhésion au cytosquelette d'actine est un processus bien conservé et, même si l'échafaudage moléculaire peut différer, la fonction finale est globalement maintenue, ce qui montre le rôle crucial de ces interactions. Le complexe WAVE est composé de cinq sous-unités et l'ensemble forme le WRC (pour « WAVE regulatory complex ») : Sra1, Nap1, Abi2, HSPC300 et WAVE1. Le peptide WIRS se situe en C-terminal de la protéine, en aval des deux motifs conservés CM1 et CM2 (Chen et al., 2010, 2014a). Les PCDH10 et PCDH18 interagissent avec le WRC via la sous-unité Nap1, ce qui a été montré par des expériences *in vitro*, et *in vivo* chez le poisson zèbre (Nakao et al., 2008; Biswas et al., 2014).

La littérature et des expériences préliminaires nous ont amenés à nous intéresser particulièrement aux PCDH10 et PCDH18 pour notre étude. Ceci sera détaillé dans la première partie des résultats. Chez le poisson zèbre, une duplication entière du génome chez les téléostéens a conduit à la présence de paralogues – gènes homologues qui descendent d'un même gène ancestral et qui ont divergé pour devenir paralogues – pour de nombreux gènes. La *Pcdh10a* et la *Pcdh10b*, ainsi que la *Pcdh18a* et la *Pcdh18b*, sont chez le poisson zèbre des protéines distinctes avec des profils d'expression propres. La séquence de ces gènes est bien conservée entre l'homme, la souris et le poisson : par rapport à la séquence génomique de *PCDH10* de l'homme, il y a 87% d'identité chez la souris, 71% pour *pcdh10a* et 70% pour *pcdh10b* du poisson et de même, *PCDH18* de l'homme possède 86% de similitude avec la souris, 72% avec *pcdh18a* et 69% avec *pcdh18b* du poisson. Concernant les séquences protéiques, *PCDH10* humaine présente 97% d'identité avec la souris et 74% avec *Pcdh10a* et *Pcdh10b* du poisson, tandis que *PCDH18* humaine possède 93% de similitude avec la protéine murine et 68% avec *Pcdh18a*, ainsi que 67% avec *Pcdh18b* du poisson.

Le gène *pcdh10b* du poisson zèbre a été cloné pour la première fois en 2006, et l'inhibition de son expression a permis de montrer que la protéine est impliquée dans la somitogenèse (Murakami et al., 2006). A 11 hpf, l'expression de *pcdh10b* est retrouvée au niveau du mésoderme pré-somitique, atteint un pic au dernier somite formé puis diminue progressivement, ce qui suggère une implication dans le développement des somites. Grâce à un morpholino qui permet de diminuer l'expression du gène et à l'expression d'une construction dominante négative sécrétée, les auteurs ont montré que ces perturbations induisent de lourds défauts de la somitogenèse avec des contractions ou des fusions de somites adjacents, une absence de somite ou une malformation généralisée des somites (Murakami et al., 2006). Ces résultats ont été plus tard confirmés par mutagenèse dirigée du gène *pcdh10b* (Williams et al., 2018). Par ailleurs, cette même étude montre que la protéine Pcdh10a est requise pour la migration des précurseurs des mélanocytes, dérivés de la crête neurale. La suppression de cette protéine résulte en une différenciation précoce des précurseurs des mélanocytes et provoque des défauts de leur migration. Ici la protocadhérine est au carrefour de deux fonctions essentielles. Sa perte ne permet plus aux cellules d'interagir entre elles et avec les autres types cellulaires qui les entourent. Il en résulte des difficultés à sonder l'environnement pour connaître le chemin et à une perte trop précoce de l'état indifférencié, qui peut être dû à des dérégulations transcriptionnelles.

Quant à Pcdh18a, il a été montré que cette protéine joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et dans le comportement des cellules en migration durant la gastrulation de l'embryon. Une réduction de l'expression de *pcdh18a* par un morpholino entraîne un retard de l'épibolie et des défauts de mise en place de l'axe rostro-caudal. Un test de dissociation *in vitro* des embryons au stade sphère, peu avant la gastrulation, révèle une augmentation de la vitesse de dissociation des cellules. Enfin, des expériences de greffe de cellules délétées ou non de Pcdh18a montrent que l'effet est cellule-autonome (Aamar and Dawid, 2008). La Pcdh18a aurait également un rôle dans la formation de la notochorde lors de la migration des cellules progénitrices (Bosze et al., 2020). La Pcdh18b est plutôt impliquée dans la formation des circuits neuronaux par sa fonction de guidage des axones lors de leur croissance. L'utilisation d'un morpholino spécifique de ce gène conduit à des défauts d'arborisation axonale des cellules, qui présentent moins de ramifications. La délétion de Nap1 conduit au même phénotype, ce qui suggère que le dysfonctionnement est dû à des problèmes d'interaction avec l'actine (Biswas et al., 2014).

2.3. L'implication des molécules d'adhésion lors d'évènements morphogénétiques

La régulation des gènes au sein de la cellule elle-même ne suffit pas pour expliquer l'embryogenèse. Il faut considérer le processus dans son ensemble car la morphogenèse est un déplacement collectif de cellules qui interagissent et communiquent (Edelman and Gallin, 1987). Les cadhérines jouent un rôle important dans les mécanismes de morphogenèse car la dynamique des interactions, qui peuvent être plus ou moins fortes et la nature des protéines, qui sont exprimées, sont des facteurs clés pour régir le processus (Takeichi, 1988). Voici quelques exemples de molécules d'adhésion impliquées dans des évènements morphogénétiques.

2.3.1. *Segmentation du mésoderme pré-somitique lors de la somitogenèse*

La somitogenèse est finement régulée par un mécanisme appelé « clock and wavefront model » qui explique la segmentation du mésoderme pré-somitique grâce à l'expression oscillante de gènes particuliers qui vont former un gradient. Un panel de gènes est mis en jeu dans la formation des segments, enrôlés dans des boucles de régulations. La littérature est assez vaste et de nombreuses études ont été réalisées dans différents organismes et cellules en culture, pour revue (Hubaud and Pourquié, 2014).

Lors de la somitogenèse, les protéines d'adhésion sont très présentes puisqu'il s'agit de former une séparation physique entre les segments. Elles sont également actives au sein du somite formé car les cellules mésenchymateuses du mésoderme doivent acquérir des propriétés épithéliales. La cadhérine 2, ou N-cadhérine, adopte un gradient d'expression antéro-postérieur en dent de scie, du côté postérieur vers le côté antérieur du somite. Elle est nécessaire à l'épithélialisation du somite et collabore avec l'intégrine $\alpha 5$ /fibronectine pour favoriser la formation de la limite du somite (Jülich et al., 2015; McMillen et al., 2016). Le rôle de la PCDH8 est également décisif puisqu'il a été montré que le gain ou la perte de fonction de cette protéine provoquait des défauts de la somitogenèse. Son expression est complémentaire de celle de la cadhérine 2, c'est-à-dire qu'elle est exprimée dans le mésoderme pré-somitique, à l'interface de la future limite du somite et dans la partie antérieure des somites nouvellement formés. Les cellules qui expriment la PAPC ont une activité endocytaire ce qui induit l'internalisation de la cadhérine 2 dans la partie antérieure du somite. L'expression périodique de la PAPC dans le mésoderme pré-somitique permet de réguler l'endocytose de la cadhérine 2 de façon rythmique. Il y a alors une perte de l'adhésion des cellules, ce qui provoque l'individualisation du somite en formation (Chal et al., 2017).

A noter que ce mécanisme d'endocytose de la N-cadhérine n'est pas exclusivement retrouvé dans la segmentation du mésoderme pré-somitique mais également dans l'activité synaptique. Au niveau des neurones de l'hippocampe, l'arrivée d'un signal spécifique va induire l'internalisation par endocytose de la N-cadhérine impliquant la Pcdh8. Ce mécanisme est proposé pour transduire des signaux de stimulation de l'activité neuronale et induire des changements de la morphologie des synapses (Yasuda et al., 2007; Hayashi and Takeichi, 2015).

2.3.2. *La transition épithélio-mésenchymateuse*

Lors du développement, les cellules ont la capacité de transiter d'un type cellulaire vers un autre via un remaniement de leurs jonctions, de leur cytosquelette et de l'expression de leurs gènes. Un mécanisme bien décrit est celui de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) où une cellule ou un groupe de cellules délamine de son tissu épithélial et acquiert des caractéristiques mésenchymateuses avec de nouvelles capacités migratoires (**Figure I9**). Il représente un concept clé en embryologie puisque c'est ainsi que le mésoderme est formé, initialement épithélial chez la drosophile et le xénope, et que l'émergence des cellules de la crête neurale se fait. Il est également mis en cause dans l'invasion cellulaire lors des cancers. En effet, les cellules entament ce type de transition lorsqu'elles sortent de la tumeur de type épithélial, pour migrer dans un autre tissu, à l'origine des métastases.

La TEM est un processus réversible, c'est-à-dire que la cellule mésenchymateuse peut également acquérir des caractéristiques épithéliales, ce qui est retrouvé lors de la somitogenèse où les cellules du mésoderme pré-somitique de type mésenchymateux s'épithélialisent lors de la segmentation et maturation du somite. C'est un mécanisme assez complexe qui prend place à trois niveaux, décrits en général chronologiquement : 1) la perte des jonctions cellulaires qui se règle au niveau transcriptionnel mais également avec la dégradation des molécules d'adhésion et leur recyclage, 2) le remaniement du cytosquelette qui résulte des changements dans l'adhésion cellulaire, et 3) la perte de la polarité cellulaire apico-basale qui permet à la cellule d'acquérir des capacités migratoires (Thiery and Sleeman, 2006). L'une des marques les plus connues de la TEM est la perte de la E-cadhérine. Au niveau moléculaire, il y a une inhibition de son expression par les gènes *SNAIL* et *SNAIL2* et au niveau cellulaire, il y a endocytose des protéines déjà présentes à la membrane plasmique pour permettre leur recyclage et leur dégradation (Kawauchi, 2012). Ce mécanisme d'endocytose est important dans la régulation de l'adhésion car il permet aux systèmes d'avoir une bonne réactivité. En effet,

lorsque le gène est inhibé au niveau moléculaire, l'action se portera sur les protéines nouvellement formées mais les protéines en place peuvent avoir une longue demi-vie. Aussi, les métalloprotéases matricielles permettent de cliver les protéines à la surface cellulaire afin de casser les interactions et rompre l'attachement de la membrane à la matrice extracellulaire. De nombreuses voies de signalisation et différents acteurs sont impliqués pour inhiber les marqueurs épithéliaux et activer les marqueurs mésenchymateux, pour revue (Das et al., 2019).

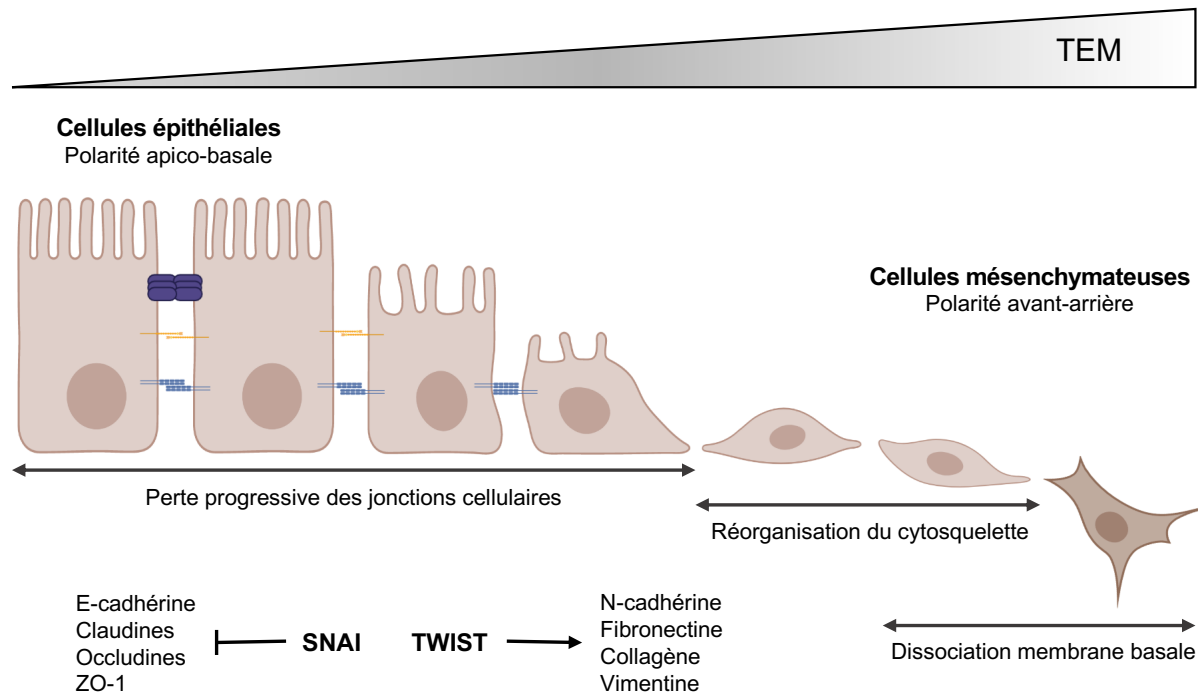


Figure I9 – La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La transition épithélio-mésenchymateuse est le passage d'un type cellulaire épithélial vers un type cellulaire mésenchymateux. Elle est caractérisée par la perte progressive des jonctions serrées et desmosomales, puis par une réorganisation du cytosquelette d'actine qui entraîne la perte de la polarité apico-basale. La dernière étape est la dissociation de la membrane basale qui permet à la cellule de sortir de l'épithélium et de migrer. Les marqueurs épithéliaux sont la E-cadhérine, les claudines et occludines, ZO-1 tandis que les marqueurs mésenchymateux sont la N-cadhérine, la fibronectine, le collagène et la vimentine. Les facteurs de transcription SNAI et TWIST sont importants pour la transition et inhibent les gènes épithéliaux ou activent les gènes mésenchymateux.

Figure réalisée à partir de (Aroeira et al., 2007)

Les cellules de la crête neurale (CCN) sont un bon modèle pour étudier la TEM. Lors du développement, il y a invagination de la partie centrale de la plaque neurale et accolement des bords de la gouttière neurale qui vont fusionner pour former le tube neural. Alors que la E-cadhérine est exprimée pendant la neurulation, son expression est remplacée par celle de la N-cadhérine dans les CCN (Hatta and Takeichi, 1986). Le niveau d'expression de la N-cadhérine est crucial car il joue un rôle important dans la spécification et l'émergence des cellules. Une inhibition de la N-cadhérine provoque une migration ectopique de CCNs et une surexpression

de cette protéine empêche la migration des CCNs (Bronner-Fraser et al., 1992). L'inhibition de la N-cadhérine, conduisant à l'émergence des cellules, est due à des régulations post-transcriptionnelles. Le gène *BMP4* (pour « Bone morphogenetic protein 4 ») est exprimé dans la partie dorsale du tube neural et régule positivement l'expression de la métalloprotéase ADAM10. Celle-ci est capable de cliver la N-cadhérine, ce qui diminue les interactions cellule-cellule et favorise la délamination des progéniteurs de la crête neurale, nécessaire à l'émergence des cellules. De plus, la translocation au noyau du produit de clivage, c'est-à-dire la partie cytoplasmique de la N-cadhérine qui se fixe à la β -caténine, régule positivement l'expression de gènes impliqués dans la TEM (Shoval et al., 2006; Taneyhill and Padmanabhan, 2014). Les CCN délaminent de la partie dorsale du tube neural pour aller migrer et se différencier en différents types cellulaires (cellules neurales, des pigments et du cartilage). En plus de l'implication de la N-cadhérine, l'émergence des cellules dépend de la répression de la cadhérine 6B par le facteur de transcription Snail2, exprimé par les CCN. Il a été montré que des dérégulations de cette inhibition altèrent la migration des CCN (Taneyhill et al., 2007).

3. La migration cellulaire et sa régulation

La migration cellulaire est essentielle lors du développement car elle permet aux cellules de se déplacer pour aller former un nouveau tissu. Elle est aussi importante tout au long de la vie car elle est retrouvée dans de nombreux processus comme la réparation tissulaire ou le recrutement des cellules du système immunitaire. Elle implique beaucoup de molécules d'adhésion, d'interactants et de voies de signalisation pour permettre à la cellule de s'attacher à la matrice extracellulaire et de former des protrusions qui requièrent le remaniement du cytosquelette d'actine. La cellule peut alors migrer grâce aux forces générées. La migration est régulée de manière intrinsèque au sein de la cellule elle-même mais aussi de manière extrinsèque par des molécules présentes dans la matrice extracellulaire et par des interactions avec les cellules avoisinantes. Sa dérégulation est mise en cause dans plusieurs maladies, notamment dans l'invasion cellulaire et l'apparition de métastases lors des cancers.

3.1. Les mécanismes de la modulation de l'actine

3.1.1. La dynamique de l'actine et son contrôle

Afin de former des filaments d'actine *de novo*, plusieurs étapes sont nécessaires pour passer d'un stade instable à une polymérisation stable et rapide de filaments. L'actine existe sous deux formes : l'actine-G (actine globulaire) qui est une molécule d'actine libre et l'actine-F (actine filamenteuse) où plusieurs molécules d'actine sont polymérisées sous forme de filaments (**Figure I10-a**). C'est un processus dynamique qui a besoin d'énergie. Des oligomères d'actine (actine-G-ATP) peuvent s'associer en monomères de façon spontanée puis, par une réaction en chaîne, se polymériser les uns à la suite des autres pour former un filament. Celui-ci va avoir une polarité car l'association va être plus rapide à l'extrémité (+) de par l'activité ATPase de l'actine, qu'à l'extrémité (-) suite à l'hydrolyse de l'ATP lié à l'actine en ADP, qui déstabilise le filament et favorise sa dépolymérisation (Nürnberg et al., 2011).

Ce mécanisme de polymérisation/dépolymérisation est régulé au niveau moléculaire (**Figure I10-b**). Les niveaux de protéines présents dans le cytoplasme sont importants pour réguler l'homéostasie du cytosquelette cellulaire. Les profilines ont la capacité de se lier aux monomères d'actine-G pour favoriser leur polymérisation. Les protéines Ena/VASP peuvent empêcher la formation de la coiffe, où les protéines Cap se fixent sur l'extrémité (+) du filament en formation pour arrêter son élongation, ce qui favorise également l'élongation des filaments

(Rotty and Bear, 2015). Assez récemment la polymérisation/dépolymérisation d'un unique filament d'actine a pu être observé par la technique de microscopie TIRF (Fujiwara et al., 2018).

En plus de l'élongation longitudinale des filaments d'actine, ceux-ci peuvent être régulés au niveau de la nucléation de branches grâce au complexe Arp2/3 (**Figure I10-c**). Il est composé de sept protéines dont Arp2 et Arp3 (pour « Actin related protein ») et permet la nucléation de l'actine par des branchements inclinés à 70° à partir de du filament d'actine déjà formé. Ce n'est pas seulement un complexe qui joue le rôle de base pour la formation d'un filament fille à partir du filament mère car il est impliqué activement dans la promotion de la nucléation de l'actine. Il peut être en conformation inactive ou active, favorisée par des facteurs de nucléation ou les protéines de la famille WASP (Robinson et al., 2001).

Les protéines WASP (pour « Wiskott-Aldrich syndrome protein ») et WAVE (pour « WASP-family verprolin-homologous protein ») sont importantes pour la réorganisation du cytosquelette. Elles sont recrutées à la membrane via leur liaison directe ou indirecte aux molécules d'adhésion, et activées grâce aux signaux générés par les Rho-GTPases, petites protéines impliquées dans les changements de morphologie cellulaire et dans la migration (**Figure I10-d**). Une fois activées, elles peuvent interagir avec le complexe Arp2/3 pour activer la nucléation de l'actine et les réorganisations du cytosquelette (Kurisu and Takenawa, 2009).

Ancrées à la membrane plasmique, les cadhérines sont aussi capables d'interagir avec l'actine via les β - et α -caténines. La liaison homophile de la E-cadhérine permet de recruter la Rac-GTPase et d'activer le complexe Arp2/3 pour la polymérisation de l'actine à la membrane (Kovacs et al., 2002). Cela est aussi vrai avec le complexe WAVE ; il a été montré qu'en réponse au signal des Rac-GTPase, il était capable d'activer Arp2/3 et de recruter le cytosquelette d'actine à la membrane (Chen et al., 2014b).

Le recrutement et l'activation d'acteurs impliqués dans la nucléation de l'actine à la membrane permet d'attirer la polymérisation de l'actine à des sites bien spécifiques. La cellule peut sonder son environnement grâce à des protrusions membranaires, impliquées notamment dans la migration. Selon les signaux captés et les molécules mises en jeu, les protrusions peuvent avoir différentes morphologies qui procurent des capacités propres aux cellules.

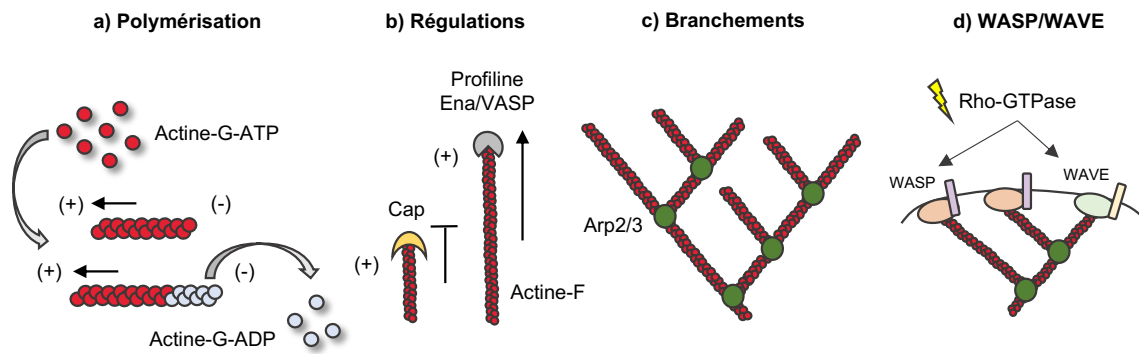


Figure I10 – La dynamique de l’actine et ses régulations

La dynamique de l’actine est un processus important pour la motilité et la migration cellulaire qui est finement régulée par des acteurs moléculaires. **a)** La polymérisation de l’actine se fait, dans un premier temps de manière spontanée par association en monomère de deux molécules d’actine-G, puis il y a polymérisation et polarisation du filament d’actine généré car l’association des molécules est plus rapide à l’extrémité (+) qu’à l’extrémité (-). Il y a hydrolyse de l’ATP lié à l’actine en ADP à l’extrémité (-), ce qui déstabilise le filament et entraîne sa dépolymérisation. **b)** Tandis que les protéines Cap se fixent sur l’actine-F afin d’arrêter sa polymérisation, les profilines ou protéines Ena/VASP ont la capacité de se fixer sur l’actine-G pour favoriser l’élongation des filaments. **c)** Le complexe Arp2/3 participe activement à la naissance d’un nouveau filament d’actine par nucléation de branches à partir d’un filament déjà formé. **d)** Les protéines WASP/WAVE sont recrutées à la membrane et l’activation par les Rho-GTPase leur permet d’interagir et d’activer le complexe Arp2/3.

Figure réalisée à partir de (Robinson et al., 2001; Kurisu and Takenawa, 2009; Nürnberg et al., 2011; Rotty and Bear, 2015)

3.1.2. Les protrusions des cellules en migration

Les cellules ont développé différents modes de migration en fonction des contraintes de l’environnement et de régulations moléculaires intrinsèques. Elles adoptent une polarité dite avant-arrière avec un front de migration où des forces sont générées pour faire avancer la cellule. Ancrées à la matrice extracellulaire par les adhésions focales, les cellules vont former des lamellipodes qui sont des projections planes de membrane, ainsi que des filopodes qui sont des structures beaucoup plus fines et longues, permettant de sonder l’environnement cellulaire.

La cellule interagit avec son environnement grâce aux adhésions focales qui sont un type de contact adhésif entre la cellule et la matrice extracellulaire. Elles sont médiées par les intégrines qui se lient à des ligands de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou le collagène. La liaison intégrine-matrice permet d’ancrer la cellule au substrat et la liaison intégrine-actine sert de médiateur de signalisation mécanique et biochimique (**Figure I11-a**). Les forces de tension générées au niveau des adhésions focales peuvent être mesurées de façon dynamique grâce à des molécules « senseurs » biologiques. Les forces exercées sur la vinculine, qui permet de lier les intégrines au cytosquelette d’actine, ont été mesurées dans différentes conditions. Lorsque les adhésions focales sont stables, les forces générées sont de l’ordre de 2.5

pN. Les forces de tension augmentent lorsque les adhésions s'assemblent et s'élargissent à l'avant, et diminuent lorsqu'il y a désassemblage du côté opposé au front de migration (Grashoff et al., 2010). La mécanotransduction est un mécanisme important qui, au niveau des protéines d'adhésion, peut permettre d'induire un changement de conformation qui rend accessibles des sites de fixation à de nouveaux interactants afin de renforcer les jonctions ou engendrer des remaniements du cytosquelette.

Les lamellipodes sont des extensions de membranes assez planes et larges que la cellule déploie vers l'avant pour sonder l'environnement et interagir avec la matrice extracellulaire. Au niveau des adhésions focales, la cellule s'attache à son substrat et les intégrines interagissent avec l'actine. La polymérisation de l'actine au niveau des lamellipodes induit un flux rétrograde qui génère des forces de traction et polarise la protrusion membranaire vers l'avant (Case and Waterman, 2015). Ce mode de migration est caractéristique des cellules mésenchymateuses. Les cellules vont ramper grâce à l'assemblage à l'avant des intégrines avec la matrice extracellulaire au niveau du lamellipode et désassemblage à l'arrière du front de migration. Par des mouvements de traction et contraction, la cellule peut migrer dans son environnement (Innocenti, 2018).

Comme décrit précédemment, les protéines WASP et WAVE favorisent la formation de lamellipodes. Ces activateurs du complexe Arp2/3 vont être recrutés et activés à la membrane, ce qui promeut la nucléation et la polymérisation de l'actine à des sites spécifiques (**Figure I11-b**). Les filopodes sont des structures plus fines de protrusions membranaires qui sont des prolongements transitoires. Ils permettent aux cellules de découvrir rapidement leur environnement et d'interagir entre elles. Ils font plutôt appel à des prolongements longitudinaux de l'actine-F et donc aux profilines ou aux protéines Ena/VASP (**Figure I11-c**).

Il existe une certaine compétition entre les différents acteurs de la nucléation de l'actine et notamment entre les acteurs favorisant l'activation du complexe Arp2/3 et les profilines et Ena/VASP. L'actine n'est pas distribuée de la même manière aux différentes voies, et cela est ajusté en fonction des signaux perçus. L'équilibre entre la nucléation de nouveaux filaments et le prolongement de filaments déjà existants est important pour l'homéostasie de la dynamique de l'actine. La perte d'un des deux types d'acteurs va induire des perturbations. Des dysfonctionnements des protéines Ena/VASP entraînent la formation d'un réseau d'actine plus dense avec des branches courtes, ce qui est en faveur d'une nucléation plus active. La perturbation des formines inhibe l'allongement des filaments et diminue la vitesse de la

migration cellulaire. Enfin, la perte d'activité du complexe Arp2/3 provoque une diminution de la nucléation du réseau d'actine et une formation de longues protrusions (Rotty and Bear, 2015). Dans le même sens, il a été montré que la formation des lamellipodes est fortement affectée par l'absence des complexes WAVE et Arp2/3, alors que la formation des filopodes n'en dépend pas. Cela montre que les filopodes ne nécessitent pas la formation de lamellipodes pour être générés (Steffen et al., 2006). Chez le poisson zèbre, il a été montré que la Rho-GTPase Cdc42 se fixe sur la partie N-terminale de la formine Fmn13 pour promouvoir la formation de filopodes des cellules endothéliales au niveau des bourgeons vasculaires. L'inhibition de Cdc42 ou de Fmn13 induit des problèmes d'angiogenèse qui causent une malformation du plexus veineux caudal (Wakayama et al., 2015).

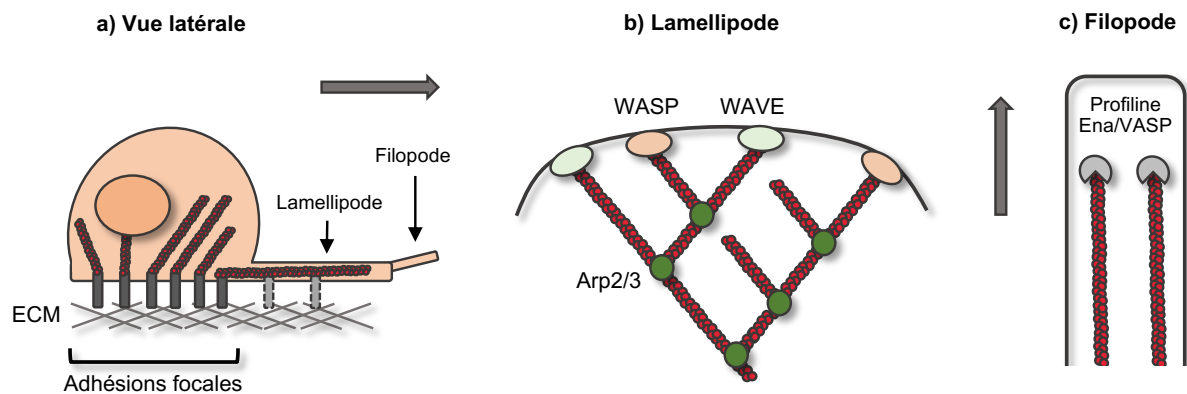


Figure I11 – Adhésion focale et protrusions membranaires

Lors de la migration, les cellules interagissent avec la matrice extracellulaire et envoient des projections vers l'avant. **a)** La cellule est ancrée à la matrice extracellulaire via les interactions intégrines-matrice au niveau des adhésions focales. Elle envoie vers l'avant des lamellipodes, projections larges et planes de membrane qui peuvent être prolongées par des filopodes, projections plus fines de membrane. Les intégrines interagissent avec le cytosquelette d'actine, ce qui permet son transport rétrograde, procurant à la cellule des capacités migratoires. **b)** Les lamellipodes font intervenir le complexe Arp2/3 impliqué dans la nucléation de l'actine et ses activateurs comme les protéines de la famille WASP et WAVE mais il en existe d'autres. **c)** Les filopodes font intervenir les acteurs de l'élongation des filaments d'actine, notamment les profiline qui se fixent aux monomères d'actine-G et les protéines Ena/WASP qui empêchent la coiffe des filaments d'actine-F.

Figure réalisée à partir de (Innocenti, 2018; Bodor et al., 2020)

3.2. La migration cellulaire et ses régulations extrinsèques

La migration cellulaire répond à des stimuli de l'environnement. Les cellules peuvent migrer selon un gradient de rigidité de substrat appelé durotaxie, selon un gradient de ligands présents sur un substrat, appelé haptotaxie, ou bien selon un gradient de molécules chimiques solubles présentes dans l'environnement, appelé chimiotaxie. Elles vont alors adapter la directionnalité de leur migration en fonction du signal perçu. De plus, les cellules vont interagir physiquement entre elles lors des migrations collectives, ce qui peut impacter leur migration

par inhibition de contact, ou, au contraire, promouvoir la migration lorsqu'une cellule de tête montre le chemin aux suivantes.

3.2.1. Les mécanismes de la migration dirigée

La migration dirigée s'oppose à la migration aléatoire, où la migration cellulaire n'est pas soumise à des signaux extrinsèques de l'environnement. La cellule va alors migrer de manière aléatoire sans atteindre une localisation précise. La migration dirigée est, quant à elle, retrouvée dans de nombreux processus, aussi bien lors du développement embryonnaire que dans la réparation tissulaire ou dans la migration des cellules du système immunitaire au site d'infection. Les cellules vont migrer jusqu'à un point bien précis, ce qui est possible par un gradient de molécules dans l'environnement. Cette migration cellulaire peut être caractérisée par sa vitesse et la persistance de sa directionnalité (Petrie et al., 2009).

Pour étudier la durotaxie, des études *in vitro* ont entrepris de caractériser la migration d'un type cellulaire donné sur différents substrats de dureté variée (**Figure I12-a**). *In vivo*, cela est pertinent car les tissus sont plus ou moins élastiques, ce qui dépend des types cellulaires résidents et de la composition de la matrice extracellulaire qui est plus ou moins rigide. En conditions pathologiques, il peut y avoir des changements d'élasticité tissulaire, par exemple lors de la fibrose, où les tissus ne se régénèrent plus et sont remplacés par le développement de matrice extracellulaire. Les cellules souches mésenchymateuses répondent à l'élasticité de la niche et vont migrer avant de se différencier. Sur gel de polyacrylamide, elles ont tendance à migrer vers les régions les plus dures et leur vitesse de migration augmente avec la pente du gradient (Vincent et al., 2013). Les fibroblastes ont également une préférence pour les substrats de rigidité élevée, ce qui s'explique par des forces de traction plus fortes sur les substrats durs. Les cellules ont donc la capacité de déterminer la direction préférentielle de leur migration en fonction de signaux mécaniques captés dans leur environnement physique (Lo et al., 2000). La forme du substrat a aussi un impact sur la migration cellulaire car elle impose des restrictions mécaniques qui peuvent inhiber la formation de protrusions membranaires (Dunn and Heath, 1976).

Le terme haptotaxie a été introduit pour la première fois dans les années 60 (Carter, 1967). Alors que la durotaxie dépend des propriétés physiques du substrat, l'haptotaxie dépend, quant à elle, de sa composition moléculaire (**Figure I12-b**). Elle met en jeu l'interaction cellule-matrice médiée par des protéines d'adhésion cellulaire, et va donc être dépendante du type

cellulaire. La cellule va migrer selon un gradient d'adhésion, plus l'adhésion sera forte, plus les adhésions focales seront stables. Une étude s'est intéressée aux changements du comportement migratoire de différents types cellulaires lors de la fibrose, c'est-à-dire lorsque la matrice extracellulaire s'accumule de manière disproportionnée. Sur un gel de polyacrylamide à gradient de collagène, les fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuses n'ont pas les mêmes capacités d'haptotaxie. Les fibroblastes sont capables de migrer sur gel, peu importe la densité de ligands et les capacités de déformation du substrat, tandis que les cellules mésenchymateuses ne migrent que si la densité de ligands est réduite, par introduction de ligands solubles dans le milieu. Les cellules mésenchymateuses sont plus contractiles que les fibroblastes dans les conditions basales, et l'augmentation de la contractilité cellulaire réduit l'haptotaxie. Il existe une densité de ligands de la matrice extracellulaire optimale pour l'attachement des cellules. Son augmentation ou diminution entraîne une déstabilisation des contacts, qui dépend du type cellulaire. Les fibroblastes répondent davantage aux gradients de ligands que les cellules mésenchymateuses (Wen et al., 2015).

La chimiotaxie met en jeu des molécules solubles pour réguler la directionnalité de la migration cellulaire (**Figure I12-c**). C'est un processus qui est retrouvé lors de la morphogenèse mais également dans le cas de la régénération tissulaire et lors du recrutement des cellules immunitaires au site d'infection. Les cellules ont la capacité de détecter un gradient attractif et de transduire cette information. La fixation du ligand sur son récepteur transmembranaire permet d'induire un changement conformationnel de celui-ci, ce qui recrute des molécules effectrices à la membrane, importantes pour le remaniement du cytosquelette de la cellule et la motilité cellulaire. Il existe plusieurs familles de chimioattractants, qui ont des fonctions distinctes et font appel à des récepteurs spécifiques. Ils peuvent avoir des effets endocrines, lorsque la molécule passe dans le sang pour avoir une action à distance, des effets paracrines sur les cellules avoisinantes ou encore des effets autocrines sur la cellule elle-même. Les cytokines sont des glycoprotéines qui peuvent être membranaires ou sécrétées dans l'environnement suite à un stimulus. Elles regroupent plusieurs sous-classes : les chimiokines qui ont pour rôle d'activer et de recruter les cellules immunitaires au site d'inflammation, les interleukines qui ont des fonctions variées dans le contrôle de l'infection et les interférons qui sont produits suite à une infection virale et vont activer des cellules spécialisées du système immunitaire. Les facteurs de croissance peuvent aussi jouer un rôle chimiocinétique car ils ont la capacité de stimuler la motilité cellulaire. Ils sont également importants pour la division et la différenciation cellulaire. Le facteur de croissance PDGF (pour « Platelet derived growth

factor ») a été identifié pour la première fois dans les cellules musculaires (Ross et al., 1974). Il fait appel à des récepteurs (PDGFR) de type tyrosine kinase dont la partie cytoplasmique, possédant des sites de liaison à de nombreux interactants, peut activer différentes voies de signalisation suite à la liaison du ligand à son récepteur. Le PDGF est essentiel pour la prolifération des cellules mésenchymateuses lors du développement, et l'expression des PDGFRs est retrouvée dans les sous-populations de cellules mésenchymateuses progénitrices (Morikawa et al., 2009).

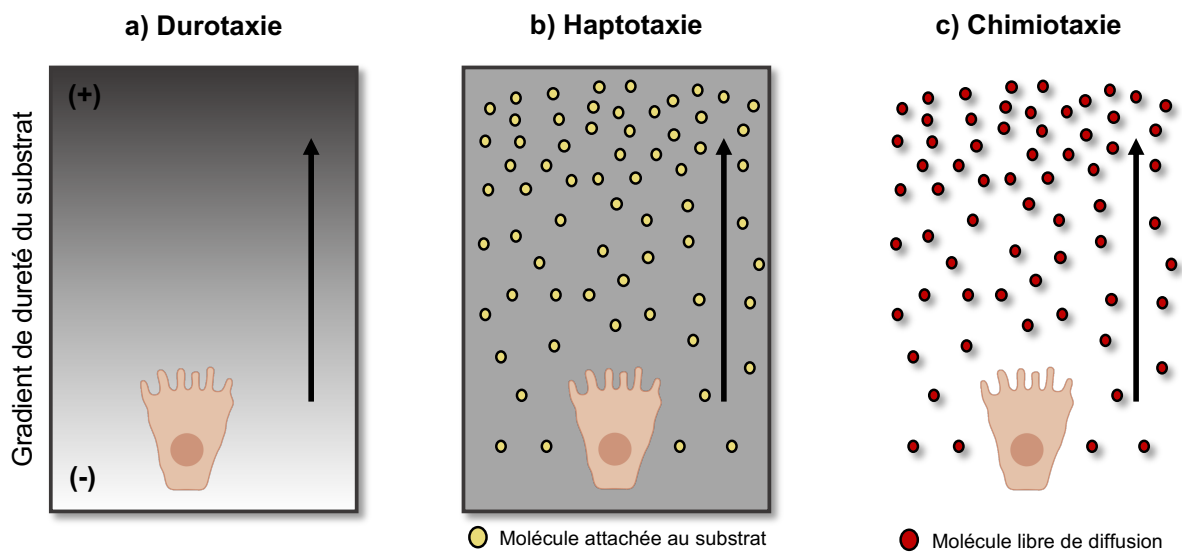


Figure I12 – Facteurs influençant la directionnalité de la migration cellulaire

La migration cellulaire peut être influencée par différents facteurs du milieu extracellulaire. **a)** La durotaxie met en jeu différents gradients de dureté du substrat pour influencer la migration cellulaire. La cellule migre préférentiellement des substrats mous vers les substrats durs. **b)** L'haptotaxie de la cellule dépend du gradient de densité des molécules à la surface du substrat. La cellule a tendance à migrer vers les gradients de densités plus fortes, où il y aura davantage de possibilité de former des adhésions stables. **c)** La chimiotaxie fait appel à de petites molécules solubles, dites chemoattractants, dans l'environnement qui peuvent être des cytokines ou des facteurs de croissance. Un gradient constant de molécules va attirer la cellule vers les concentrations les plus fortes, permettant de diriger la migration cellulaire vers un point précis.

Il peut y avoir des interactions entre les récepteurs de différentes familles. Parfois, l'activation d'un récepteur nécessite des signaux additionnels à la simple liaison ligand/récepteur. Lors de la migration des cellules souches mésenchymateuses, la liaison des intégrines $\alpha 5\beta 1$ à la fibronectine de la matrice extracellulaire permet de phosphoryler le domaine cytoplasmique du PDGFR- β et d'activer la voie de signalisation en absence de stimulation par le ligand. Ces deux récepteurs interagissent physiquement car l'immunoprécipitation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ permet de co-précipiter PDGFR- β phosphorylé. Ce récepteur phosphorylé est retrouvé dans les lamellipodes des cellules en migration et colocalise de manière transitoire avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ au niveau des adhésions focales. La synergie

d'interaction des récepteurs est donc requise pour la migration des cellules souches mésenchymateuses. La matrice, riche en fibronectine, pourrait donc avoir un rôle dans le recrutement des cellules mésenchymateuses à des sites spécifiques (Veevers-Lowe et al., 2011). Une autre étude a montré que des cytokines et d'autres facteurs de croissance jouent un rôle dans le recrutement de cellules souches mésenchymateuses suite à une lésion de la moelle épinière, ce qui montre que la réponse aux signaux est complexe (Li et al., 2012a).

Néanmoins, la liaison ligand/récepteur permet en général d'activer les voies de signalisation, bien que d'autres molécules soient parfois nécessaires. La voie Wnt/PCP (pour « planar cell polarity ») non canonique est impliquée dans la directionnalité de la migration des cellules mésenchymateuses lors de la gastrulation chez le poisson zèbre. L'activation de cette voie est nécessaire pour la formation des protrusions des cellules mésenchymateuses, et son activation ectopique entraîne une redirection de leur migration. Dans ce cas précis, les molécules mises en jeu sont Wnt11 et son récepteur Fzd7. Un point intéressant est que les cellules mésenchymateuses en migration n'expriment pas Wnt11 de façon endogène mais que cette molécule est exprimée par les cellules du mésendoderme paraxial antérieur. Il est alors possible que les cellules du mésendoderme paraxial sécrètent Wnt11, qui va agir de manière paracrine sur les cellules de la plaque préchordale adjacentes pour induire la formation de protrusions et diriger leur migration selon un gradient de molécules Wnt11 présentes dans l'environnement (Čapek et al., 2019). Une autre étude sur la migration des cellules de la crête neurale confirme que Wnt/PCP permet de contrôler la direction de la migration en régulant la localisation et le sens de génération des protrusions membranaires. De plus, il a été montré que la voie Wnt agit en amont et régule positivement l'expression de la molécule d'adhésion Alcam, de la famille des immunoglobulines, importante pour le développement de structures comme les tubules rénaux ou l'œil (Cizelsky et al., 2014; Seigfried et al., 2017). Le protéoglycane syndecane-4 est aussi mis en jeu puisque sa perte de fonction perturbe la directionnalité de la migration. Il y existe une coopération entre ces acteurs car syndecane-4 inhibe l'activité de Rac-GTPase et PCP active l'activité de RhoA-GTPases, qui à son tour peut inhiber Rac. La régulation des GTPase par syndecane-4 et PCP contrôle, du moins en partie, la formation des protrusions, importantes pour guider la migration cellulaire (Matthews et al., 2008).

Depuis quelques années, les cellules souches mésenchymateuses sont étudiées dans le cadre de la médecine régénérative. Elles ont la capacité de migrer jusqu'au site de lésion en répondant à de nombreux chimioattractants qui sont sécrétés par les cellules du tissu ou les

cellules immunitaires déjà en place. Leur potentiel de différenciation est varié, ce qui leur permet de générer une multitude de types cellulaires différents. Suite à leur arrivée au site de lésion, elles peuvent à leur tour sécréter des chimioattractants, permettant de recruter des cellules spécialisées. Aussi, il a été rapporté que leur présence permet, de façon indirecte, de diminuer la réponse inflammatoire afin de favoriser la réparation normale du tissu, d'inhiber la fibrose et l'apoptose et enfin de stimuler l'angiogenèse (Ullah et al., 2019).

3.2.2. *La migration cellulaire collective et coordonnée*

La migration cellulaire est retrouvée dans de nombreux événements allant de la migration d'une cellule unique à la migration d'un groupe de cellules de manière coordonnée. L'un des meilleurs exemples de migration individuelle est le recrutement des cellules du système immunitaire. Bien que les cellules puissent être attirées vers un site bien précis, via des chimiokines, elles vont se déplacer indépendamment les unes des autres et de manière isolée jusqu'à atteindre le lieu d'inflammation. Un autre exemple est la migration des cellules souches hématopoïétiques dans le sang jusqu'à leurs niches. La migration collective est, quant à elle, retrouvée dans de nombreux événements morphogénétiques. Elle est définie par le déplacement coordonné de groupes de cellules qui réagissent de la même manière aux signaux environnementaux et s'influencent, via des interactions stables ou transitoires, grâce aux molécules d'adhésion qu'elles expriment. Lors de la gastrulation, les cellules cohésives, organisées en feuillet épithélial vont migrer collectivement tout en gardant des contacts forts, tandis que lors de la migration des cellules mésenchymateuses, les contacts vont être plus brefs et transitoires via les protrusions membranaires formées (**Figure I13**). En général, il y a une ou quelques cellules de tête, dites meneuses, qui sont légèrement différentes des autres de par leur morphologie et les gènes qu'elles expriment. Elles ont la capacité d'entamer la migration et de montrer le chemin aux autres cellules, dites suiveuses (Aman and Piotrowski, 2010; Scarpa and Mayor, 2016).

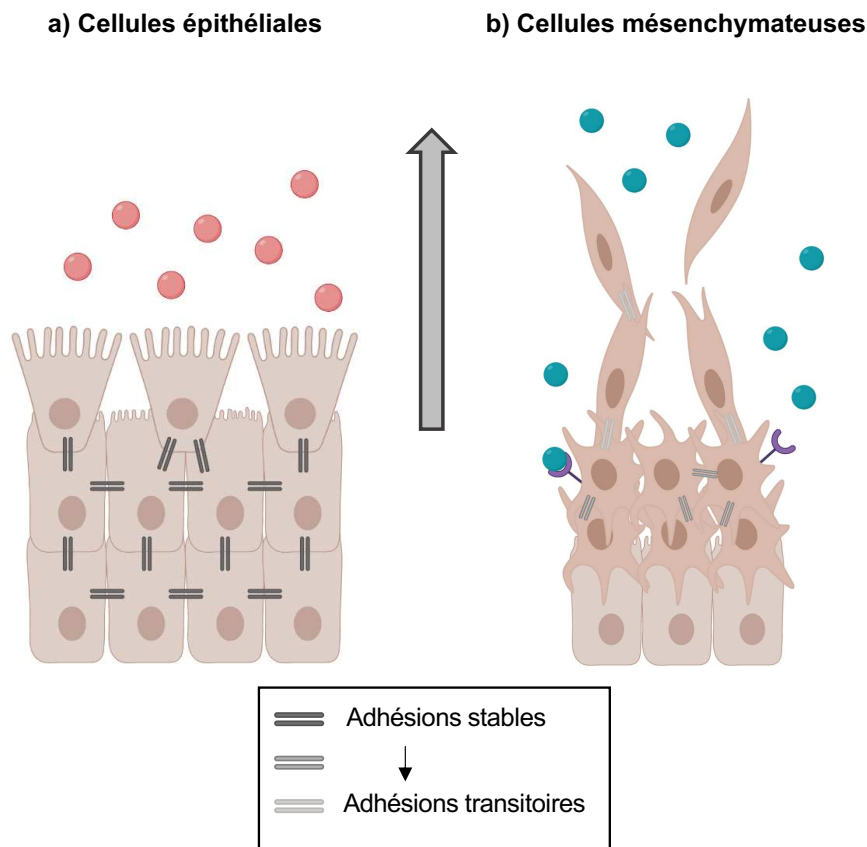


Figure I13 – Migration collective des cellules épithéliales et mésenchymateuses

a) Les cellules épithéliales sont organisées en feuillets cohésifs, liées entre elles par des adhésions stables. Les cellules vont migrer tout en gardant leurs interactions. **b)** Les cellules mésenchymateuses ont des contacts plus brefs et transitoires pendant leur migration. Souvent les filopodes s’allongent et se rétractent pour interagir. **a/b)** Dans les deux cas, les cellules peuvent répondre à des chimioattractants présents dans l’environnement et des cellules meneuses vont montrer le chemin aux suiveuses.

Figure réalisée à partir de (Scarpa and Mayor, 2016)

Les cellules meneuses ont un rôle crucial dans la migration collective. Lors de la migration de cellules épithéliales sur matrice de collagène, la suppression d’une des cellules leadeuses provoque des perturbations de la cohésion des cellules lors de la migration collective. De plus, la Rac-GTPase est retrouvée exclusivement dans les cellules meneuses, ainsi que l’intégrine $\beta 1$ et la kinase PI3K. La perte de fonction de ces molécules résulte en des défauts de la migration collective (Yamaguchi et al., 2015). Les GTPase et les kinases sont importantes pour la formation des protrusions, et les intégrines permettent les interactions avec la matrice extracellulaire. Les cellules suiveuses ne sont pas seulement passives, elles jouent un rôle dans la détermination des cellules meneuses. La monocouche de cellules épithéliales est hétérogène et dynamique. Les cellules à l’arrière, futures suiveuses, présentent une augmentation locale des forces de tension qui va leur permettre de pousser les futures meneuses vers l’avant, forçant leur destin cellulaire (Vishwakarma et al., 2018). La migration collective implique un groupe

de cellules qui peut être assez imposant, jusqu'à plusieurs centaines. Pour leur passage, les cellules ont besoin de réarranger la matrice extracellulaire afin d'avoir assez d'espace. En matrice 3D de collagène, les groupes de cellules se propulsent par la génération de forces de traction et écartent les fibres gênantes de collagène. Les forces ont des fonctions aussi bien physiques que de signalisation, car l'adhérence à la matrice permet de réguler la migration en intracellulaire (Gjorevski et al., 2015).

La migration collective dépend des chimioattractants présents dans l'environnement et du protéome des cellules. Le gradient de molécules perçu peut résulter de deux mécanismes : soit les molécules sont présentes sous forme d'un gradient de concentration dans l'environnement, soit la molécule est en concentration uniforme et ce sont les cellules elles-mêmes qui vont réguler la densité ou le type de récepteurs à leur surface, par endocytose ou régulation de l'expression des gènes. Les cellules leadeuses répondent en général à un signal présent dans l'environnement puis vont, à leur tour, se mettre à produire un chimioattractant, dit secondaire, qui sera capté par les cellules suiveuses (Norden and Lecaudey, 2019). Un bon exemple de migration collective conduite par la signalisation de chimiokines est la formation de la ligne latérale chez le poisson zèbre. A partir des ganglions, un groupe de plus de 100 cellules migre le long de la ligne latérale et dépose, à intervalles réguliers, des groupes de cellules qui vont se différencier en organes sensoriels. La migration débute par la réponse au chimioattractant SDF-1 (pour « stromal cell-derived factor 1 ») et aussi appelé Cxcl12a, capté par le récepteur Cxcr4b exprimé par les cellules. Les cellules migrent avec des protrusions polarisées dans le sens de la migration. Cxcl12a est essentielle, sa perte de fonction provoque des désordres de migration, qui devient non dirigée, et induit la non polarisation des protrusions (Haas and Gilmour, 2006). De façon intéressante, la concentration de Cxcl12a est constante le long de la ligne latérale. Il existe deux récepteurs à Cxcl12a : Cxcr4b, exprimé par l'ensemble des cellules et Cxcr7b, exprimé seulement par les cellules à l'arrière. Cette asymétrie d'expression est importante car la perte d'un des deux récepteurs entraîne une perte de la migration directionnelle. L'hypothèse est que le récepteur Cxcr7b permet de séquestrer Cxcl12a afin de réduire sa concentration à l'arrière et de créer un gradient dynamique de chimiokines. La probabilité de fixation de Cxcl12a sur Cxcr4b est donc plus forte à l'avant qu'à l'arrière et le signal généré permet de définir la direction à prendre. Ce serait alors les cellules elles-mêmes qui réguleraient leur migration. (Aman and Piotrowski, 2010).

La migration collective est aussi régulée par les contacts cellulaires. Ils peuvent maintenir la cohésion cellulaire, permettre aux cellules de communiquer, ou encore médier des interactions transitoires. Après émergence de la partie dorsale du tube neural, les cellules de la crête neurale (CCN) migrent pour atteindre leur site de différenciation. Pendant leur migration, les cellules maintiennent des contacts de différentes intensités. Assez proches, les cellules ont un contact presque constant avec leurs voisines grâce à des lamellipodes et de courts filopodes. Des cellules plus éloignées vont interagir entre elles de manière transitoire via des filopodes qui vont s'étendre et se rétracter. Ce contact cellule-cellule stimule souvent un changement directionnel de la migration cellulaire, influençant la trajectoire des autres cellules (Teddy, 2004). Ce phénomène est appelé locomotion par inhibition de contact (CIL pour « Contact inhibition locomotion ») ; il est décrit comme caractéristique de la migration des CCN. La N-cadhérine est exprimée par les CCN en migration et, est nécessaire aux contacts efficaces cellule-cellule. Les CCN en migration co-expriment également PDGF-A et son récepteur PDGFR- α . Leur inhibition induit une réduction des niveaux de N-cadhérine à la membrane, ce qui provoque une réduction de la dispersion des cellules. Ici, la N-cadhérine joue alors un rôle répulsif et c'est l'altération de l'inhibition de contact qui induit des dysfonctionnements du comportement migratoire. De plus, PDGF-A/PDGFR- α est un chimioattractant qui permet de guider les cellules pendant leur migration (Bahm et al., 2017). Les CCN migrent en affinant progressivement la polarité de leurs protrusions par rapport à la directionnalité de la migration. Lorsque la cellule explore son environnement, les filopodes sont peu polarisés. Petit à petit, la cellule va redéfinir la direction de ses protrusions qui vont devenir productives, permettant à la cellule de migrer (Genuth et al., 2018).

3.3. Migration cellulaire et formation de métastases lors des cancers

Selon la Fondation pour la Recherche Médicale et la Fondation ARC, le cancer est la deuxième cause de décès prématuré dans le monde et la première cause en France, devant les maladies cardiovasculaires. En chiffre, cela se traduit par 18,1 millions de nouveaux cas détectés dans le monde en 2018 avec 9,6 millions de décès selon le Centre international de recherche sur le cancer. Touchant de nombreux organes, le cancer du sein est le plus meurtrier chez les femmes tandis que les hommes sont plutôt touchés par des cancers des voies respiratoires. Selon le tissu touché, le pronostic vital est plus ou moins engagé mais l'apparition de tumeurs secondaires, dites métastases, diminue la probabilité de survie.

3.3.1. *Invasion cellulaire et implication des chimiokines*

Lors du développement tumoral, le cycle cellulaire est dérégulé, provoquant une croissance rapide de cellules qui vont former un groupe cohésif, capable d'interagir avec le tissu environnant et la matrice extracellulaire. La tumeur peut altérer son microenvironnement afin de le rendre permissif à sa croissance et à sa dissémination. Les cellules tumorales d'origine épithéliale expriment la E-cadhérine, et les interactions cellule-cellule sont fortes. Par accumulation de mutations et modifications épigénétiques, les cellules acquièrent un potentiel invasif. L'activité des métalloprotéases augmente, ce qui permet de modifier la matrice extracellulaire et de favoriser la rupture de la membrane basale. Les cellules entament une transition épithélio-mésenchymateuse où il y a perte des interactions cellulaires, remaniement du cytosquelette et acquisition d'une motilité cellulaire. Elles migrent ensuite de manière collective jusqu'aux vaisseaux sanguins, tout en interagissant avec les cellules stromales environnantes et la matrice extracellulaire. L'intravasation permet aux cellules d'entrer dans la circulation sanguine et de migrer jusqu'au site secondaire puis, par extravasation, les cellules sortent du vaisseau. Il y a invasion cellulaire car les cellules migrent dans un nouveau tissu et se multiplient pour former la métastase qui va s'adapter à son nouvel environnement. La tumeur a la capacité de favoriser localement l'angiogenèse, apportant ainsi davantage d'oxygène aux cellules (Jiang et al., 2015).

Les cellules tumorales qui se développent à partir de tissus épithéliaux ont une capacité plus élevée à entrer en TEM. Cela peut être dû à une augmentation de l'expression des gènes qui activent la TEM comme les facteurs de transcription Snail et Twist. En effet, Snail inhibe l'expression de la E-cadhérine et donc indirectement, active la TEM. Au niveau du cancer du sein, il a été montré que l'expression de Snail est inversement corrélée avec le degré de différenciation des tumeurs, qui dépend de l'expression de la E-cadhérine (Blanco et al., 2002). La présence de la E-cadhérine permet de piéger un pool de β -caténines de manière indépendante de l'adhésion. Sa perte entraîne une augmentation de la translocation de β -caténines au noyau, activant la transcription de gènes cibles impliqués dans la division ou la différenciation cellulaire (Gottardi et al., 2001; Stockinger et al., 2001).

Dans le cas du cancer du sein, les cellules tumorales expriment les récepteurs CXCR4 et CCR7 aux chimiokines CXCL12 et CCL21 respectivement. Or, il a été montré que ces deux chimiokines sont fortement exprimées dans les organes où ce type de cancer a tendance à faire des métastases (ganglions lymphatiques, moelle osseuse, poumon et foie). De même, le

carcinome présente un profil métastatique similaire à celui du cancer du sein, et les cellules tumorales expriment les deux récepteurs. Cela montre que les chimiokines ont un rôle crucial dans la détermination de la localisation des métastases en fonction des récepteurs exprimés par les cellules tumorales (Müller et al., 2001). Depuis, cette correspondance entre les récepteurs aux chimiokines et la localisation des métastases dans des organes spécifiques a été démontrée dans de nombreux cancers. En temps normal, l'homéostasie des cytokines régule le trafic cellulaire en dirigeant les cellules à des endroits précis mais les cellules cancéreuses peuvent également en profiter (Zlotnik et al., 2011).

3.3.2. *Angiogenèse et implication des facteurs de croissance*

L'angiogenèse est un processus dynamique durant lequel de nouveaux vaisseaux sont formés autour d'un tissu en formation, c'est un processus indispensable pour apporter les molécules essentielles aux cellules, comme l'oxygène. Lors du cancer, ce processus est mis en jeu à deux reprises : lors du guidage des cellules vers la circulation sanguine, puis pour la formation d'un microenvironnement favorable à la croissance de la métastase. Il ne faut pas seulement considérer la tumeur comme un amas de cellules mutées qui se multiplient, mais plutôt comme un mini-organe où tout un écosystème se met en place. Le microenvironnement comporte plusieurs types cellulaires, dont les cellules tumorales et les cellules stromales, ainsi que la matrice extracellulaire et les facteurs sécrétés. Les macrophages et les neutrophiles sont aussi très importants et car ils sécrètent de nombreuses molécules chimioattractantes dont les cytokines. Le recrutement des cellules vasculaires lors de l'angiogenèse est crucial pour la survie et la croissance de la tumeur (Zuazo-Gaztelu and Casanovas, 2018).

En réponse à l'hypoxie – manque d'apport d'oxygène – les cellules vont activer la réponse inflammatoire et sécréter des cytokines pour recruter les cellules endothéliales. Il y aura activation du facteur de transcription HIF-1 (pour « Hypoxia-inducible factor-1 ») qui induit à son tour l'expression de facteurs pro-angiogéniques. VEGF (pour « Vascular endothelial growth factor ») et son récepteur VEGFR permettent d'attirer les cellules endothéliales vers la tumeur (Yang et al., 2013). Une étude sur des cellules endothéliales en culture a montré que la chimiotaxie par VEGF et l'haptotaxie par les fibres de collagène activent la Rac-GTPase qui est nécessaire à la migration cellulaire en renforçant les adhésions focales (Soga et al., 2001). Le facteur de transcription HIF permet également d'activer la production de PDGF, de la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4, ainsi que des métalloprotéases qui dégradent la

matrice. Celles-ci sont importantes car elles permettent de créer un espace qui accueillera le nouveau vaisseau.

Les péricytes – cellules contractiles qui entourent la membrane abluminale des cellules endothéliales – jouent aussi un rôle important dans l'angiogenèse chez l'adulte. Leur recrutement dépend de la présence de PDGF-B, sécrété par les cellules endothéliales et capté par PDGFR- β présent sur les péricytes (Song et al., 2005). Ils ont la capacité d'influencer la matrice extracellulaire localement en modulant le dépôt de composants comme le collagène ou la fibronectine sur la membrane basale, afin de guider la migration des cellules endothéliales. Des défauts de recrutement des péricytes au niveau de l'endothélium peuvent affecter la formation de nouveaux vaisseaux lors d'évènements d'angiogenèse (Stapor et al., 2014).

3.3.3. *Rôle de la matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire (ECM) est un composant non-cellulaire, sécrété par des cellules de types variés, qui est indispensable au développement des organismes. Elle joue un rôle clé lors de la morphogenèse tissulaire, en servant de support aux cellules et de soutien aux organes. Lors de la migration cellulaire, les interactions cellule-matrice permettent de transduire des signaux de tension mécanique, qui vont participer à la réorganisation du cytosquelette. Elle est également importante pour réguler l'accès des cellules aux composants solubles environnants, comme les cytokines ou les facteurs de croissance, aussi bien en formant un réseau qui favorise les interactions, qu'en isolant des groupes de cellules du reste du tissu, ce qui modifie localement les gradients de molécules (Rozario and DeSimone, 2010).

Cette matrice est composée de deux classes principales de molécules : les protéoglycanes et les protéines fibreuses qui comprennent le collagène, les élastines, les lamines et la fibronectine. Le collagène est l'élément le plus abondant, il s'associe aux élastines et régule, entre autres, l'élasticité tissulaire, mais aussi de nombreux autres procédés. La fibronectine est essentielle à l'attachement des cellules à la matrice et à la migration cellulaire, permettant la formation d'adhésions focales, via les intégrines, et la génération de forces de traction qui font avancer la cellule (Frantz et al., 2010). Les intégrines sont connues pour être les récepteurs principaux de l'ECM mais les syndécans ont aussi été décrits comme intervenant dans la médiation des interactions, ayant plutôt une fonction de corécepteurs (Xian et al., 2010).

La fibronectine est une glycoprotéine composée de deux chaînes reliée par un pont disulfure. Elle est sécrétée sous forme inactive dans l'espace extracellulaire et sa liaison aux intégrines, via le motif RGD, permet son activation par changement conformationnel et son assemblage pour la formation de fibrilles (Wierzbicka P and Schwarzbauer, 2003). Chez la souris, une mutation nulle de la fibronectine a de lourdes conséquences sur le développement des tissus dérivés du mésoderme, avec notamment une absence de notochorde et de somites, ainsi qu'une déformation des vaisseaux et du cœur. Cela montre que la fibronectine est importante pour la migration mésodermale, l'adhésion cellulaire, la prolifération et la différenciation (George et al., 1993). Des mutations du domaine RGD ou de son récepteur intégrine $\alpha 5$ sont aussi responsables d'altérations de la formation du tronc et des vaisseaux, ce qui indique que l'interaction des cellules avec la fibronectine est essentielle au développement (Bouvard et al., 2001; Takahashi et al., 2007).

La vasculogénèse et l'angiogénèse ont lieu dans un environnement riche en fibronectine (Werner and Vance, 1988). Cet élément est essentiel pour la migration des cellules endothéliales mais aussi pour la tubulogénèse, évènement lors duquel le lumen des vaisseaux est formé par réarrangement des jonctions cellulaires et modification de la morphologie cellulaire. En effet, une étude chez le poulet a montré que l'injection d'un anticorps qui empêche l'intégrine $\beta 1$ de lier son ligand, bloque totalement la formation du lumen aortique (Drake et al., 1991). Aussi, une étude *in vitro* a montré que la réduction de matrice extracellulaire, déposée par les fibroblastes, réduit de dix fois les évènements de formation de structures tubulaires vasculaires (Berthod et al., 2006). Lors des cancers, l'expression des gènes de matrice extracellulaire est souvent dérégulée par rapport aux tissus sains environnant. La surexpression de la fibronectine ou de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est retrouvée dans les tumeurs associées à l'angiogénèse et promeut la formation de nouveaux vaisseaux (Astrof et al., 2004). L'ECM joue le rôle de guide lors de l'angiogénèse et de l'invasion cellulaire en capturant les chimioattractants, ce qui favorise la présence de gradients élevés de molécules et attire les cellules. Les cellules cancéreuses ont aussi la capacité de capter les paramètres biophysiques du microenvironnement et de modifier localement ses caractéristiques en sécrétant des métalloprotéases pour dégrader les fibres et disséminer dans le tissu. (Lin et al., 2019; Wang and Hielscher, 2017).

4. L'hématopoïèse et les niches des cellules souches hématopoïétiques

L'hématopoïèse définitive est définie comme la formation de l'ensemble des types cellulaires sanguins et des cellules de l'immunité, à partir de cellules souches hématopoïétiques. Elle est réalisée dans des tissus appelés niches, dont l'architecture et les signaux sont particulièrement importants pour maintenir la réserve de cellules progénitrices, mais aussi pour la différenciation des cellules immatures en cellules spécialisées.

4.1. Niches des cellules souches hématopoïétiques chez les mammifères

4.1.1. *Les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines*

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier en différents types cellulaires, en cellules sanguines dont les érythrocytes et les thrombocytes, ainsi qu'en cellules de l'immunité qui regroupent les cellules des lignées myéloïde et lymphoïde (**Figure I14**). Elles permettent de produire continuellement, tout au long de la vie de l'organisme, l'ensemble du système hématopoïétique grâce à leur caractéristique dite « souche » : elles ont la capacité de s'auto-renouveler, elles génèrent des progéniteurs qui vont proliférer et qui, à leur tour, vont se différencier en cellules spécialisées. Les cellules souches peuvent se retrouver au stade dormant/quiescent, lorsque leur cycle cellulaire est arrêté, ou bien actives dans leur cycle pour se renouveler et éventuellement se différencier. Le potentiel et le nombre exact des progéniteurs intermédiaires entre la CSH et la cellule spécialisée mature n'est pas connu avec certitude mais ils sont classés en fonction des molécules et des gènes régulateurs qu'ils expriment (Giladi et al., 2018). L'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules doit être finement régulé pour maintenir l'homéostasie de l'hématopoïèse. Un taux de différenciation excessif épuise la réserve de cellules souches, tandis qu'un auto-renouvellement trop important peut conduire à des maladies myéloprolifératives ou des leucémies. Les cellules souches long terme, avec un potentiel de différenciation multiple, semblent être assez rares, au profit des progéniteurs court terme qui ont un potentiel plus restreint en termes de nombre de cycles. Néanmoins, la présence de CSH, capables d'une véritable reconstruction du système hématopoïétique à long terme, est essentielle pour la réussite des greffes de moelle osseuse. Les cellules doivent pouvoir coloniser le tissu receveur irradié par auto-renouvellement mais aussi se différencier en l'ensemble des types cellulaires nécessaires au repeuplement immunitaire et au bon fonctionnement de l'organisme.

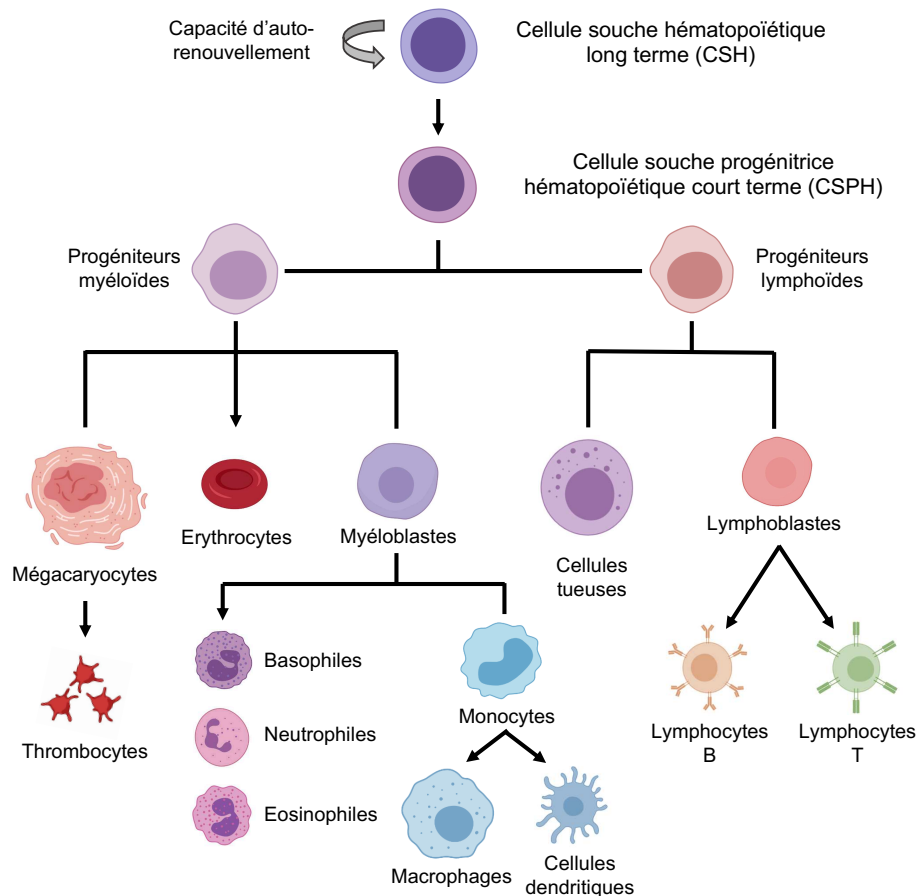


Figure I14 – Différenciation des cellules souches hématopoïétiques chez les mammifères

Les cellules souches hématopoïétiques long terme ont des capacités d'auto-renouvellement afin de maintenir une réserve de cellules multipotentes, mais peuvent aussi réaliser des divisions asymétriques afin de générer des progéniteurs hématopoïétiques court terme. Suite à des différences d'expression de gènes et des signaux perçus, les progéniteurs peuvent entrer dans le programme de différenciation de la lignée myéloïde (thrombocytes, érythrocytes, cellules myéloïdes) ou de la lignée lymphoïde (cellules tueuses ou lymphocytes). Cette différenciation se fait par étapes et fait appel à des progéniteurs de stades intermédiaires.

Figure réalisée à partir de (Cheng et al., 2020)

Les cellules souches hématopoïétiques émergent à partir de l'endothélium hémogénique, dans la région aorte-gonade-mésonephros (AGM), à partir de E10.5 chez l'embryon de souris. L'émergence se fait dans la lumière du vaisseau sanguin, via une transition endothélio-hématopoïétique (TEH), qui conduit à la formation d'un amas de cellules accolé à la paroi lumineuse de l'artère (Müller et al., 1994; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Godin et al., 1999; Godin and Cumano, 2002). Les cellules endothéliales hémogéniques expriment des facteurs de transcriptions spécifiques, notamment *Runx1* et *Gata2*, qui sont connus comme des régulateurs indispensables à l'émergence des CSH. Ces cellules progénitrices, nouvellement produites, migrent dans la circulation sanguine pour aller coloniser dans un premier temps le foie fœtal à partir de E11.0, puis dans un deuxième temps la moelle osseuse (à E15.0), qui constitue la niche définitive de l'hématopoïèse des mammifères. Entretemps, il est possible de

retrouver ces cellules dans des organes intermédiaires dont le thymus à partir de E11.0 et la rate à E12.5 (Dzierzak and Speck, 2008). Les CSH vont se multiplier et se différencier dans ces différents organes mais à l'âge adulte, seule la moelle osseuse constitue le site de l'hématopoïèse.

L'activité proliférative et de différenciation des CSH est régulée de manière intrinsèque par des régulations transcriptionnelles et des voies métaboliques, mais également par des signaux extrinsèques générés par les cellules avoisinantes. Comme vu précédemment, le microenvironnement joue un rôle majeur dans la régulation des processus cellulaires car il abrite des signaux locaux, issus des différents types cellulaires qui composent la niche.

4.1.2. *Le foie fœtal, niche transitoire de l'hématopoïèse*

Suite à la génération des CSH, celles-ci migrent à travers la circulation sanguine jusqu'à leur première niche, le foie fœtal. Ce tissu représente un organe transitoire de l'hématopoïèse, jouant un rôle crucial dans l'expansion des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) (Morrison et al., 1995). En effet, les CSPH connaissent une forte expansion, jusqu'à trente fois leur nombre initial, dans le foie fœtal entre E11.0 et E16.0 avant d'aller se loger dans leur niche définitive (Ema and Nakauchi, 2000). Dans la moelle osseuse, les CSH sont pour la plupart dans un état quiescent (Arai and Suda, 2007). En effet, le cycle cellulaire des CSH a été quantifié dans les différents tissus de l'hématopoïèse et, alors que 100% des CSH sont en prolifération dans le foie fœtal, seulement 5 à 10% le sont dans la moelle osseuse (Pietras et al., 2011). Le passage des CSH dans le foie fœtal est donc d'une importance capitale pour soutenir leur prolifération rapide, qui n'a pas lieu que dans cette niche.

Le foie fœtal est une niche de type vasculaire qui regroupe plusieurs types cellulaires : les cellules hépatiques, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les cellules périvasculaires stromales et les cellules hématopoïétiques de différentes lignées.

Les cellules stromales de ce tissu sont assez hétérogènes dans leur capacité à promouvoir l'hématopoïèse. Certaines ne permettent pas d'assurer l'hématopoïèse *in vitro*, d'autres la soutiennent à court terme, et enfin, un petit nombre est capable de maintenir des niveaux élevés de cellules souches primitives, ayant des capacités de repopulation à long terme (Wineman et al., 1996). Les CSH ont été retrouvées en association proche des cellules stromales Nestine⁺ qui entourent les vaisseaux sanguins. Une délétion de ces cellules entraîne une forte

diminution du nombre de CSPH dans le foie fœtal, suggérant un rôle dans l'induction de la prolifération des CSPH (Khan et al., 2016). Elles présentent une expression des facteurs majeurs qui influencent l'activité de la niche, similaire à celle des cellules Nestine⁺/NG2⁺ retrouvées dans la moelle osseuse (Gao et al., 2018). Les régulations réalisées par les cellules stromales Nestine⁺ seront détaillées dans la partie suivante sur les cellules périvasculaires de la moelle osseuse. Exprimé par les cellules stromales, le facteur de transcription ATF4 (pour « Activating transcription factor 4 ») contribue à l'expansion des CSPH dans le foie fœtal en activant l'expression de cytokines comme l'angiopoïétine Angptl3 (pour « Angiopoietin-like protein 3 »), qui renforce l'activité des CSH dans leur niche (Zhao et al., 2015).

Par rapport à la moelle osseuse, le foie fœtal contient un autre type de cellules mésenchymateuses, appelé cellules stellaires, localisées entre les hépatocytes et les cellules endothéliales des sinusoides veineux, qui sont détectées par leur expression du récepteur neurotrophine (Kisssov et al., 1995). Elles sont retrouvées proches des CSPH, ce qui suggère un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse (Kubota et al., 2007). De plus, elles expriment des molécules d'adhésion, comme la molécule VCAM-1 (pour « Vascular cell adhesion molecule 1 ») qui est importante pour le recrutement des cellules et des éléments de la matrice extracellulaire, ainsi qu'un bon nombre de cytokines comme Cxcl12 et le SCF (Tan et al., 2017). Enfin *in vitro*, elles sont capables de maintenir les CSPH de manière comparable aux cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (Kordes et al., 2013).

Les hépatoblastes, progéniteurs des hépatocytes, ont été également identifiés comme importants pour réguler l'hématopoïèse dans le foie fœtal. Ils expriment le récepteur membranaire aux cytokines DLK, identifié comme facteur de croissance des CSH et impliqué dans le maintien de ces cellules (Zhang and Lodish, 2004). De plus, ils régulent positivement l'ensemble des facteurs essentiels à la maintenance et à l'expansion des CSPH dans leur niche (Chou and Lodish, 2010). Le contact physique des CSPH et des progéniteurs hépatiques est requis pour maintenir la prolifération des cellules à long terme (Chou et al., 2013).

Le foie fœtal et la moelle osseuse possèdent des caractéristiques similaires, notamment au niveau de la niche vasculaire, mais aussi des différences via la présence ou l'absence de certains types cellulaires comme les cellules hépatiques du foie fœtal ou les cellules ostéoblastiques de la moelle osseuse. Cela peut influencer les régulations des CSH plutôt vers un état prolifératif, ou quiescent, ou encore de différenciation.

4.1.3. Architecture de la moelle osseuse

Le concept de niche de cellules souches est apparu pour la première fois en 1978 lorsque Raymond Schofield décrit que le fonctionnement des cellules souches dépend de leurs interactions avec des sites anatomiques spécifiques. Il observa qu'après une transplantation, les CSH peuvent être retrouvées dans la rate mais que leur arrivée dans la moelle osseuse est nécessaire pour la réussite et la prise de la greffe. Il fit l'hypothèse que ce tissu permet aux cellules souches de s'auto-renouveler, ce qui introduisit l'importance du microenvironnement pour réguler le devenir cellulaire (Rashidi and Lo Celso, 2014).

La moelle osseuse est un tissu complexe composé de cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Elles sont interconnectées par un réseau vasculaire et innervées dans des cavités à l'intérieur des os longs, comme le fémur et des os axiaux, ainsi que le sternum (Pinho and Frenette, 2019). Les types cellulaires qui composent la niche sont variés et regroupent les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes et les cellules stromales. Ils sont nécessaires au maintien de l'architecture du tissu et à la génération des signaux de régulation. La vascularisation par les artérioles et les sinusoides veineux est également importante pour apporter des signaux longue portée et des cellules spécialisées, mais aussi des signaux locaux, générés par les cellules vasculaires ou périvasculaires. Il est possible de subdiviser la moelle osseuse en deux niches : la niche ostéoblastique et la niche vasculaire, bien que le tout constitue un ensemble (**Figure I15**). Les cellules souches sont soit retrouvées en association avec l'endosteum des os, soit en contact avec les cellules endothéliales et/ou les cellules périvasculaires, ce qui implique des recrutements spécifiques et des régulations propres au tissu adjacent.

La niche ostéoblastique correspond aux cellules qui composent l'endostéum osseux, fine couche de tissu tapissant la cavité médullaire des os longs. Ce tissu regroupe de nombreuses CSPH à des stades de différenciation plus ou moins avancés (Gong, 1978). Les ostéoblastes favorisent le maintien des stades progéniteurs immatures, grâce à des substances qu'ils sécrètent. Cela a été montré par des expériences de dilution du milieu extracellulaire en culture *in vitro*. Ces cellules sont nécessaires à la survie des progéniteurs hématopoïétiques et à leur renouvellement (Taichman et al., 1996). Il a d'ailleurs été montré que l'ablation du lignage ostéoblastique chez la souris engendre une réduction du nombre de progéniteurs érythroïdes, lymphoïdes et myéloïdes, ce qui montre que les interactions sont importantes pour l'expansion des progéniteurs de tous les lignages hématopoïétiques (Visnjic et al., 2004).

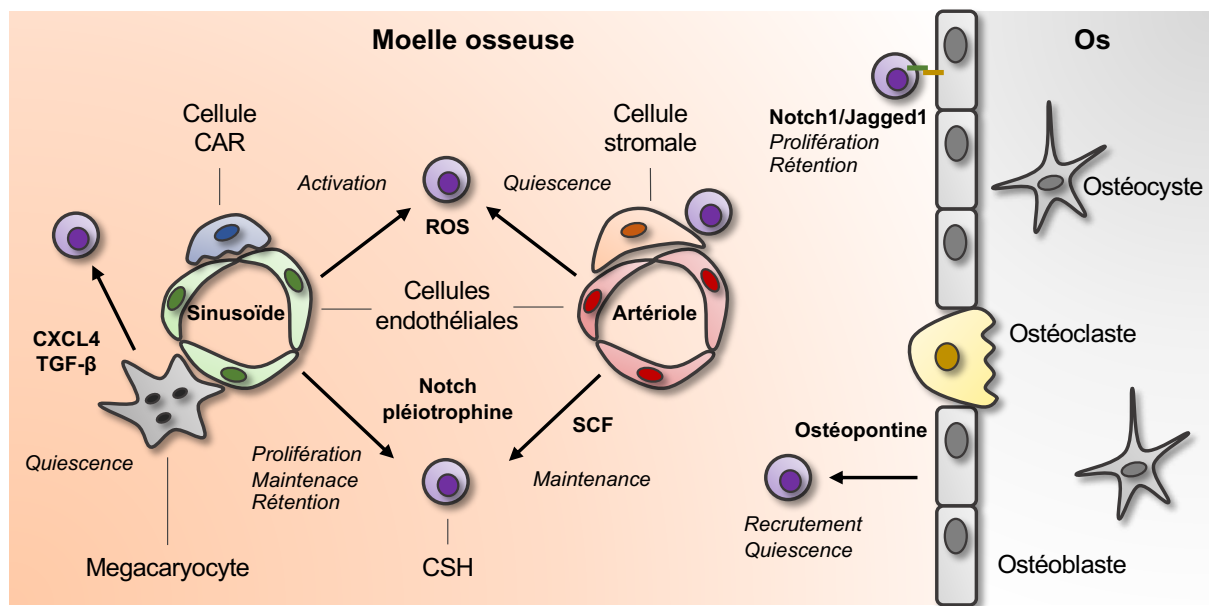


Figure I15 – Niches ostéoblastique et vasculaire de la moelle osseuse

Au niveau de la niche ostéoblastique, les ostéoblastes sécrètent l'ostéopontine qui est impliquée dans le recrutement des CSH au niveau de l'endosteum de la paroi de l'os et dans le maintien de leur état quiescent. L'interaction de Notch avec son ligand Jagged-1 active la voie, impliquée dans la prolifération des progéniteurs et la rétention de leur stade immature. Au niveau de la niche vasculaire, les cellules endothéliales des artérioles sécrètent le facteur de croissance des cellules souches (SCF), impliqué dans la maintenance du pool de CSH. La cohésion du vaisseau permet de diminuer la concentration d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le microenvironnement extracellulaire, ce qui favorise le maintien du stade quiescent. Les cellules endothéliales des sinusoides veineux sont plus permissives et la concentration en ROS dans l'environnement est plus élevée, ce qui active les CSH. Les mégacaryocytes sont associés avec les sinusoides et sécrètent CXCL4 et TGF-β, impliqués dans le maintien de la quiescence cellulaire. Sans distinction de type de vaisseau, les cellules endothéliales sécrètent la pléiotrophine et présentent le ligand Jagged-1 de Notch. Ces éléments sont impliqués dans la prolifération, la maintenance du pool de progéniteurs et la rétention de leur stade immature.
Figure réalisée à partir de (Pinho and Frenette, 2019)

Les ostéoblastes synthétisent l'ostéopontine, protéine d'adhérence non collagénique de la matrice extracellulaire endostéale de l'os, qui permet de recruter les CSH qui vont migrer au travers de la moelle osseuse jusqu'à cette région. Cette protéine régule négativement la prolifération des CSH car des souris déficientes présentent davantage de progéniteurs dans leur moelle osseuse (Nilsson et al., 2005). De plus, l'hormone parathyroïde régule positivement la prolifération des cellules ostéoblastiques, ce qui est corrélé avec l'expansion des CSH. Cette interaction est médiée par la voie de signalisation Notch, en particulier par le ligand Jagged-1. L'activation de Notch joue un rôle important dans la régulation du devenir des CSH, et son inactivation réduit la croissance des progéniteurs (Calvi et al., 2003).

La niche vasculaire est composée des artérioles où les cellules endothéliales sont jointives, et des sinusoides veineux où la paroi endothéliale est irrégulière et la cohésion des cellules est assurée par le tissu environnant. Les cellules endothéliales des différents vaisseaux

n'ont pas la même contribution dans l'homéostasie de la niche hématopoïétique. Il a été proposé que la différence de perméabilité entre les vaisseaux régule la prolifération des CSPH : les artérioles sont moins permissives, ce qui crée un environnement pauvre en espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « Reactive oxygen species »), favorisant la quiescence des cellules souches, tandis que les sinusoides sont plus perméables, ce qui active les cellules souches, de par une plus forte concentration de ROS dans l'espace extracellulaire (Itkin et al., 2016).

Les cellules endothéliales des artérioles sécrètent le facteur de croissance des cellules souches, appelé SCF (pour « Stem cell factor »), qui se lie à son récepteur c-Kit, présent à la surface des CSPH. Il agit en tant que cytokine sur le recrutement, la prolifération et la maintenance des cellules souches progénitrices des différentes lignées. De façon intéressante, la sécrétion de SCF est spécifique des cellules endothéliales artériolaires car la délétion du gène *Scf*, spécifiquement dans ces cellules, a un impact sur le nombre de CSPH fonctionnelles, ce qui n'est pas retrouvé lorsque ce gène est délété dans les cellules endothéliales sinusoidales (Xu et al., 2018).

Les cellules endothéliales, sans distinction du type de vaisseau, sécrètent également la pléiotrophine qui est un facteur de croissance important pour la maintenance des CSPH. Il a été montré que selon le type cellulaire qui sécrète le facteur, l'effet sur les CSPH est différent, allant de la maintenance du pool de cellules souches pendant l'homéostasie à la régénération du nombre de cellules après irradiation (Himburg et al., 2018). Enfin, l'expression du ligand Jagged-1, impliqué dans la voie Notch, par les cellules endothéliales est nécessaire pour l'activité d'auto-renouvellement des CSH et la régénération des progéniteurs. En effet, son inhibition n'a pas d'impact sur le système vasculaire ou sur le développement des cellules mésenchymateuses mais induit des défauts d'hématopoïèse et un épuisement du pool de cellules souches (Poulos et al., 2013).

Les sinusoides de la moelle osseuse sont intimement associés avec les mégacaryocytes (précurseurs des plaquettes), qui s'étendent autour des vaisseaux grâce à leurs protrusions. Il a été montré qu'environ 20% des CSPH sont localisées de manière adjacente à ces cellules chez la souris, et que leur ablation provoque une augmentation du nombre de CSPH. Leur rôle est donc de restreindre l'expansion des cellules souches et de maintenir l'état quiescent en régulant négativement leur prolifération par la production de CXCL4 et TGF- β (Calvi and Link, 2015). Les cellules avoisinantes des cellules endothéliales sont donc aussi des acteurs impliqués dans la régulation du devenir des progéniteurs hématopoïétiques.

Les cellules périvasculaires jouent aussi un rôle primordial dans l'homéostasie de la niche. Elles sont hétérogènes car elles suivent des voies de différenciation distinctes et expriment des facteurs qui vont influencer l'hématopoïèse différemment.

4.1.4. *Les cellules périvasculaires stromales réticulaires*

Bien que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) soient assez rares dans la moelle osseuse (de 0,001% à 0,01%), elles constituent un composant crucial du stroma de la niche. Elles ont aussi un potentiel d'auto-renouvellement et des capacités multipotentes à l'origine des chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes et des cellules stromales réticulaires. Elles sont retrouvées dans la moelle osseuse à différents stades de différenciation avec plus ou moins de potentiel, appelées alors cellules souches et progénitrices mésenchymateuses (CSPM). Leur étude est importante afin de compléter la cartographie des régulations de l'hématopoïèse retrouvées dans la niche, en plus des signaux générés par les cellules ostéoblastiques et les cellules endothéliales (Pittenger et al., 2019).

Les cellules périvasculaires de type stromal jouent un rôle important dans la régulation des CSPH. Elles expriment fortement la plupart des facteurs impliqués dans la maintenance des cellules souches hématopoïétiques, dont CXCL12, le facteur des cellules souches SCF, l'interleukine-7, la pléiotrophine. Il existe deux types de cellules stromales réticulaires, différenciées par leur degré d'expression de la Nestine, protéine impliquée dans la croissance des axones, et par l'expression d'autres molécules. 1) Les cellules stromales réticulaires, associées aux artérioles, expriment fortement la Nestine. Elles sont rares et sont retrouvées en association avec les CSH et les fibres nerveuses adrénergiques. 2) Les cellules réticulaires CAR (pour « CXCL12 abundant reticular ») sont plutôt associées aux sinusoides et en plus grand nombre. Ce sont des progéniteurs de la lignée ostéoblastique et des adipocytes qui expriment le récepteur des Leptines (LEPR), régulateur de ces lignées (**Figure I16**). La différence de distribution spatiale des cellules et des molécules qu'elles expriment suggère des rôles distincts des deux types cellulaires qui vont coopérer pour réguler la niche hématopoïétique (Méndez-Ferrer et al., 2010; Omatsu et al., 2010; Xu et al., 2018).

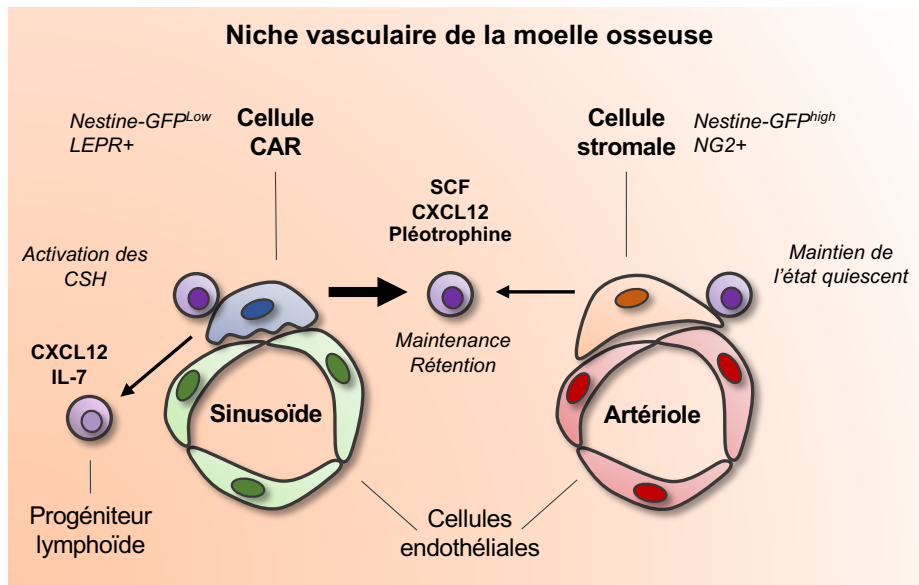


Figure I16 – Cellules périvasculaires stromales des sinusoïdes et des artérioles

Les cellules périvasculaires de type stromal sont importantes pour la régulation de l'homéostasie de la niche. Les cellules stromales Nestine⁺ sont associées avec les artérioles et participent au maintien de l'état quiescent des CSH, tandis que les cellules stromales CAR, « récepteur des leptines positives » (LEPR⁺), sont associées avec les sinusoïdes et activent les CSH. Les cellules stromales sécrètent le facteur des cellules souches SCF, la chimiokine CXCL12 et la pléiotrophine qui jouent un rôle dans le maintien et la rétention des CSH. Il a été montré que la contribution des cellules CAR est plus importante que celle des cellules Nestine⁺ dans la sécrétion des facteurs, mais cela est dû soit à une production plus importante de facteur ou soit à un déséquilibre de nombre (80% contre 20% respectivement). Aussi, les cellules stromales CAR expriment l'interleukine-7, qui est importante pour la régulation des progéniteurs lymphoïdes.

Figure réalisée à partir de (Pinho and Frenette, 2019)

Dans la moelle osseuse, environ 80% des cellules stromales sont de type CAR, et 20% de type Nestine⁺ adjacentes aux artérioles (Pinho and Frenette, 2019). La déplétion des cellules Nestine⁺ entraîne l'activation du cycle cellulaire des CSH, et l'activation forcée des CSH provoque leur relocalisation vers les cellules CAR des sinusoïdes. Cela montre que les cellules stromales Nestine⁺ des niches artériolaires sont indispensables pour maintenir l'état quiescent des CSH (Kunisaki et al., 2013). Les deux types de cellules stromales réticulaires sécrètent la chimiokine CXCL12 et le SCF. Au niveau des cellules CAR, la suppression de l'expression de SCF cause une diminution importante du nombre de CSH et la suppression de l'expression de CXCL12 mobilise les CSH vers la circulation sanguine mais n'a pas beaucoup d'effet sur le nombre de CSH présents dans la moelle osseuse. Cependant, la suppression de l'expression de ces molécules par les cellules stromales Nestine⁺ n'a pas d'effet significatif sur le nombre de CSH dans la moelle osseuse. Ces études révèlent les contributions distinctes des cytokines en fonction du type cellulaire périvasculaire qui les sécrète pour le maintien des CSH (Ding et al., 2012; Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013; Asada et al., 2017).

Néanmoins, il est possible que cette différence de contribution soit le reflet d'un déséquilibre de nombre de l'un des types de cellules stromales avec un ratio d'environ 1:5 (cellules Nestine⁺ : cellules CAR). Aussi, ce déséquilibre phénotypique peut résulter de la contribution d'autres types cellulaires. En effet, les cellules endothéliales sont capables de produire le SCF, et dans une moindre mesure CXCL12. Il a d'ailleurs été montré que les cellules CAR sont capables de sécréter la pléiotrophine. Ce facteur est impliqué dans la maintenance des CSPH lorsqu'il est sécrété exclusivement par les cellules stromales mais il est impliqué dans la régénération des CSPH lorsqu'il est exprimé en plus par les cellules endothéliales, après une irradiation (Himburg et al., 2018).

D'autres types de cellules stromales ont été découverts dans la moelle osseuse des souris, sur la base de l'expression d'autres molécules, comme PDGFR- α et l'antigène des cellules souches SCA1 (pour « Stem cell antigen 1 »), et sur des analyses phénotypiques. Les contributions de ces sous-types et leurs relations avec les deux autres populations de cellules stromales ne sont pas encore bien connues (Morikawa et al., 2009).

Chez le poisson, l'homologue fonctionnel de la moelle osseuse des mammifères se situe dans le tissu rénal, qui est la niche de l'hématopoïèse définitive chez l'adulte. Néanmoins, la composition des tissus est bien différente, ce qui rend difficile d'éventuelles transpositions. Le foie fœtal des mammifères est mis en parallèle du tissu hématopoïétique caudal (THC) du poisson zèbre, puisque ces tissus constituent tous les deux des niches transitoires de l'hématopoïèse, bien que leur composition ne soit pas exactement la même. Le THC est particulièrement accessible *in vivo*, ce qui le rend intéressant pour l'étude des interactions cellulaires et des voies de régulation.

4.2. Le tissu hématopoïétique caudal chez le poisson zèbre

4.2.1. L'hématopoïèse du poisson zèbre

Chez tous les vertébrés, l'hématopoïèse définitive, qui met en jeu les CSH, est précédée d'une hématopoïèse primitive, indépendante de l'émergence de ces cellules. L'hématopoïèse primitive fournit, aux stades précoces, des macrophages qui éliminent les cellules mortes au cours de la maturation des organes, des érythrocytes, et éventuellement des neutrophiles chez le Danio, ou des mégacaryocytes chez les mammifères. Chez les vertébrés en général, elle est directement issue du mésoderme latéral/ventral, le plus souvent au niveau du sac vitellin. Dans le cas du poisson zèbre, des progéniteurs myéloïdes émergent du mésoderme

latéral le plus antérieur, juste en avant du champ cardiaque, et de là, migrent dans le sac vitellin tout proche, où ils se différencient en macrophages et en précurseurs de neutrophiles vers 20-24 hpf (Herbomel et al., 1999, 2001; Le Guyader et al., 2008). Les érythrocytes primitifs sont produits à partir d'un mésoderme également d'origine latérale mais beaucoup plus postérieur, le long de l'axe de l'embryon, avant le démarrage de la circulation sanguine à 25 hpf (Davidson and Zon, 2004).

Chez le poisson zèbre, les CSPH émergent, via une transition endothélio-hématopoïétique, à partir de l'endothélium hémogénique du plancher ventral de l'aorte dorsale, entre 32 et 60 hpf (Bertrand et al., 2010; Kissa and Herbomel, 2010; Lancino et al., 2018). Aidés des macrophages primitifs qui dégradent la matrice extracellulaire, les CSPH passent dans la circulation sanguine pour migrer vers les organes de l'hématopoïèse (Kissa et al., 2008; Travnickova et al., 2015). En effet, contrairement à la souris où l'émergence se fait dans la lumière du vaisseau, chez le poisson, l'émergence se fait à l'extérieur du vaisseau dans l'espace sub-aortique, ce qui nécessite ensuite une étape d'intravasation dans la veine axiale, sous-jacente à l'aorte.

Après leur émergence, les CSH migrent et se logent dans le tissu hématopoïétique caudal (THC) qui est la première niche de l'hématopoïèse définitive chez le poisson, comparable en cela au foie fœtal des mammifères (**Figure I17**). Dans ce tissu, les premières CSPH (CD41:GFP⁺) issues de l'aorte sont détectées à partir de 2 jpf et leur expansion est rapide avec un pic à 3-4 jpf. Elles sont ensuite retrouvées à partir de 2.5 jpf dans le rudiment du thymus, puis à partir de 4 jpf dans le rein primitif, le pronéphros, autour de l'unique glomérule rénal (Murayama et al., 2006; Kissa et al., 2008). Dans le même temps, les CSPH donnent naissance aux progéniteurs des différents lignages hématopoïétiques. Les premières cellules myéloïdes définitives apparaissent à partir de 2.5 jpf pour les neutrophiles et 3.5 jpf pour les macrophages (A-L Touret, mémoire de stage M2), les premiers érythrocytes circulants apparaissent vers 5 jpf, les prothrombocytes à 3 jpf, et les premiers précurseurs lymphoïdes dans le thymus à partir de 2.5-3 jpf (Kissa et al., 2008; Jin et al., 2009).

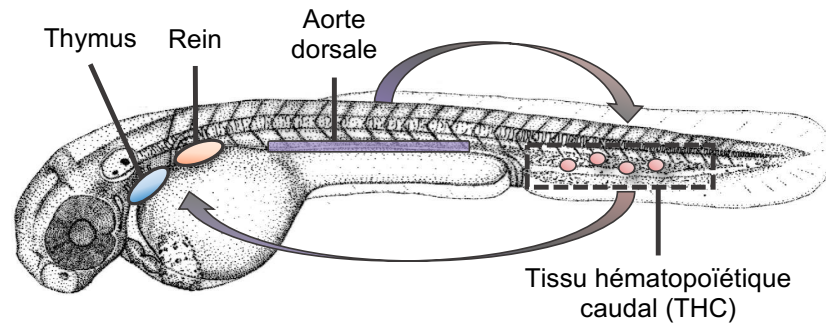


Figure I17 – Migration des CSPH dans les différentes niches hématopoïétiques

Chez le poisson zèbre, les CSPH émergent à partir du plancher hémogénique de l'aorte dorsale, entre 32 et 60 hpf. Les cellules entrent dans la circulation sanguine et migrent à partir de 48 hpf dans leur première niche, le tissu hématopoïétique caudal (THC), où elles se multiplient et se différencient. Après leur passage dans le THC, les progéniteurs peuvent de nouveau entrer dans la circulation sanguine pour aller coloniser le thymus à 3 jpf, organe transitoire de l'hématopoïèse ou le rein à 4 jpf, niche définitive de l'hématopoïèse.

Figure réalisée à partir de (Murayama et al., 2006; Kissa et al., 2008)

4.2.2. Le développement du tissu hématopoïétique caudal

Le tissu hématopoïétique caudal (THC), première niche d'accueil des CSPH définitives, est une niche vasculaire de l'hématopoïèse. Les principaux types cellulaires retrouvés sont les cellules endothéliales qui composent les vaisseaux, les cellules stromales et les cellules hématopoïétiques progénitrices ou différenciées, issues des deux vagues de l'hématopoïèse (Murayama et al., 2006, 2015; Le Guyader et al., 2008).

Le THC est localisé dans la queue de l'embryon. Tout d'abord à 25 hpf, lorsque la circulation sanguine se met en place avec les érythrocytes primitifs, le système veineux caudal est uniquement composé d'un canal simple (veine primitive ou primordiale), en dessous de l'artère (Murayama et al., 2006). La prolifération des cellules endothéliales n'est pas essentielle à la formation du vaisseau primaire. Néanmoins, il se transforme ensuite en un plexus veineux, ce qui nécessite la prolifération des cellules endothéliales. En effet, lorsque le cycle cellulaire est inhibé, empêchant la division cellulaire, le plexus veineux caudal résultant est plus fin et sa structure n'est pas bien définie (Fukuhara et al., 2014). La migration des cellules endothéliales est aussi nécessaire à la formation du plexus veineux caudal (Wakayama et al., 2015).

A 35 hpf, la niche est complète, avec d'une part le plexus veineux, et d'autre part, entre les branches du plexus, le mésenchyme de la niche hématopoïétique, constitué des cellules stromales et d'une abondante matrice extracellulaire (Murayama et al., 2006), (**Figure I18**). Le plexus subit ensuite de nouveaux remaniements morphologiques, avec notamment un

affinement et une redéfinition des vaisseaux sanguins après 35 hpf, où les cellules stromales jouent un rôle important. Elles présentent un noyau assez large et de longs filopodes, qui les connectent entre elles et avec les cellules endothéliales. Elles ont un aspect fibroblastique et forment un réseau – c’est pourquoi nous les appelons cellules stromales « réticulaires », ou CSR. A partir de 48 hpf, suite à leur maturation, certaines de ces cellules stromales alignent leur corps cellulaire en étroite apposition avec les cellules endothéliales (Murayama et al., 2015) – nous les appelons alors cellules stromales « périvasculaires », ou CSP. L’association de ces cellules stromales avec les cellules endothéliales est comparable à celle décrite chez les mammifères. Cela suggère que les cellules stromales ont au moins deux fonctions : une fonction de maintien de l’architecture du plexus vasculaire et une fonction de régulation de l’hématopoïèse.

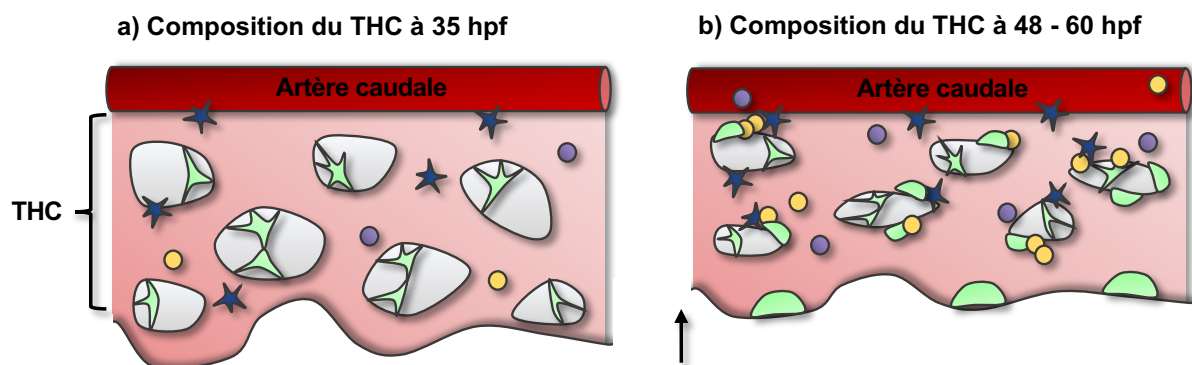


Figure I18 – Composition du tissu hématopoïétique caudal

Le tissu hématopoïétique caudal (THC) est composé de trois types cellulaires principaux : les cellules endothéliales qui composent le plexus veineux, les cellules mésenchymateuses ou stromales réticulaires qui composent un réseau et les cellules hématopoïétiques plus ou moins matures et de différentes lignées. **a)** A 35 hpf, le THC est formé et les cellules mésenchymateuses maintiennent le plexus par contact entre cellules mais aussi par leurs interactions avec les cellules endothéliales. Des macrophages résidents, issus de la vague primitive de l’hématopoïèse, sont présents. **b)** A partir de 48 hpf, les cellules stromales réticulaires mûrissent et une autre morphologie cellulaire apparaît en apposition aux cellules endothéliales du plexus veineux. Les CSH arrivent dans la niche et vont se multiplier et se différencier. Le THC est légèrement plus fin et compact par rapport à 35 hpf et contient davantage de cellules hématopoïétiques.

Figure réalisée à partir de (Fukuhara et al., 2014; Murayama et al., 2006, 2015)

4.2.3. Régulation de l’hématopoïèse dans le tissu hématopoïétique caudal

Comme dans la moelle osseuse et le foie fœtal, de nombreuses régulations de l’hématopoïèse ont été mises en évidence dans le THC du poisson. L’ensemble des types cellulaires de la niche ont un rôle à jouer, que ce soit les cellules endothéliales, les cellules stromales ou encore les cellules hématopoïétiques elles-mêmes. En effet, il a été montré que les

cellules du THC en culture sont capables de promouvoir l'hématopoïèse en permettant la génération de l'ensemble des types hématopoïétiques (Wolf et al., 2017).

Les cellules endothéliales expriment un facteur de transcription, Klf6a (pour « Krüppel-like factor 6a »), impliqué dans le remodelage vasculaire en cas de blessure. Les embryons déficients pour Klf6a présentent un plexus caudal désorganisé et plus fin, avec un volume global diminué, ce qui suggère des problèmes d'intégrité vasculaire. De plus, le nombre de CSPH dès 60 hpf et ce, jusqu'à 4 jpf est fortement réduit, avec mise en évidence d'une altération de la migration et du logement des cellules dans leur niche. Cela indique que Klf6b est indispensable au développement des CSPH dans le THC (Xue et al., 2015). Klf6a régule directement l'expression de la chimiokine Ccl25b, qui favorise la migration directionnelle des CSPH dans leur niche (**Figure I19**). La perte de fonction de cette chimiokine entraîne une diminution du nombre de progéniteurs dans la niche, qui est dû à une réduction de la capacité des CSPH à se loger dans leur niche. Cette régulation est conservée chez la souris où l'activation de Ccl21, orthologue murin de *ccl25b*, augmente le développement des CSPH *in vitro* (Xue et al., 2017). Les cellules endothéliales du THC expriment également le facteur de transcription Tfec, important pour moduler l'expression de cytokines, impliquées dans l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques dans leur niche (Mahony et al., 2016).

Lors de l'arrivée des CSPH, la niche vasculaire se remodèle pour accueillir ces cellules (**Figure I19**). Les cellules endothéliales expriment le récepteur Cxcr1 de la chimiokine Cxcl8 qui est un régulateur positif de la domiciliation des cellules progénitrices hématopoïétiques (Blaser et al., 2017). Lorsque la CSPH entre en contact avec la cellule endothéliale, cela déclenche un remaniement morphologique où l'endothélium va venir entourer une unique cellule progénitrice, créant une poche. Ce comportement dynamique de l'endothélium, qui répond à l'arrivée de la CSPH endogène, est conservé chez la souris. Les cellules endothéliales maintiennent une proximité étroite avec la CSPH, qui va résider plus longtemps dans la niche. Le processus proposé est celui d'une extravasation active de la CSPH par l'endothélium, de sorte que la CSPH va ainsi se retrouver dans l'espace stromal du THC, au lieu de continuer à circuler (Tamplin et al., 2015).

De façon intéressante, le recrutement des CSPH est également facilité par les macrophages primitifs résidents du THC (**Figure I19**). Il a été montré que ces macrophages, positifs pour VCAM-1, patrouillent au niveau de la surface intérieure du plexus et interagissent avec les CSPH grâce à l'intégrine $\alpha 4$ (Itga4) présente sur les progéniteurs. Les macrophages

sont présents dans les capillaires veineux, plutôt dans la partie dorsale du THC, et attrapent les CSPH lorsqu'elles passent dans la circulation sanguine. La mutation du gène *itga4* induit une réduction du temps de rétention des CSPH et une diminution du nombre de progéniteurs hématopoïétiques dans la niche. Ce phénotype est aussi retrouvé lors de la perte de fonction de VCAM-1 ou bien lorsque l'ensemble des macrophages est déplété. Les macrophages auraient donc un rôle dans le ralentissement des CSPH et dans les remaniements des cellules endothéliales, afin de favoriser la rétention des CSPH dans la niche. Ces macrophages accompagnent aussi les CSPH vers la zone dorsale du stroma, juste sous l'artère caudale, qui pourrait être le lieu de résidence final des CSPH (Li et al., 2018).

En plus d'être en contact avec les cellules endothéliales et souvent avec un macrophage, il y a également le recrutement sous-jacent d'une cellule stromale (*sdf1:DsRed⁺*) (**Figure I19**). A l'intérieur de la poche, la CSPH se divise de façon orientée, une cellule restant proche de la cellule stromale, tandis que l'autre n'est plus en contact avec celle-ci, ce qui suggère que les cellules stromales (*sdf1:DsRed⁺*) sont capable d'orienter la division des CSH. Les cellules filles produites peuvent soit rester toutes les deux dans la poche, ou soit l'une retourne dans la circulation sanguine tandis que l'autre reste dans la poche, proche de la cellule stromale. Cela suggère que la cellule stromale est capable retenir la CSPH et qu'elle est probablement importante pour réguler le devenir du progéniteur hématopoïétique (Tamplin et al., 2015).

Récemment, une cartographie 3D a pu mettre en évidence le profil transcriptomique des cellules composant le THC à différents stades. A 55 hpf, l'ensemble des types cellulaires déjà connus du THC sont retrouvés, avec une prédominance des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules endothéliales en prolifération. Pendant la multiplication et la différenciation des progéniteurs, la voie JAK/STAT est active. Elle est connue pour répondre aux signaux extérieurs comme les cytokines ou les interférons. Les intégrines sont également exprimées, essentielles pour médier les interactions cellulaires. Une carte des ligands et de leurs récepteurs a été établie pour le THC, permettant d'en savoir davantage sur les interactions et voies de signalisation mises en jeu. Elle regroupe aussi bien les interactions de même types cellulaires que les interactions des cellules endothéliales avec les CSPH. Aussi, tandis que les CSPH sont en phase de prolifération G2/M, les cellules engagées dans les voies de différenciation myéloïde et lymphoïde prolifèrent peu (Xue et al., 2019).

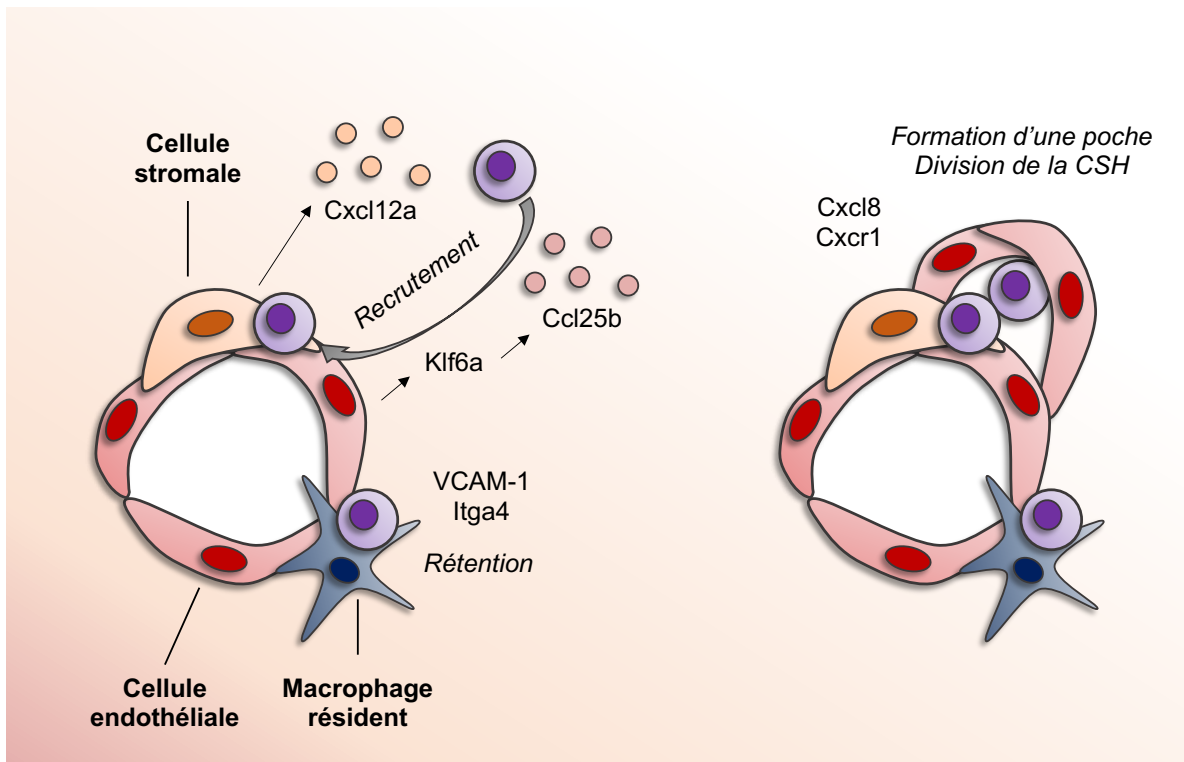


Figure I19 – Régulation du devenir des CSH dans le tissu hématopoïétique caudal

Les cellules endothéliales expriment *klf6a*, régulateur de l'expression de la chimiokine *Ccl25b* et les cellules stromales réticulaires sécrètent la chimiokine *Cxcl12a*. Toutes deux sont impliquées dans le recrutement des CSPH afin de les attirer dans la niche. Les macrophages résidents VCAM-1+ ont la capacité de se lier à l'intégrine $\alpha 4$ des CSPH afin de les retenir vers les cellules endothéliales. Suite à l'arrivée de la CSPH, les cellules endothéliales vont se remanier de manière à former une poche où la CSPH va se diviser. Les deux cellules filles peuvent rester dans la poche ou bien l'une s'en va et la plus proche de la cellule stromale va rester.

Figure réalisée à partir de (Tamplin et al., 2015; Xue et al., 2015, 2017; Li et al., 2018)

Le maintien de l'intégrité de la niche est crucial pour l'arrivée, la prolifération et la différenciation des progéniteurs. En plus des signaux générés par les cellules qui composent les niches vasculaires, les cellules stromales sont nécessaires pour une bonne architecture et structure de la niche. Lorsque ces cellules sont non fonctionnelles, le THC est rétréci et l'hématopoïèse définitive est affectée, avec une réduction de l'ensemble des cellules hématopoïétiques, allant des progéniteurs aux cellules différenciées (Murayama et al., 2015).

4.2.4. Origine des cellules stromales

Les cellules progénitrices des cellules mésenchymateuses du THC proviennent de la partie ventrale des somites. Ces cellules expriment initialement, comme toutes les cellules du somite, le rapporteur TCF de la voie Wnt activée, ce qui a permis de les suivre *in vivo* en temps réel, et de les identifier comme progénitrices des cellules fibroblastiques réticulaires du THC.

Les cellules de la partie ventrale des somites vont progressivement se délimiter du reste du somite lors de sa maturation par la formation d'amas cellulaires distincts. A partir de 21 hpf, elles sont actives et présentent la formation de blebs, qui se transforment en protrusions plus stables vers 22 hpf. Une première cellule meneuse commence à émerger à partir de 23 hpf, qui est suivie par l'émergence d'autres cellules (**Figure I20**). Ces cellules émergent de manière semi-collective en chaînettes, les unes à la suite des autres, et présentent des contacts cellulaires assez stables. Cet évènement est similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse, observée lors de l'émergence des cellules de la crête neurale. Néanmoins, il a été montré que les cellules de la crête neurale ne contribuent pas à la formation du THC, mis à part des cellules pigmentaires qui ne semblent pas jouer de rôle dans l'hématopoïèse (Murayama et al., 2015). Lors de la migration des progéniteurs des cellules stromales, les cycles cellulaires sont actifs car beaucoup de mitoses sont observées. Dans le même temps, les cellules endothéliales, qui contribuent au remaniement du THC, migrent également en direction ventrale. Les deux types de progéniteurs interagissent physiquement. Il est possible que ces interactions soient nécessaires au guidage des cellules lors de leur migration par l'intermédiaire de molécules d'adhésion. A 35 hpf, les progéniteurs des cellules stromales sont retrouvés en contact avec les cellules endothéliales, grâce à leurs filopodes et à 48 hpf des cellules stromales posées le long des cellules endothéliales du plexus veineux sont retrouvées, comme décrit précédemment (Murayama et al., 2015).

La carte 3D transcriptomique des cellules du THC a mis en évidence les types de gènes exprimés aux différents stades de migration ou maturation cellulaire. A 28 hpf, lors de la migration des cellules, les gènes impliqués dans la division cellulaire sont mis en évidence avec en plus la voie Notch, impliquée dans le maintien de l'état progéniteur des cellules. A 36 hpf, lors de la maturation de la niche, ce sont plutôt les molécules d'adhésion qui sont exprimées. Ces données suggèrent qu'elles doivent avoir un rôle important dans la transition cellulaire, de l'état immature à l'état différencié et/ou dans la transition architecturale de la niche pour accueillir les futurs CSPH (Xue et al., 2019). Néanmoins, les voies de signalisation et les molécules qui participent au déclenchement de l'émergence et dirigent la migration ne sont pas connues précisément. Aussi, les molécules d'adhésion impliquées dans la migration cellulaire et dans la structuration de la niche n'ont pas été identifiées dans ce processus. Enfin, les régulations impliquées dans la maturation des cellules et dans la détermination des différents lignages cellulaires restent à être découvertes.

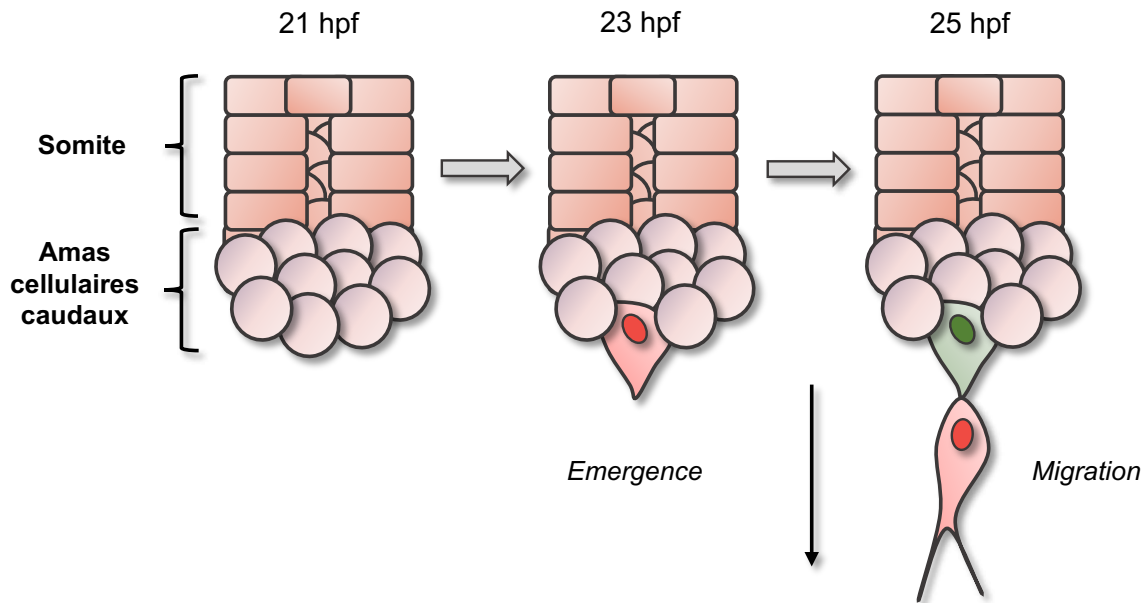


Figure I20 – Emergence et migration des progéniteurs des cellules stromales

Les progéniteurs des cellules stromales du THC émergent à partir de la partie ventrale des somites caudaux. Des amas cellulaires se forment progressivement au niveau de la partie ventrale du somite lors de sa maturation. A partir de 23 hpf, une première cellule leadeuse émerge et sera suivie par l'émergence d'autres cellules de façon semi-collective en chaînette. Les cellules migrent les unes à la suite des autres en contact étroit via des interactions physiques, mettant en jeux des molécules d'adhésion.

Figure réalisée à partir de (Murayama et al., 2015)

Les cellules mésenchymateuses en migration peuvent soit rester dans la niche hématopoïétique, soit continuer leur migration jusqu'à la nageoire ventrale de la queue, pour devenir des cellules mésenchymateuses de la nageoire (CMN), (**Figure I21**). Les cellules stromales du THC et les CMN ont donc la même origine somitique, mais il est possible qu'elles réagissent différemment à un gradient de morphogène, capté selon le profil d'expression des récepteurs cellulaires, qui attire les cellules ventralement et les guide pendant leur migration. Les cellules mésenchymateuses de la nageoire ont une morphologie différente des CSR du THC, avec des protrusions membranaires plus longues et ramifiées qui peut être dû à la différence de composition de la matrice extracellulaire. A l'âge adulte les cellules mésenchymateuses de la queue sont différenciées en fibroblastes (Lee et al., 2013).

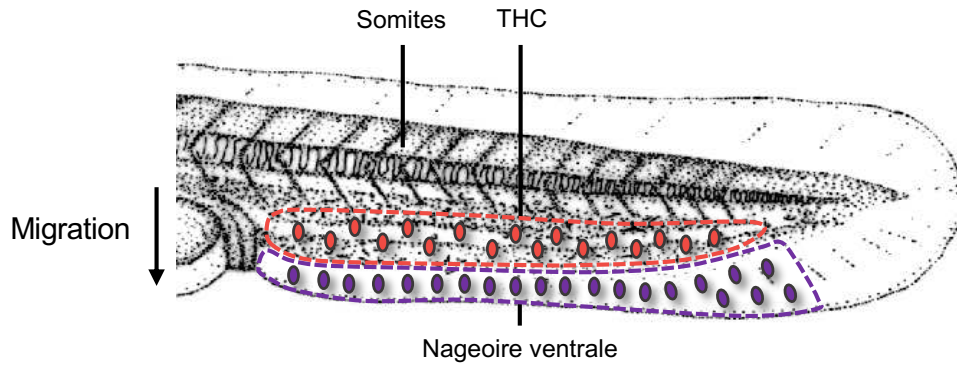


Figure I21 – Cellules stromales de la niche et mésenchymateuses de la nageoire

Les progéniteurs des cellules stromales émergent des somites puis migrent ventralement vers le tissu hématopoïétique caudal (THC). Ils peuvent soit devenir des cellules résidentes de la niche hématopoïétique (rouge), s’y multiplier et y maturer pour assurer son bon fonctionnement, ou bien continuer leur migration pour devenir des cellules mésenchymateuses de la nageoire (violet). Ces deux types cellulaires ont donc la même origine somitique mais des localisations, morphologies et fonctions différentes.

Figure réalisée à partir de (Lee et al., 2013)

Objectifs du projet de thèse

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, notre laboratoire a identifié les composants du THC et, a notamment décrit le rôle clé des cellules stromales, essentielles à la maintenance, à l'expansion et à la différenciation des CSH. Le projet de thèse visait à étudier le développement de ces cellules, de leur origine, jusqu'à leur maturation pour l'établissement d'une niche hématopoïétique fonctionnelle.

Les progéniteurs des cellules stromales sont originaires des somites caudaux et émergent suivant une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Chez le poisson zèbre, un somite est formé toutes les 30 minutes par clivage du mésoderme pré-somitique, ce qui provoque un décalage spatiotemporel de leur degré de maturité à un instant donné. Notre imagerie live à contraste interférentiel a montré qu'avant l'évènement de TEM, les précurseurs des cellules stromales s'individualisent en amas cellulaires dans la partie ventrale des somites, ce qui suggère un réarrangement des jonctions cellulaires. Elles seraient renforcées au sein de la structure mais affaiblies chez les cellules voisines, selon un processus qui se propage de somite en somite, de façon rostro-caudale, tout comme la somitogenèse l'a fait quelques heures auparavant. Au début, nous souhaitions identifier et étudier les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) impliquées dans la spécification des progéniteurs au sein du somite et jouant un rôle dans la TEM. Finalement, il s'avère que le candidat retenu s'est révélé être davantage impliqué dans des évènements plus tardifs, notamment dans la migration semi-collective des cellules stromales, préalable à leur arrivée dans la future niche, et dans les interactions entre cellules stromales et cellules endothéliales lors de la formation du THC.

L'écriture des résultats est organisée en six parties. Tout d'abord, la première partie explique comment les protéines d'adhésion cibles de cette étude ont été déterminées, et présente l'efficacité des outils utilisés, ainsi que la mise au point de l'imagerie *in vivo*. Elle décrit les expériences préliminaires qui nous ont conduit à écarter la Pcdh10b de l'étude et à nous focaliser sur la Pcdh18a. Pour la plupart des expériences, nous avons comparé la condition contrôle à la condition où la Pcdh18a endogène est mutée, grâce à l'utilisation d'un morpholino, où son activité normale est empêchée par l'expression d'une forme mutée à action dominante négative. La deuxième partie porte sur la migration semi-collective des précurseurs des cellules

stromales, juste après leur émergence des somites. Nous avons étudié leur comportement migratoire au cours du temps, notamment les trajectoires et vitesses de migration, les profils de contacts entre les cellules stromales qui influencent ces paramètres, ainsi que les caractéristiques de genèse des filopodes au cours de la migration. Les troisième et quatrième parties s'intéressent aux conséquences de l'interférence avec la fonction de Pcdh18a sur le développement du plexus veineux caudal, puis étudient plus en détail son effet sur la différenciation des cellules stromales et leurs interactions avec les cellules endothéliales du plexus. Dans la cinquième partie, nous nous sommes intéressés à la place de la matrice extracellulaire dans la formation du THC et demandés si Pcdh18a pouvait réguler l'expression de certains composants de la matrice. Pour finir, nous avons évalué si l'altération de Pcdh18a pouvait avoir un effet sur la genèse des cellules souches hématopoïétiques, ainsi que sur leur logement et multiplication dans leur première niche.

Résultats

1. Préliminaires

L'étude de la genèse des cellules stromales et du développement de la niche des cellules souches hématopoïétiques requiert des outils qui permettent de visualiser les événements au cours du temps. Cela sollicite l'utilisation de lignées transgéniques spécifiques des types cellulaires étudiés, et adaptées aux moments du développement observés. La recherche puis l'étude des CAMs potentiellement impliquées dans le développement de nos cellules d'intérêt a nécessité un criblage préalable, puis des expériences préliminaires, afin de centrer notre étude sur la cible la plus prometteuse.

1.1. Contraintes et outils utilisés pour l'imagerie dynamique *in vivo* des processus étudiés

Le projet porte notamment sur deux stades du développement qui ne présentent pas les mêmes contraintes physiques et biologiques. Tandis que l'étude de l'émergence et de la migration des progéniteurs des cellules stromales nécessite un marquage précoce des cellules au sein du somite, l'étude de la maturation du THC requiert un marquage plus spécifique et durable des types cellulaires d'intérêt. Par ailleurs, lors de la somitogenèse caudale, cette région de l'embryon est en constante élongation, ce qui provoque une compression des tissus s'il est placé dans un environnement contraint, nécessaire pour une imagerie stable dans le temps. Il a été nécessaire d'optimiser la technique d'imagerie et de définir l'intervalle de temps où les contraintes physiques n'altèrent pas la qualité de l'analyse.

1.1.1. *Imagerie de la migration des progéniteurs des cellules stromales*

Lors de la somitogenèse caudale, la queue de l'embryon est courbée vers le bas dans les étapes précoces, puis elle remonte progressivement et s'allonge du côté caudal. Cela génère des forces de compression qui peuvent déformer le tissu si les contraintes physiques, exercées sur l'embryon, ne lui offrent pas assez d'espace pour se développer correctement (**Figure R1-A**). Le moment d'émergence de nos cellules d'intérêt (23 hpf) se situe légèrement avant la fin du redressement de la queue (24 hpf). Il est alors préférable de monter les embryons à ce stade, même si cela nous fait manquer quelques événements d'émergence cellulaire. Les somites n'ayant pas tous le même degré de maturité à un temps donné, il est alors possible d'avoir accès

à des stades plus ou moins avancés de l'émergence selon le somite considéré. La compression du tissu est alors considérablement réduite, bien que celle-ci soit inévitable au bout de dix heures environ. La migration cellulaire peut donc être suivie sans problème pendant cet intervalle temporel, qui est suffisant pour notre étude.

Afin de marquer les progéniteurs dans la partie ventrale des somites, nous avons privilégié l'utilisation de la lignée Tg(*pax3a:GFP*) qui marque fortement les cellules de la crête neurale mais aussi la partie ventrale des somites, ce qui permet de cibler notre zone d'intérêt (**Figure R1-B**). Dans une moindre mesure le myotome est aussi marqué, et cela correspond aux zones d'expression de *pax3a* au sein du somite (voir **Figure I4**). Les amas cellulaires ventraux sont marqués, dans chaque somite, environ 2.5 heures après la formation du somite (stade S₅). La fluorescence perdure assez longtemps pour suivre les cellules lors de leur migration, puis elle s'éteint progressivement car *pax3a* n'est plus exprimé par les cellules stromales. Au même moment et également à partir de la partie ventrale des somites, des cellules migrent dorsalement pour devenir des chondrocytes. Ces cellules migrent sur la surface médiale du somite, tandis que les progéniteurs des cellules stromales du futur THC migrent en direction ventrale. Les cellules pigmentaires, fortement marquées, qui proviennent de la crête neurale, gênent l'imagerie à partir de 30 hpf car elles migrent ventralement jusqu'à notre zone d'intérêt.

Créée au laboratoire par Emi Murayama, la lignée Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:RFP*), où l'expression de la protéine fluorescente est contrôlée par le promoteur *cspg4* (pour « chondroïtin sulfate proteoglycan 4 »), est plus spécifique des précurseurs des cellules stromales, mais les cellules sont marquées un peu plus tardivement et de façon légèrement mosaïque. Certaines expriment le transgène au sein du somite, mais la plupart sont marquées au moment de l'émergence ou même plus tard, alors qu'elles ont déjà commencé à migrer. Par contre, le marquage est durable et augmente au cours du temps, ce qui en fait un outil robuste pour suivre l'évolution à des stades plus avancés. Cette lignée permet de combiner l'imagerie avec des constructions fusionnées à la GFP. Elle est particulièrement utile pour mettre des transgènes d'intérêt sous le contrôle indirect du promoteur *cspg4*, via un promoteur 'relais' UAS, comme c'est le cas dans les embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:Lifect-GFP*) qui ont été utilisés pour visualiser *in vivo* et de façon dynamique l'actine-F de nos cellules d'intérêt (**Figure R1-C**). De plus, la protéine fluorescente GFP mature plus rapidement que la RFP et, est aussi plus brillante, ce qui permet une détection d'environ une heure plus tôt. Il y a donc davantage de cellules marquées, dès la formation des amas cellulaires et bien avant l'émergence.

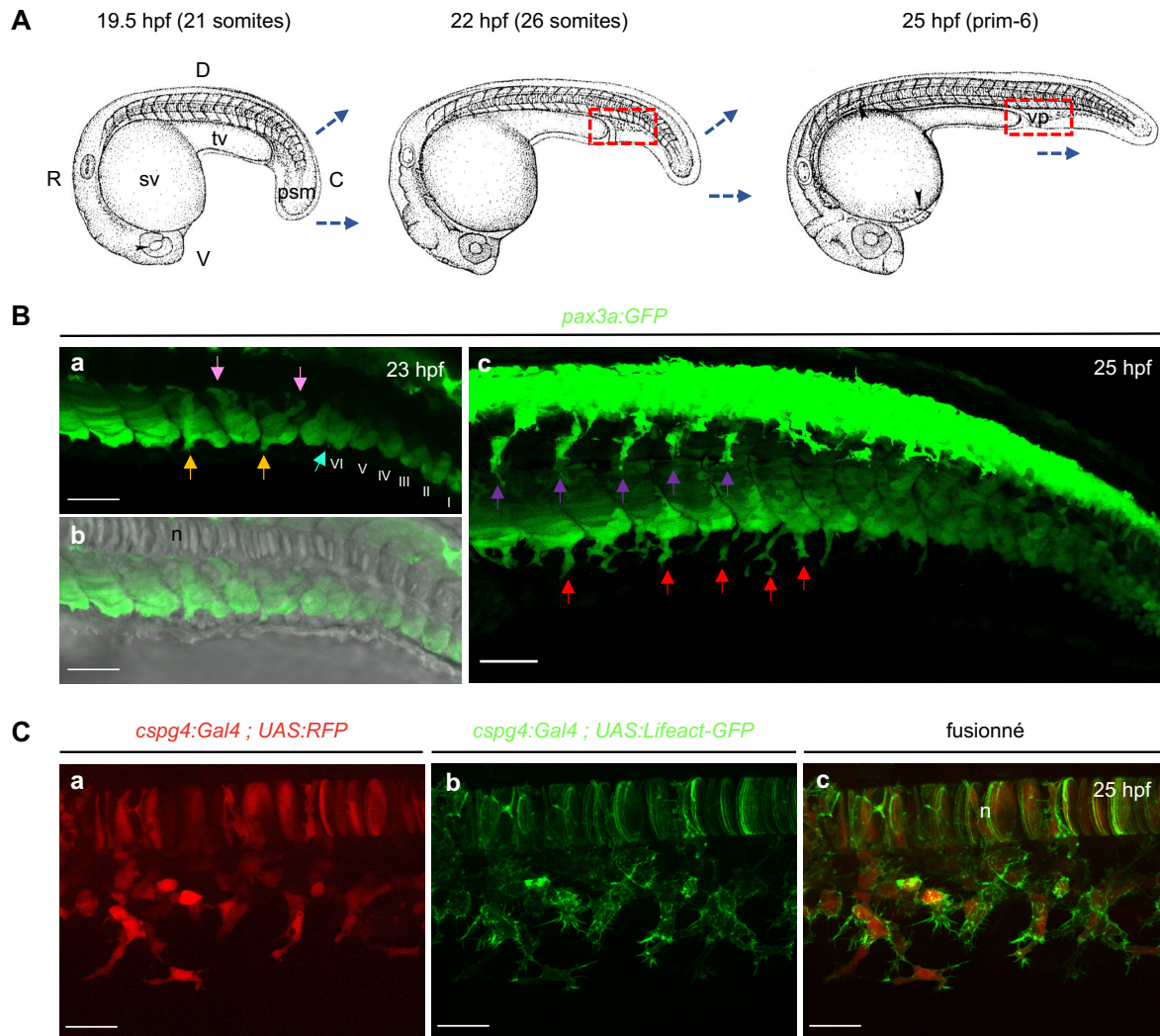


Figure R1 – Contraintes physiques et imagerie des stades précoces de développement des progéniteurs des cellules stromales

A) Au stade 19.5 hpf, la queue de l'embryon est courbée vers le bas, puis elle remonte progressivement au cours du développement et s'allonge selon l'axe rostro-caudal (flèches bleues). Pendant l'heure qui sépare les stades 23 et 24 hpf, la morphologie de l'embryon change rapidement avec l'allongement et le redressement de la queue. L'imagerie est réalisée juste après l'élongation du tube vitellin et englobe la partie ventrale des somites et la cavité du futur plexus veineux caudal (rectangle rouge). D : dorsal, V : ventral, C : caudal, R : rostral, sv : sac vitellin, tv : élongation du tube vitellin, psm : mésoderme pré-somitique, vp : veine primitive ou veine caudale primitive.

B) Acquisitions confocales *in vivo* de la lignée Tg(*pax3a:GFP*). Barre d'échelle : 50 μ m. **B-a)** Projection d'une pile de 15 plans. Les amas cellulaires ventraux sont marqués et les somites sont numérotés du plus jeune au plus avancé au cours de leur maturation. Les progéniteurs commencent à émerger à 23 hpf (flèches orange) alors que seuls des petits blebs sont présents au somite VI (qui à ce stade correspond au 23^{ème} somite formé, flèche verte). Dans le même temps, mais plus en médial, des cellules émergent et migrent vers le haut pour devenir les chondrocytes (flèches roses). **B-b)** Superposition avec le canal fond clair, n : notochorde. **B-c)** Projection maximale de 96 plans. A 25 hpf, les progéniteurs des cellules stromales sont marqués pendant leur migration (flèches rouges), mais aussi les cellules de crêtes neurales précurseurs de cellules pigmentaires, qui migrent elles aussi ventralement (flèches violettes).

C) Projection maximale d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons issus du croisement Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:RFP*) x Tg(*gata2b:Gal4 ; UAS:Lifect-GFP*). Aucun embryon n'a été détecté exprimant le promoteur *gata2b*, marquant l'endothélium hémogénique du plancher ventral de l'aorte et les CSPH qui en sont issues. Lifect est un peptide qui se fixe à l'actine-F des cellules sans perturber sa dynamique, permettant une visualisation *in vivo* et dynamique. Le promoteur *cspg4* (pour « chondroïtine sulfate proteoglycan 4 ») est exprimé par les progéniteurs mais aussi fortement au niveau de la notochorde (n). Barre d'échelle : 30 μ m.

1.1.2. Imagerie du développement du tissu hématopoïétique caudal

Afin d'imager le développement du THC, il est nécessaire d'utiliser des outils qui permettent de visualiser de façon dynamique et durable les changements morphologiques au cours du temps. Aux stades étudiés, allant de 35 à environ 60 hpf, la queue de l'embryon continue de s'allonger mais le tissu est beaucoup moins déformé qu'aux stades précoces, lorsque l'environnement spatial est restreint (**Figure R2-A**). Les contraintes physiques sont moins marquées et il est possible d'imager pendant des temps plus longs.

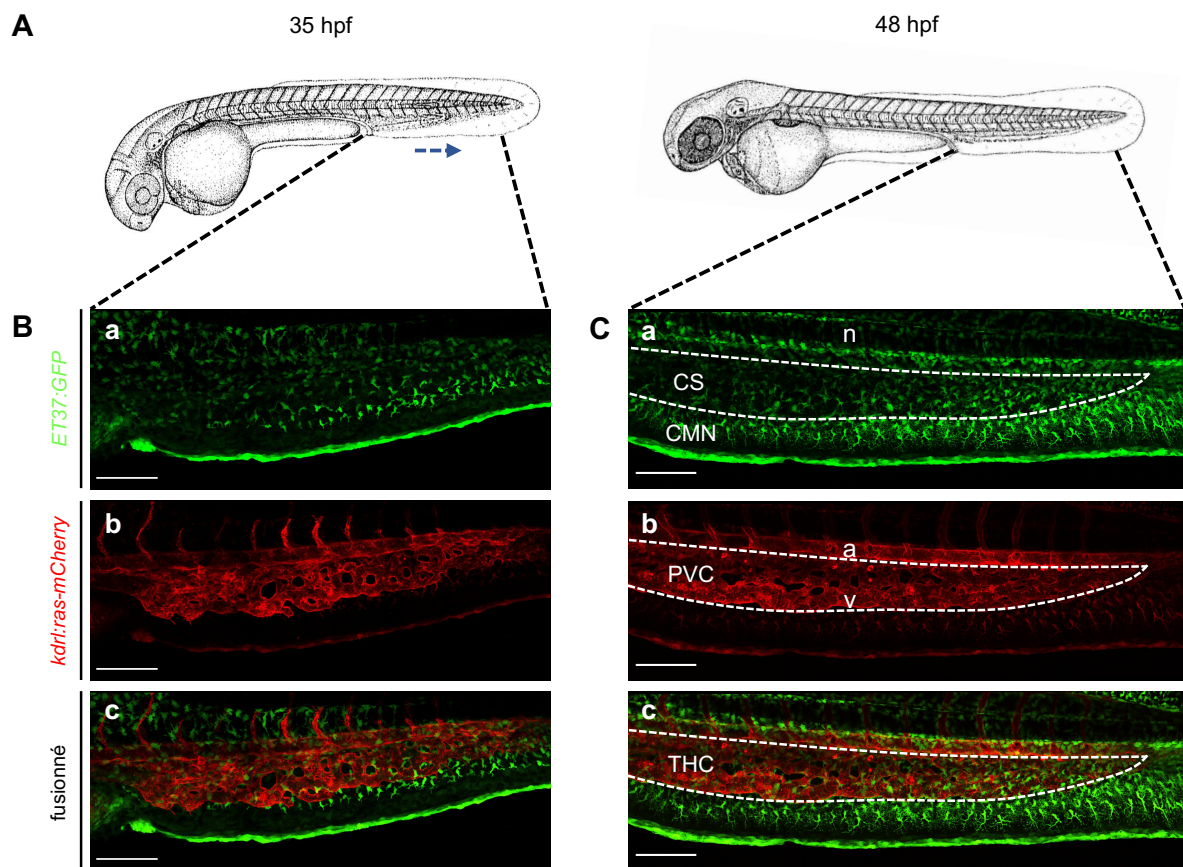


Figure R2 – Imagerie du développement du tissu hématopoïétique caudal

A) A 35 hpf, le plexus veineux caudal est court et assez large. Il change activement de morphologie, ce qui va aboutir à la formation, ventralement au plexus, de la veine caudale définitive. La queue continue de s'allonger légèrement (flèche bleue). A 48 hpf, la veine définitive est formée et le plexus s'affine. **B/C)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo*, d'embryons doubles transgéniques Tg(ET37:GFP ; kdr1:ras-mCherry) à 35 et 48 hpf. Barre d'échelle : 100 μm. **a)** La lignée Tg(ET37:GFP) marque les cellules stromales (CS) et les cellules mésenchymateuses de la nageoire (CMN), n : notochorde. **b)** La lignée Tg(kdr1:ras-mCherry) marque la membrane des cellules endothéliales. PVC : plexus veineux caudal, a : artère caudale, v : veine définitive. **c)** fusion des canaux rouge et vert. THC : tissu hématopoïétique caudal, composé des cellules stromales et des cellules endothéliales.

Les deux lignées que j'ai principalement utilisées marquent durablement d'une part les cellules stromales et d'autre part les cellules endothéliales, qui sont les deux types cellulaires composant la niche, avec les cellules hématopoïétiques (**Figure R2-B/C**). L'étude des interactions entre cellules stromales et cellules endothéliales est une partie importante du projet. La lignée Tg(*ET37:GFP*) marque les cellules mésenchymateuses d'origine mésodermique qui montent ou descendent à partir des somites. Les cellules stromales sont marquées assez tardivement après leur émergence, mais elles expriment convenablement le transgène dès 26-28 hpf. Cette lignée est plutôt stable et non mosaïque, ce qui permet de marquer l'ensemble des cellules et de réaliser des comptages. Lorsque les cellules sortent du THC pour aller coloniser la nageoire (devenant des « cellules mésenchymateuses de la nageoire » ou CMN), la fluorescence devient plus intense et il est parfois nécessaire de saturer ce signal pour acquérir correctement les CSR dans le THC (**Figure R2-Ca**). Les expériences ont montré que la fluorescence perdure jusqu'au moins 3 jpf, stade le plus tardif où les observations ont été faites. Le système vasculaire est, quant à lui, imagé grâce à la lignée Tg(*kdrl:ras-mCherry*) qui marque les membranes des cellules endothéliales. L'adressage de la protéine fluorescente à la membrane est particulièrement appréciable pour distinguer des structures, telles que les filopodes. Le système vasculaire caudal est marqué aussi bien aux stades précoces du développement, où il est encore en formation (22-23 hpf), qu'aux stades plus avancés avec la ramification du plexus veineux à 35 hpf, et la formation de la veine caudale définitive à 48 hpf (**Figure R2-Bb/Cb**). Pour la visualisation des vaisseaux sanguins, nous avons aussi utilisé la lignée Tg(*fli:GFP*) qui marque fortement les cellules endothéliales de manière homogène, ainsi que les cellules myéloïdes primitives, et, plus faiblement, les érythrocytes primitifs.

1.2. Molécules d'adhésion potentiellement impliquées dans le développement des cellules stromales

Après avoir découvert l'origine somitique des cellules stromales qui composent la niche, Emi Murayama s'est intéressée à la caractérisation des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) impliquées dans la spécification, l'émergence et la migration des progéniteurs de ces cellules. Dans un premier temps, la formation des structures particulières, dites d'amas cellulaires, au niveau de la partie ventrale des somites permet de régionaliser la zone de spécification des progéniteurs au sein du tissu. Puis, l'émergence des cellules mésenchymateuses mobiles, à partir de ces structures épithéliales, suggère fortement une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ces deux étapes, ainsi que la migration cellulaire qui s'ensuit, font typiquement appel à des CAMs, aussi bien pour le maintien des structures

épithéliales que pour procurer une mobilité aux cellules. Le but premier a donc été de découvrir quelles protéines d'adhésion étaient exprimées spécifiquement dans les progéniteurs des cellules stromales.

La E-cadhérine et la N-cadhérine sont connues comme impliquées dans le mécanisme de TEM, notamment par leur expression successive. Cependant, chez le poisson zèbre, ces molécules ne sont pas exprimées dans nos zones d'intérêt, la E-cadhérine étant plutôt retrouvée en surface de l'embryon et la N-cadhérine dans le mésoderme pré-somitique. Le crible s'est alors tourné vers les protocadhérines, d'abord en utilisant les données d'expression disponibles sur la base de données ZFIN, puis en confirmant au laboratoire par hybridation in situ. Deux protocadhérines ont présenté un profil d'expression qui correspondait à ce que nous cherchions.

1.2.1. *pcdh10b* et *pcdh18a* sont exprimés dans les progéniteurs des cellules stromales

Notre intérêt s'est finalement porté sur deux protocadhérines de la famille des non-clusterisées $\delta 2$.

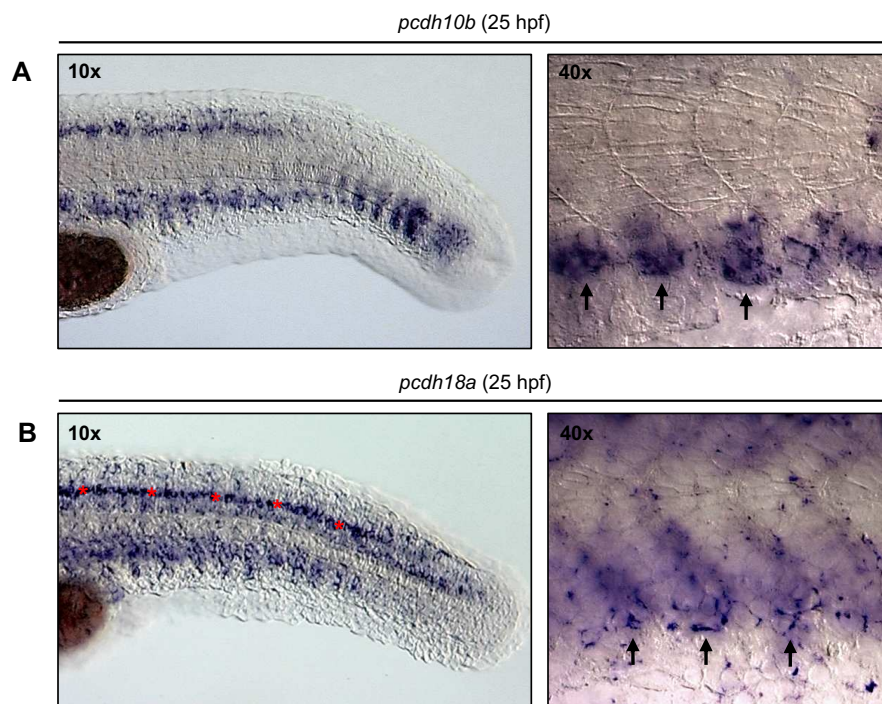


Figure R3 – Profil d'expression de *pcdh10b* et *pcdh18a*

A/B) Microscopie à contraste interférentiel (DIC) d'hybridations in situ réalisées sur embryon entier (WISH) à 25 hpf pour les gènes *pcdh10b* et *pcdh18a*. **A)** *pcdh10b* est exprimé précocement dès le mésoderme pré-somitique. Le somite nouvellement formé exprime fortement *pcdh10b*, puis l'expression diminue et se régionalise progressivement dans la partie ventrale des somites, au niveau des amas cellulaires (flèches). **B)** *pcdh18a* est exprimé plus tardivement, à partir du somite S₅ en partant du côté caudal, dans la partie ventrale où les progéniteurs se développent (flèches). Des cellules nerveuses du tube neural sont aussi fortement marquées (astérisques rouges).

Les gènes *pcdh10b* et *pcdh18a* sont exprimés dans la partie ventrale des somites entre 23 et 25 hpf, à l'endroit où les cellules progénitrices se développent, comme montré par WISH (pour « whole-mount in situ hybridization »), (**Figure R3**). Le détail du profil d'expression de *pcdh10b* et *pcdh18a* est intéressant. L'expression de *pcdh10b* est observée dans le mésoderme pré-somitique, puis dans le somite nouvellement formé, pour finalement se régionaliser progressivement dans la partie ventrale des somites où se situent les précurseurs des cellules stromales. Cela suggère que la protéine pourrait être importante pour la spécification des cellules progénitrices au sein de l'environnement somitique. L'expression de *pcdh18a* est plus tardive. Elle est observée dans la partie ventrale des somites matures, au moment d'émergence des progéniteurs et de leur migration. Cela suggère que la protéine pourrait être davantage impliquée dans la migration et la différenciation des progéniteurs en cellules spécialisées. De plus, comme mentionné dans l'introduction, il a été montré que Pcdh10b est impliquée dans la somitogenèse et Pcdh18a dans la migration cellulaire.

1.2.2. Validation de l'efficacité des morpholinos utilisés

Afin d'étudier la fonction d'un gène, le morpholino est un outil très utilisé chez le poisson zèbre, qui permet de moduler l'expression d'un gène cible. Les morpholinos antisens se fixent sur leurs séquences spécifiques d'ARN pour bloquer l'accès aux composants cellulaires. Ils peuvent alors empêcher la traduction de l'ARNm ou l'épissage de certains introns, ce qui peut engendrer une absence de protéine, une production partielle et/ou une troncature. En général, les morpholinos d'épissage ont des effets non spécifiques moins forts sur le développement de l'embryon. Il est nécessaire d'effectuer des expériences préliminaires afin de s'assurer du mode d'action du morpholino choisi et de déterminer la concentration optimale, où le dosage efficacité vs. toxicité est le plus adéquat.

Pour étudier *pcdh10b*, nous avons, dans un premier temps confectionné un morpholino censé bloquer l'épissage du site exon 1 – intron 1, avec l'aide des experts de *GeneTools*. Néanmoins, nos expériences préliminaires ont montré que ce morpholino ne permettait pas de bloquer convenablement l'épissage. Par PCRq, réalisée sur ADNc issus d'embryons injectés avec le MO contrôle ou le MO *pcdh10b*, nous avons montré que l'efficacité était de 32% pour 6 ng, 62% pour 8 ng et 59% pour 12 ng de morpholino (**Figure R4-A**). Les doses injectées étaient déjà élevées et il n'y avait pas de différence notable entre l'injection de 8 et de 12 ng. Il était donc préférable de changer de morpholino. Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation d'un morpholino-ATG déjà publié, bien que celui-ci soit responsable de défauts de

la somitogenèse (Murakami et al., 2006). Néanmoins, nous avons légèrement décalé la séquence en 5', sur les conseils des experts de *GeneTools*. Fixée préalablement à 2 ng par la littérature, nous avons finalement diminué la dose de morpholino injectée à 1,5 ng afin de réduire les effets toxiques sur le développement des somites.

Pour l'étude de *pcdh18a*, nous avons privilégié un morpholino qui bloque l'épissage car une étude a montré que le morpholino-ATG a un effet délétère sur le développement des embryons, dès le stade épibolie (Aamar and Dawid, 2008). Selon les experts de *GeneTools*, le site le plus susceptible de donner un bon résultat était l'intron 1 – exon 2. Nos données de PCRq, provenant d'embryons injectés avec le MO contrôle ou le MO *pcdh18a*, ont montré que l'injection de 2 ng bloque 76% des épissages et que l'injection de 4 ng bloque 85% des épissages intron 1 – exon 2, ce qui est convenable (**Figure R4-B**). Une dose plus élevée induit des défauts de développement et de la mortalité, c'est pourquoi nous avons défini la dose optimale à 4 ng.

Le profil d'épissage de *pcdh18a* montre que le morpholino utilisé induit bien la rétention spécifique de l'intron 1 dans l'ARNm et ceci a été montré avec deux couples d'amorces, l'un pour vérifier la rétention de l'intron et l'autre pour s'assurer que l'exon 3 est, quant à lui, épissé correctement (**Figure R4-C**). Nos données de séquençage sur banque d'ADNc ont montré que la rétention de l'intron provoque l'apparition d'un codon STOP prématuré. Ces ADNc ont été obtenus à partir de queues d'embryons et nous avons détecté une forte prédominance de l'isoforme 202, qui possède un exon 2 légèrement plus petit que celui de l'isoforme 201, que ce soit dans les échantillons contrôles ou morphants. Ces données de séquençage nous orientent vers la prédiction d'une forme tronquée de *Pcdh18a*, en condition morphant. Un article sur *pcdh18b*, qui utilisait le même type de morpholino intron 1 – exon 2, en arrivait à la même prédiction (Biswas et al., 2014). En présence du morpholino, *Pcdh18a* est tronquée au niveau de l'acide aminé 106, dans sa partie cytoplasmique, après le site SH3 de liaison aux kinases Src (**Figure R4-D**). Nous appellerons cette protéine mutée *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆*. La perte du domaine WIRS ne permet plus à la protéine de se lier au complexe WAVE, qui est important pour l'interaction avec l'actine-F. Cela indique qu'il y aura probablement des dérégulations de la modulation du cytosquelette.

L'étape suivante constitue les premières observations phénotypiques. Selon les résultats préliminaires obtenus, il est possible de déterminer si la cible est prometteuse et mérite d'être mise au centre d'un projet.

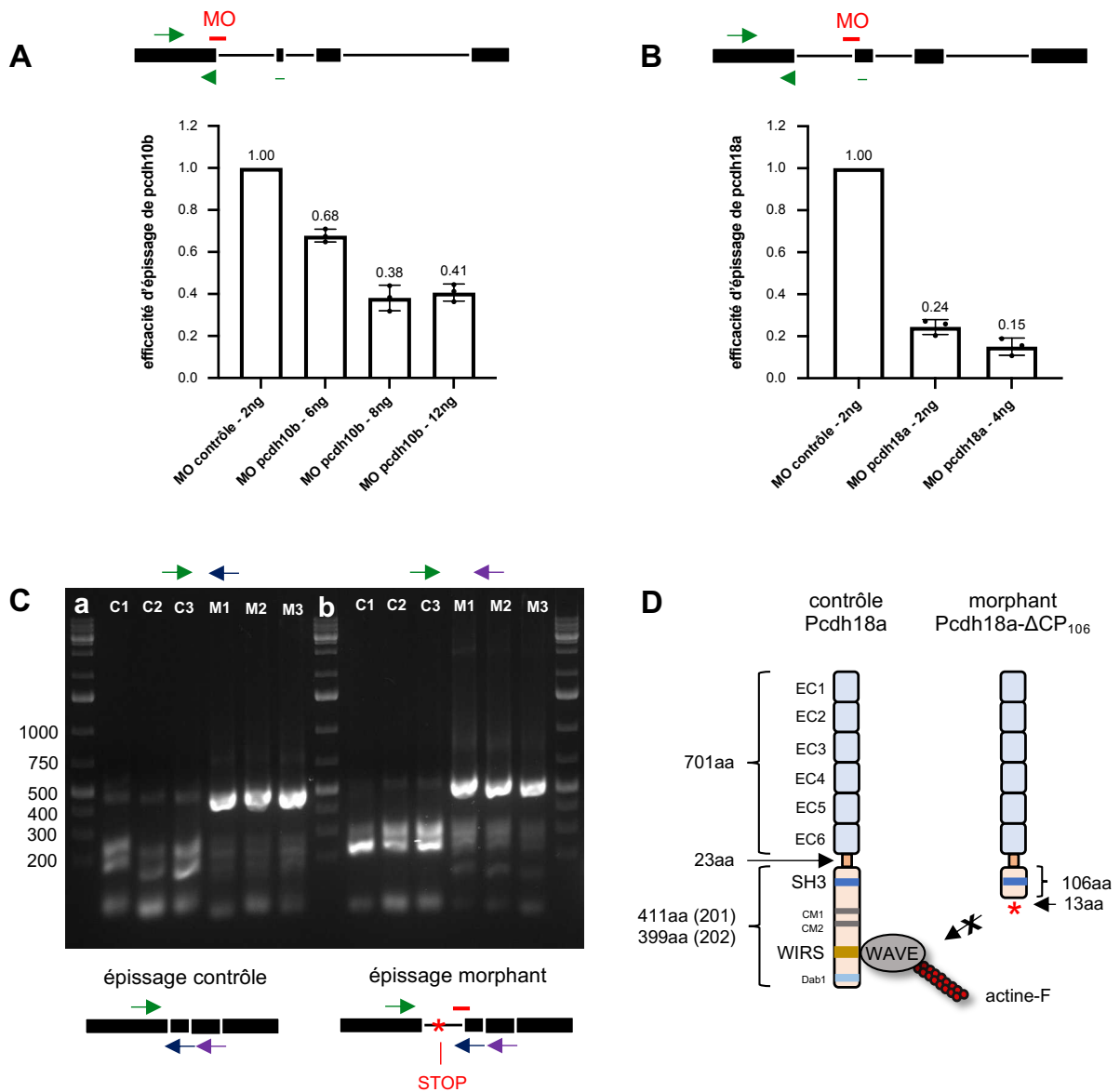


Figure R4 – Efficacité et mode d’action des morpholinos

A/B) Test de l’efficacité de blocage de l’épissage par PCRq sur ADNc provenant d’embryons injectés avec le MO contrôle ou le MO *pcdh10b/pcdh18a* à différentes concentrations. L’amorce sens est choisie dans l’exon 1 tandis que l’amorce antisens est choisie pour moitié dans l’exon 2 et pour l’autre moitié dans l’exon 1. L’amplification ne peut se faire que si l’épissage a été correctement réalisé. Efficacité relative par rapport à celle du contrôle qui est fixée à 1. Moins il y a d’amplification et plus le morpholino est efficace. **C)** Vérification du profil d’épissage de *pcdh18a* par PCR sur ADNc issus d’embryons injectés avec le MO contrôle ou 4 ng de MO *pcdh18a*. Deux couples d’amorces ont été utilisés avec le sens dans l’exon 1 et l’antisens dans l’exon 2 (**a**) ou dans l’exon 3 (**b**). Les tailles des fragments d’ADN observées correspondent aux tailles attendues (1^{ère} PCR : 130 pb pour les contrôles et 437 pb pour les morphants, 2^{ème} PCR : 206 pb pour les contrôles et 495 pb pour les morphants). Nos données de séquençage ont confirmé la rétention de l’intron 1 chez les morphants, suivi des exons 2, 3 et 4, et ont montré que le codon STOP, situé dans l’intron 1, est conservé. **D)** Nos données de PCR et de séquençage prédisent l’apparition d’un codon STOP, suite à la rétention de l’intron 1 chez les morphants. La protéine morphante est tronquée au niveau de l’acide aminé 106 de sa partie cytoplasmique (*Pcdh18a-ΔCP₁₀₆*), après le domaine SH3 de liaison aux kinases Src. Il y a perte du domaine WIRS qui interagit avec le complexe WAVE, important pour l’interaction avec l’actine-F.

1.2.3. Manipulation difficile de *pcdh10b*

La microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC) *in vivo* nous permet d'accéder à des détails sur la structure des tissus, ce qui est particulièrement utile pour les premières observations. Comme mentionné précédemment, l'injection de 2 ng de MO *pcdh10b* perturbe fortement la somitogenèse, avec des défauts de compartimentalisation des tissus (**Figure R5-Aa/c**). Les limites des somites sont moins définies chez les morphants et des protubérances apparaissent au niveau dorsal. Néanmoins, les cellules progénitrices peuvent émerger, bien que des différences notables soient à souligner. Il n'est pas rare de voir des cellules meneuses émerger simultanément du même somite, contrairement aux contrôles où cette émergence se fait progressivement et en chaînette (**Figure R5-Ab/d**). De plus, la migration cellulaire semble retardée et des corps cellulaires isolés, détachés des amas par de longues protrusions membranaires, sont présents (**Figure R5-B**).

Notre étude porte sur le développement des cellules stromales dont les progéniteurs sont issus des somites. Afin de savoir si l'effet du morpholino observé sur les cellules stromales est spécifique, et non pas dû aux problèmes de somitogenèse préalables, nous avons décidé de réduire la concentration de morpholino injecté à 1,5 ng au lieu de 2 ng. Après émergence et migration, les cellules stromales commencent à se différencier au sein du THC dès 35 hpf. Nous souhaitons évaluer le nombre de cellules chez les morphants afin de savoir si la perturbation de *Pcdh10b* a des effets néfastes sur le développement des cellules stromales. Après comptage à 40 hpf des cellules ET37:GFP⁺ dans le THC de cinq embryons par condition, nous n'avons pas détecté de différences significatives du nombre de cellules stromales chez les morphants par rapport aux contrôles, avec des moyennes respectives de 139,4 et 137,4 cellules (**Figure R5-C**). Il est possible que la dose de morpholino injectée ne soit pas suffisante pour induire un phénotype ou que d'autres acteurs, et notamment d'autres CAMs, soient responsables d'un sauvetage phénotypique.

Alcama, de la famille des immunoglobulines-CAMs (Ig-CAMs), est une molécule candidate pour la complémentation de *Pcdh10b*. Cette protéine est exprimée au niveau de la partie ventrale des somites et son expression augmente avec le degré de maturité des structures contenant les progéniteurs, suggérant un rôle dans leur développement. Aussi, lors de la migration, la protéine est localement exprimée au niveau des zones de contact entre les cellules, ce qui suggère son implication dans l'adhésion cellulaire, importante pour la cohésion de la migration semi-collective. Les données de PCRq indiquent que les morphants *Pcdh10b*

présentent une expression relative d'*alcama* qui est 1,4 fois plus élevée que chez les contrôles, à 23 hpf (**Figure R5-D**). Suite à l'altération de *Pcdh10b*, il semble que les régulations mises en place essaient de combler son manque par l'augmentation de l'expression d'*Alcama*. De par l'expression et le rôle d'*Alcama*, nos résultats indiquent que cette protéine joue probablement un rôle complémentaire de *Pcdh10b* dans le phénomène étudié. Il est possible qu'une dose élevée de morpholino altère trop fortement le développement précoce, empêchant d'étudier les phénomènes en aval, tandis qu'une dose plus faible serait compensée par les régulations géniques de sauvetage, masquant le phénotype induit par l'injection du MO *pcdh10b*.

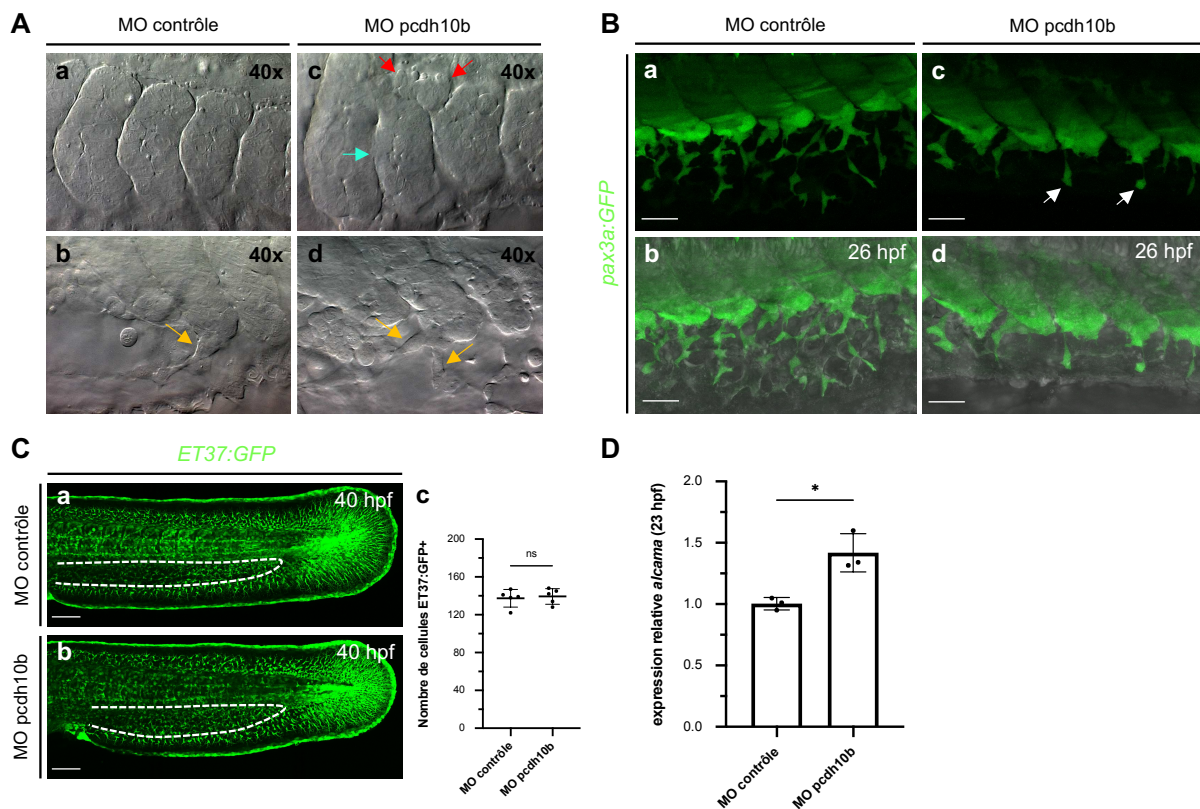


Figure R5 – Effets phénotypiques du morpholino *pcdh10b*

A) Microscopie VE-DIC d'embryons injectés avec le MO contrôle ou 2 ng de MO *pcdh10b* à 22 hpf (**a/c**) et à 23 hpf (**b/d**). Chez les morphants, les bords des somites sont moins nets (flèche bleue) et irréguliers (flèches rouges). Les cellules ont tendance à émerger simultanément du même somite, contrairement au contrôle où les cellules émergent l'une après l'autre en chaînette (flèches orange). **B)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* à 26 hpf, d'embryons *Tg(pax3a:GFP)* injectés avec le MO contrôle ou 2 ng de MO *pcdh10b*. **b/d**) Superposition avec le canal fond clair. Barre d'échelle : 30 μ m. Des corps cellulaires isolés, détachés des amas cellulaires par de longues protrusions membranaires sont présents chez les morphants (flèches blanches). **C)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* à 40 hpf, d'embryons *Tg(ET37:GFP)* injectés avec le MO contrôle ou 1,5 ng de MO *pcdh10b*. Barre d'échelle : 100 μ m. **C-c)** Comptage du nombre de cellules stromales *ET37:GFP*⁺ dans le THC (zone pointillés) de 5 embryons par condition. Le test de Student indique une différence non significative du nombre de cellules stromales entre les deux conditions avec en moyenne 137,4 cellules chez les contrôles et 139,4 cellules chez les morphants, ($p = 0,7280$). **D)** Données de PCRq mesurant l'expression du gène *alcama* à 23 hpf en condition MO contrôle ou MO *pcdh10b*. L'expression relative d'*alcama* est en moyenne 1,4 fois plus élevée chez les morphants que chez les contrôles, qui est en moyenne à 1. Le test de Student indique que cette augmentation est significative ($p = 0,0119$).

Dans notre cas précis, où le gène est exprimé lors du développement embryonnaire précoce, le morpholino peut ne pas être un outil adapté pour l'étude d'évènements plus tardifs. Nous nous sommes alors tournés vers une autre approche, afin de parvenir à tester si la médiation des interactions cellulaires par Pcdh10b joue un rôle crucial dans la formation des amas cellulaires et la spécification des progéniteurs des cellules stromales. Nous avons surexprimé une forme mutante Pcdh10b- Δ CPT, dite dominante négative, où les parties cytoplasmique (CP) et transmembranaire (T) sont remplacées par la protéine fluorescente mKate2 (**Figure R6-A**). Pcdh10b- Δ CPT est sécrétée et peut se fixer sur les protéines endogènes afin de rompre les interactions homophiles entre les cellules (Murakami et al., 2006). Nous avons cloné cette construction sous un promoteur *hsp70*, inductible par choc thermique. Cela permet de surexprimer Pcdh10b- Δ CPT à des stades plus tardifs du développement, quand la somitogenèse est déjà bien avancée, et ainsi de s'affranchir des problèmes de développement antérieurs à l'évènement d'émergence.

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions de l'expérience en testant différentes températures et durées de choc thermique. Nous avons alors fixé un choc thermique à 39°C pendant 30 minutes, qui permet d'obtenir une bonne expression du transgène sans altérer le développement. La fluorescence commence à apparaître deux heures après le choc thermique et augmente au cours du temps. Ainsi, un choc thermique à 20 hpf permet d'obtenir une expression vers 22-23 hpf, ce qui est optimal. La protéine mutante est exprimée à la membrane des cellules (**Figure R6-Ba**) mais aussi dans les espaces interstitiels, (ce que nous avons pu visualiser avec une construction analogue mais fusionnée à la GFP - données non montrées dans cette partie), ce qui prouve que la forme mutante est bien sécrétée. A 36 hpf, les embryons injectés avec Pcdh10b- Δ CPT-mKate2 présentent des défauts de développement. Le plexus veineux caudal est raccourci et s'arrête au niveau du dernier somite formé avant induction du choc thermique, et le vaisseau n'est pas correctement formé (**Figure R6-Bb**). Le THC est défectueux avec une cavité vide à l'endroit où, chez les contrôles, se trouvent les cellules stromales. La partie ventrale des somites est absente au niveau des somites formés après le choc thermique, tandis que les somites formés avant sont correctement développés (**Figure R6-Bc**). Cela suggère que Pcdh10b est effectivement impliquée dans la compartimentalisation de la partie ventrale des somites et qu'en l'absence de ces structures, les cellules stromales ne sont pas produites. Les structures formées avant choc thermique ne sont pas affectées, ce qui montre que les effets observés sont bien spécifiques de la surexpression de Pcdh10b- Δ CPT et non dus aux perturbations de l'expérience qui auraient provoqué une généralisation des altérations.

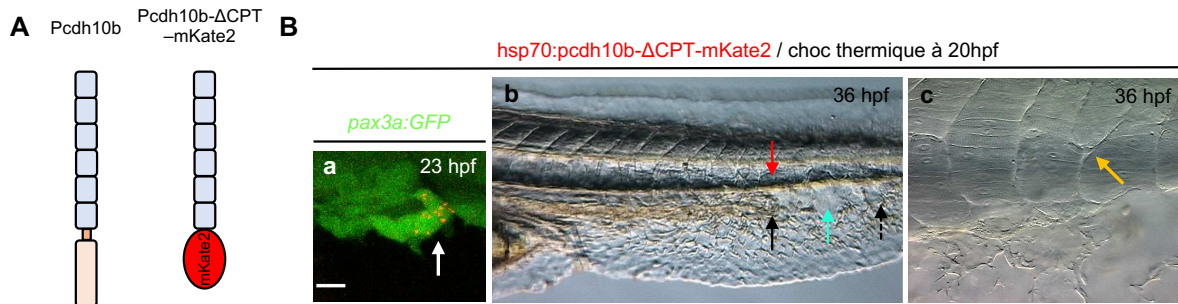


Figure R6 – Pcdh10b-ΔCPT altère le développement du THC

A) La construction dominante négative de Pcdh10b (Pcdh10b-ΔCPT) ne comporte que la partie extracellulaire. Les parties transmembranaire et cytoplasmique sont remplacées par la protéine fluorescente mKate2. La construction a été réalisée par clonage Gibson, à partir d'un plasmide fourni par (Murakami et al., 2006), et clonée en aval d'un promoteur *hsp70* inductible par choc thermique (39°C pendant 30 min). La littérature et nos données ont montré que cette forme est sécrétée. **B-a)** Piles de 4 plans d'acquisition confocale *in vivo* à 23 hpf d'un embryon Tg(*pax3a:GFP*), injecté avec *hsp70:pcdh10b-ΔCPT-mKate2*, choc thermique à 20 hpf. La construction est exprimée par des cellules de la partie ventrale des somites (flèche blanche). Barre d'échelle : 10 μm. **B-b/c)** Microscopie DIC *in vivo* à 36 hpf d'un embryon injecté avec *hsp70:pcdh10b-ΔCPT-mKate2*, choc thermique à 20 hpf. Acquisition du même embryon à l'objectif 10x (**b**) ou 40x (**c**). Le plexus caudal est raccourci (flèche noire ; la flèche en pointillés indique sa limite postérieure chez les contrôles, non montrés ici). Entre les deux, on observe une cavité vide (flèche bleue). La partie ventrale des somites est absente au niveau des somites formés après le choc thermique (flèche orange). Alors que les structures formées après choc thermique sont affectées, la partie la plus rostrale de la queue est correctement développée, ce qui suggère une spécificité du phénotype étudié.

Bien que prometteuses, ces expériences ont été difficiles à reproduire et les résultats phénotypiques étaient instables. Au sein d'une même expérience, les embryons présentaient pour la plupart le même phénotype, mais celui-ci était plus ou moins marqué d'une expérience à l'autre. Il est possible que les conditions de l'expérience soient particulièrement sensibles aux variations, et notamment au moment du choc thermique. De plus, Pcdh10b-ΔCPT perturbe la formation des somites et résulte en un déficit ou même en une absence de cellules stromales. Or, notre étude vise à étudier le développement des cellules stromales, ce qui est impossible dans ces conditions. Enfin, l'utilisation compliquée du morpholino ne permet pas de moduler facilement l'expression de *pcdh10b* pour se placer en condition de sous-expression. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons décidé de mettre temporairement de côté l'étude de *pcdh10b*. Cependant, les données préliminaires de compensation du phénotype par la protéine Alcama sont d'un intérêt particulier pour le laboratoire.

1.2.4. *Pcdh18a*, une cible prometteuse ?

L'étude du profil d'expression endogène de *pcdh18a* au cours du temps montre que ce gène est exprimé par les cellules progénitrices lors de leur migration à 26 hpf, et perdue à 36 hpf pendant leur maturation en cellules stromales. Par contre, son expression est fortement

diminuée à 48hpf (**Figure R7-B**), moment où les cellules stromales ont déjà bien entamé leur différenciation en types réticulaire et périvasculaire, distinguables morphologiquement. Ces résultats appuient notre hypothèse sur l'implication de *Pcdh18a* lors d'évènements plus tardifs, en comparaison de *Pcdh10b* qui est plutôt impliquée dans la spécification des progéniteurs, et notamment dans la migration et la maturation des progéniteurs des cellules stromales.

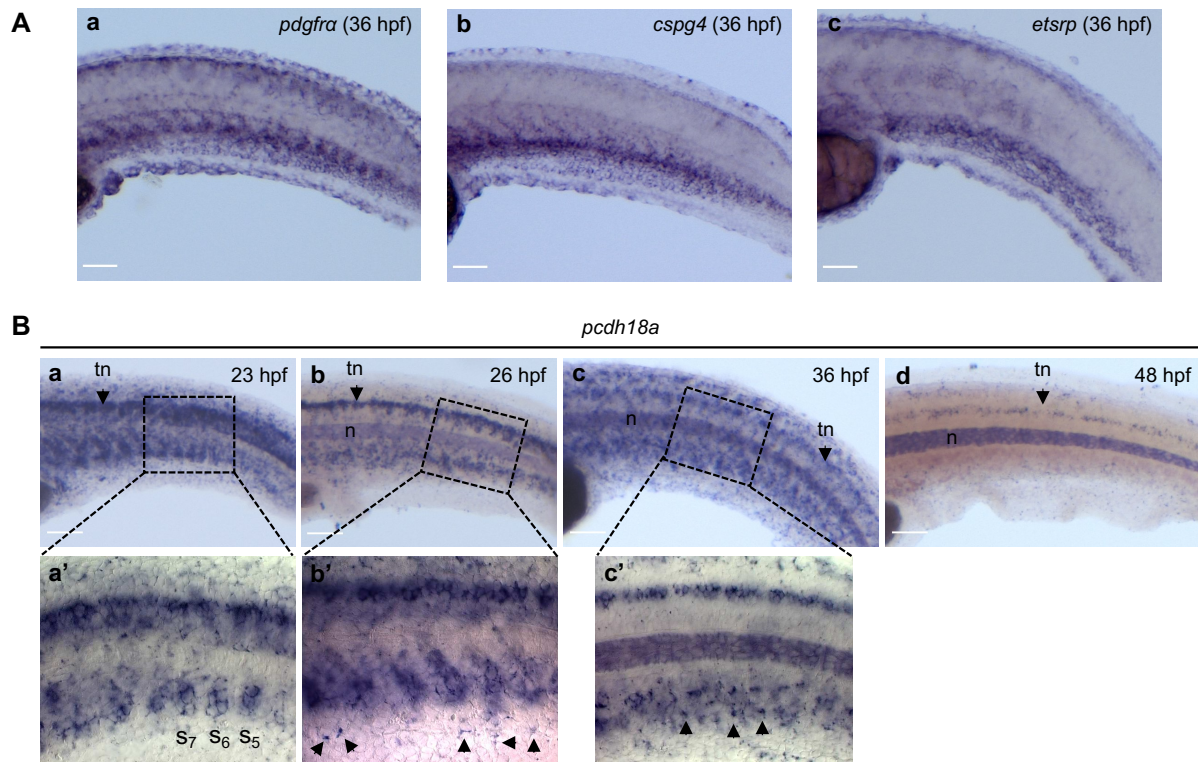


Figure R7 – Profil d'expression de *pcdh18a* à différents stades du développement

A) WISH révélant le profil d'expression endogène à 36 hpf des gènes **a**) *pdgfra* (pour « platelet derived growth factor receptor alpha ») et **b**) *cspg4* (pour « chondroïtin sulfate proteoglycan 4 »), marquant les précurseurs des cellules stromales au cours de leur développement, ainsi que du gène **c**) *etsrp* (pour « ETS1-related protein »), facteur de transcription exprimé par les cellules endothéliales. *Barre d'échelle* : 50 μ m. **B**) WISH révélant le profil d'expression du gène *pcdh18a* à différents stades du développement. tn : tube neural, n : notochorde. *Barre d'échelle* : 50 μ m. **a**) à 23 hpf, l'expression de *pcdh18a* est somitique, avec un renforcement dans la partie ventrale. Des cellules du tube neural sont aussi fortement marquées. **b**) A 26 hpf l'expression de *pcdh18a* se restreint au niveau des précurseurs des cellules stromales en migration, les cellules du tube neural sont encore fortement marquées. **c**) A 36 hpf, les cellules stromales en développement/maturation expriment toujours *pcdh18a* à des niveaux élevés. Par contre, son expression est diminuée dans les cellules neurales. La comparaison de la WISH de *pcdh18a* avec celles de *pdgfra*, *cspg4* et *etsrp*, montre que l'expression de *pcdh18a* est uniquement détectée dans les cellules stromales et non au niveau des cellules endothéliales car le profil ne correspond pas à celui de *etsrp*. **d**) A 48 hpf, les cellules stromales n'expriment presque plus *pcdh18a* et son expression est fortement réduite dans le tube neural. **a-d**) L'expression de *pcdh18a* augmente progressivement au cours du temps dans la notochorde. **a'/b'/c'**) Observation à plus fort grossissement (objectif 40x) par microscopie VE-DIC où *pcdh18a* est exprimé dans les amas cellulaires ventraux à partir du somite S₅ à 23 hpf, par les progéniteurs des cellules stromales en migration à 26 hpf (flèches), ainsi que par les cellules stromales dans le THC à 36 hpf (flèches).

Le parallèle avec les profils d'expression à 36 hpf des gènes *pdgfra* et *cspg4*, exprimés par les précurseurs des cellules stromales lors de leur développement, et du gène *etsrp*, exprimé

par les cellules endothéliales, montre que l'expression de *pcdh18a* est uniquement détectée dans les cellules stromales et non dans les cellules endothéliales, puisque le système vasculaire n'est pas marqué par la sonde ciblant *pcdh18a* (**Figure 7-A/B**).

Au niveau protéique, *Pcdh18a* est détectée sur les cellules stromales en migration à 26 hpf (**Figure R8-A**), mais aussi à des niveaux plus élevés dans des cellules du tube neural (moëlle épinière), probablement des neurones de par leur morphologie, ce qui constitue un contrôle positif (**Figure R8-B**). Cela montre que le profil d'expression génique correspond au profil d'expression protéique et que *Pcdh18a* ne semble pas sujette à des régulations négatives post-traductionnelles. A ce jour, peu d'anticorps spécifiques des protéines du poisson zèbre sont disponibles mais il est possible de tester la spécificité des anticorps dirigés contre des protéines d'autres espèces, si le pourcentage de similitude est suffisant. Nous avons utilisé le seul anticorps commercial proposé, dirigé contre la partie cytoplasmique de PCDH18 humaine. L'efficacité de l'anticorps n'est pas parfaite mais cela nous a tout de même permis de détecter la protéine endogène après optimisation des conditions de l'expérience.

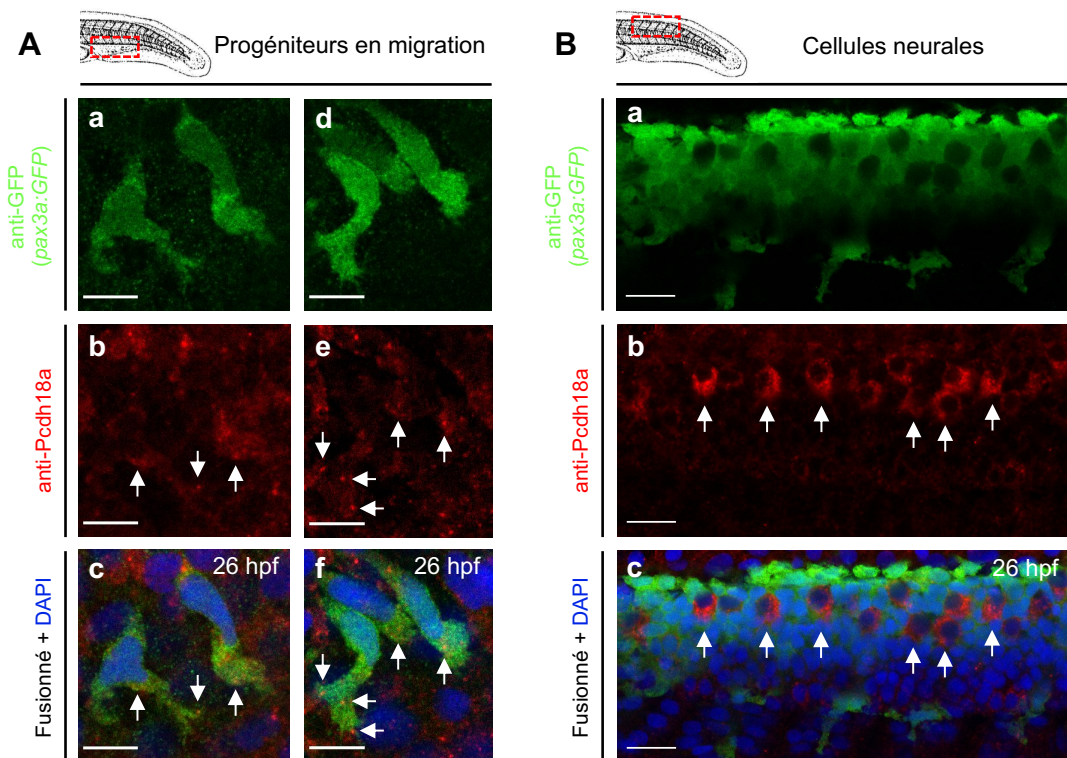


Figure R8 – Profil d'expression de *Pcdh18a* à 26 hpf

A/B) Détection immunohistochimique de la protéine *Pcdh18a* dans la lignée *Tg(pax3a:GFP)* à 26 hpf, imagée au microscope confocal. **A**) Projections de 3 plans, correspondant à 1,6 μm : *Pcdh18a* est exprimée par les progéniteurs des cellules stromales pendant leur migration (flèches). *Barre d'échelle* : 10 μm . **B**) Projection de 3 plans, correspondant à 1,6 μm : *Pcdh18a* est aussi fortement exprimée par des cellules du tube neural (flèches), ce qui confirme le profil d'expression observé par WISH. *Barre d'échelle* : 20 μm .

Chez les morphants Pcdh18a, la structure somitique est plus définie que chez les morphants Pcdh10b. La délimitation des somites est visible et la compartimentalisation est comparable à celle des embryons contrôles (**Figure R9-A**). Néanmoins, les cellules de la partie ventrale des somites délaminent et le tissu se sépare en plusieurs groupes de cellules distinctes, au lieu de former un amas unique (**Figure R9-Ac**). Les cellules progénitrices des morphants sont capables d'émerger (**Figure R9-Ad**) et de migrer ventralement jusqu'à leur destination finale (**Figure R9-B**). Lors de nos expériences préliminaires, la migration cellulaire semblait légèrement précoce chez les morphants, puisque pour des stades de développement identiques, il y avait plus de cellules chez les morphants par rapport aux contrôles (**Figure R9-B**). Cependant, bien qu'il y ait une tendance, ce phénotype n'a pas été confirmé par la suite.

Lors de la migration, les cellules des embryons injectés avec le MO pcdh18a présentent une morphologie particulière. Elles sont plus allongées et fines, avec de longues protrusions membranaires ramifiées, tandis que les cellules des contrôles ont des corps cellulaires plutôt ronds avec de courtes protrusions (**Figure R9-C**). Cela suggère que les cellules des morphants ont des défauts de modulation du cytosquelette d'actine-F. L'effet attendu du morpholino est effectivement d'empêcher Pcdh18a d'interagir avec l'actine, puisque la protéine est tronquée au niveau de sa partie cytoplasmique. De plus, lorsque la migration est terminée et que les cellules s'installent dans le THC, le nombre de cellules stromales est nettement diminué en condition morphant (moyenne de 52 cellules) par rapport aux contrôles (moyenne de 111,5 cellules), (**Figure R9-D**). Ces expériences montrent que la perturbation de l'intégrité de Pcdh18a a des effets plutôt tardifs sur le développement des cellules stromales. Les progéniteurs semblent spécifiés au sein du somite mais ne sont pas capables de fournir le nombre normal de cellules à des stades plus avancés.

Au vu des résultats obtenus, Pcdh18a semble être une cible prometteuse pour notre étude. Les phénotypes observés chez les morphants étayaient l'idée que Pcdh18a est impliquée dans le développement des cellules stromales. De plus, la manipulation génique est possible avec le morpholino, probablement car la protéine est impliquée dans des étapes plus tardives du développement que Pcdh10b. Notre projet s'est donc focalisé sur Pcdh18a.

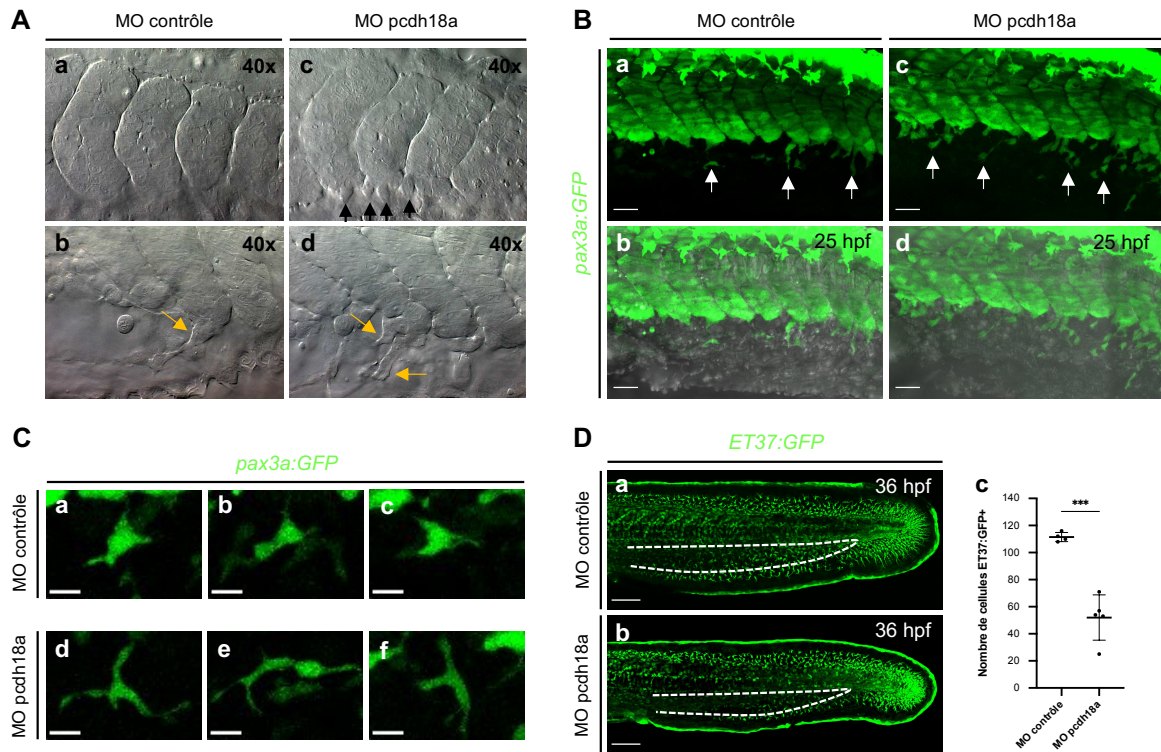


Figure R9 – Effets phénotypiques du morpholino *pcdh18a*

A) Microscopie VE-DIC d'embryons injectés avec le MO contrôle ou 4 ng de MO *pcdh18a* à 22 hpf (**a/c**) et à 24 hpf (**b/d**). Chez les morphants, la partie ventrale des somites délamine et se compartimente en plusieurs structures (flèches noires) tandis que les contrôles ont une structure lisse. Les progéniteurs des cellules stromales peuvent émerger en condition morphant (flèches orange) d'une manière plutôt comparable aux contrôles. **B)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* à 25 hpf, d'embryons Tg(*pax3a:GFP*) injectés avec le MO contrôle ou 4 ng de MO *pcdh18a*. **b/d**) Superposition avec le canal fond clair. Barre d'échelle : 30 μ m. Chez les morphants, les cellules peuvent encore migrer ventralement (flèches blanches). La migration cellulaire est légèrement avancée chez les morphants par rapport aux contrôles. **C)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo*, extraites de time-lapses, d'embryons Tg(*pax3a:GFP*) injectés avec le MO contrôle ou 4 ng de MO *pcdh18a*. Cellules uniques en cours de migration. Les cellules des morphants présentent des protrusions plus longues, plus fines et plus ramifiées que les cellules des contrôles, qui ont des corps cellulaires plutôt ronds. Barre d'échelle : 10 μ m. **D)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* à 36 hpf, d'embryons Tg(*ET37:GFP*) injectés avec le MO contrôle ou 4 ng de MO *pcdh18a*. Barre d'échelle : 100 μ m. **D-c)** Comptage du nombre de cellules stromales ET37:GFP+ dans tout le THC (zone pointillée) de 4 embryons MO contrôle et 5 embryons MO *pcdh18a*. Le test de Student indique une diminution hautement significative du nombre de cellules stromales dans le THC à 36 hpf des embryons morphants (moyenne de 52 cellules) par rapport aux contrôles (moyenne de 111,5 cellules), ($p=0,0002$).

2. Rôle de Pcdh18a dans le développement des cellules stromales

2.1. Trajectoires cellulaires et vitesses de migration

L'un des premiers phénotypes observés avec l'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ était le changement de morphologie cellulaire lors de la migration, indiquant que la protéine y joue probablement un rôle majeur. Nous avons souhaité, dans un premier temps, étudier cette migration plus en profondeur afin de découvrir les régulations mises en jeu. Afin de suivre les cellules en migration et étudier leurs trajectoires, nous avons croisé la lignée Tg(*pax3a:GFP*) avec la lignée Tg(*TCF:nls-mCherry*), rapporteur de la voie Wnt, qui marque les noyaux des cellules des somites. Cela permet de pointer le centre des cellules et d'ajouter de la précision à l'analyse.

Les sessions d'imagerie confocale time-lapse sont commencées à 23-24 hpf, au rythme d'une acquisition toutes les 10 minutes. Cet espacement de 10 minutes entre les prises permet d'imager en parallèle sous le même microscope deux embryons contrôles et deux embryons morphants dans les mêmes conditions, au sein d'une même expérience. Les cellules sont suivies pendant 6 heures après leur émergence, de 24 hpf à 30 hpf (**Figure R10-Aa/b/d/e**). Elles sont traquées grâce au plugin « manual tracking » de Fiji et les trajectoires sont représentées grâce à un script Python. Il permet de rapporter à une origine commune (0, 0) les coordonnées du t_0 d'émergence, puis de retracer l'ensemble des coordonnées (x, y) des trajectoires au cours du temps. Nous avons choisi de tracer la migration de 5 cellules par embryon (**Figure R10-Ac/f**). Issus de trois expériences indépendantes, nous avons donc imagé six embryons par condition. L'analyse se fait alors sur 30 cellules par condition au total. La représentation globale de l'ensemble des trajectoires permet de montrer que les cellules des morphants migrent moins loin et de façon moins rectiligne que les cellules des contrôles (**Figure R10-Ba**). Ceci a été quantifié en mesurant la distance effective parcourue par la cellule et la longueur de sa trajectoire. Le ratio permet de savoir si la trajectoire est plutôt rectiligne (proche de 1) ou plutôt aléatoire (proche de 0). Les cellules des morphants ont des trajectoires significativement moins rectilignes (ratio de 0,43) que celles des contrôles (ratio de 0,5), (**Figure R10-Bb**).

Grâce au plugin, nous avons aussi accès à la vitesse des cellules, qui correspond à la distance parcourue en un temps donné. Il est possible de suivre la dynamique de migration au cours du temps et de la séparer en différentes phases (**Figure R10-Ca**). Chez les contrôles, les cellules migrent rapidement juste après émergence (aux alentours de 0,005 $\mu\text{m/s}$) puis la vitesse

décroit pour atteindre un minimum après une heure et demie de migration (0,003 $\mu\text{m/s}$). Nous appellerons cette phase « précoce » car elle correspond aux premiers instants où la cellule migre ventralement de façon linéaire. Lors de la phase que nous appellerons « décisionnelle », plutôt courte, la cellule peut soit choisir de rester à l'endroit où elle se trouve pour participer au développement de la niche, soit reprendre sa migration pour aller se loger dans un autre endroit du THC ou devenir une cellule mésenchymateuse de la nageoire.

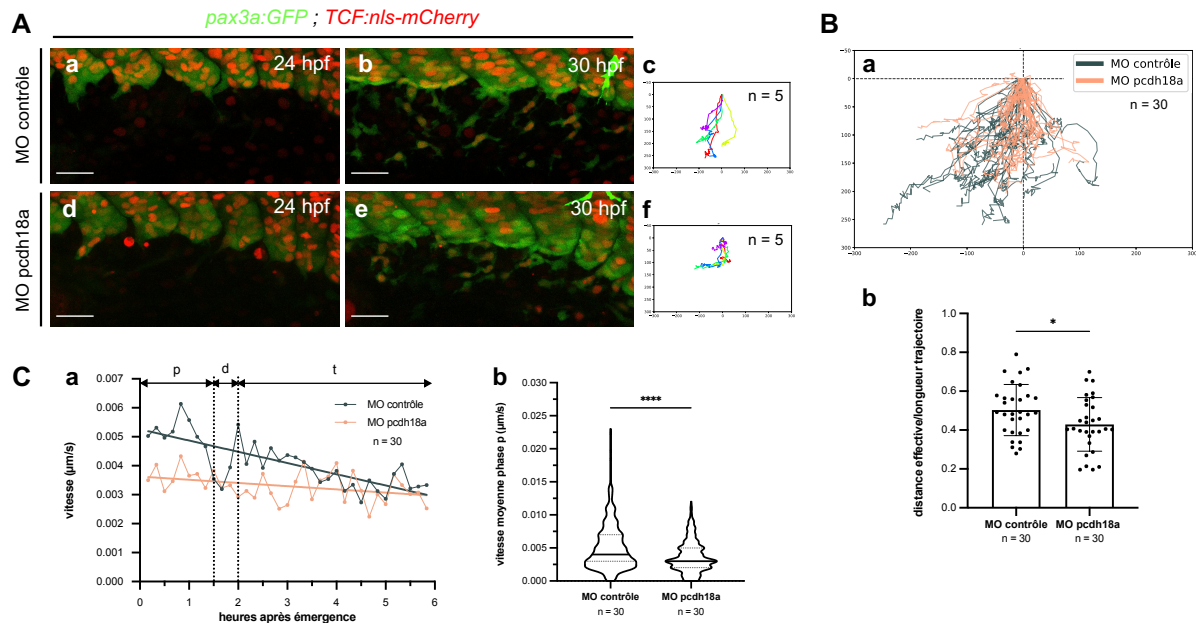


Figure R10 – Pcdh18a- ΔCP_{106} affecte le comportement des cellules stromales lors de leur migration

A) Suivi de la migration cellulaire sur les 6 premières heures après émergence des progéniteurs des cellules stromales (24-30 hpf). **a/b/d/e)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo*, provenant de time-lapses. Embryons $Tg(pax3a:GFP ; TCF:nls-mCherry)$ injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Extraction des acquisitions à 24 hpf (**a/d**) et 30 hpf (**b/e**). Barre d'échelle : 30 μm . **c/f)** Suivi des trajectoires de 5 cellules par embryon grâce au plugin « manual tracking » de Fiji, toutes les 10 minutes pendant 6 heures. Après obtention des fichiers .csv, un script Python est utilisé pour rapporter l'ensemble des trajectoires au point d'origine (0, 0) et retracer les coordonnées x et y pour chacune des cellules au cours du temps [script obtenu grâce à une collaboration avec le hub d'analyse d'images de l'Institut Pasteur]. **B-a)** Graphique représentant l'ensemble des trajectoires cellulaires pour les embryons contrôles ou morphants. Les données proviennent de trois expériences indépendantes où deux embryons par condition ont été imagés à chaque fois, donc 6 embryons par condition. Suivi de 5 cellules par embryons (n = 30 pour chaque condition). Les cellules des morphants migrent moins loin et de façon moins linéaire que les cellules des contrôles. **B-b)** Quantification de la linéarité des trajectoires cellulaires. Pour chaque cellule la distance effective parcourue a été mesurée, ainsi que la longueur de la trajectoire réelle. Le rapport permet d'évaluer la persistance de migration : des valeurs proches de 1 traduisent une migration rectiligne et des valeurs proches de 0 une migration plus aléatoire. Le test de Student indique que les cellules des morphants ont des trajectoires significativement moins rectilignes que les cellules des contrôles, avec des ratios respectifs de 0,43 et 0,5 ($p = 0,0378$). **C-a)** Vitesse moyenne des cellules au cours du temps. Un point représente la valeur moyenne de la vitesse des 30 cellules à un moment donné. Les cellules des contrôles ont tendance à migrer rapidement après leur émergence puis à ralentir progressivement, tandis que les cellules des morphants ont une vitesse plutôt faible et constante au cours du temps. p : phase précoce, d : phase décisionnelle et t : phase tardive **C-b)** Diagramme en violon représentant les vitesses moyennes des cellules lors des 90 premières minutes de migration (phase précoce). Le test de Mann-Whitney indique que les progéniteurs des cellules stromales migrent significativement moins vite chez les morphants (médiane de 0,003 $\mu\text{m/s}$) que chez les contrôles (médiane de 0,004 $\mu\text{m/s}$), ($p < 0,0001$).

Cette phase de migration dite « tardive » commence environ deux heures après émergence et dure dans le temps. Chez les morphants, ces phases sont absentes. La vitesse de départ est plus faible (0,0035 $\mu\text{m/s}$), et plutôt constante au cours du temps. Les pics de vitesse ou l'arrêt des cellules sont moins définis (**Figure R10-Ca**). La quantification de la vitesse moyenne lors de la phase p montre bien que les cellules des morphants migrent significativement moins vite que celles des contrôles (valeurs médianes respectives de 0,003 et 0,004 $\mu\text{m/s}$), (**Figure R10-Cb**).

Ces expériences nous ont convaincus que Pcdh18a joue bien un rôle important dans la migration des cellules stromales. De plus, chez les morphants, la présence de protrusions membranaires longues et ramifiées laissait présumer des dérégulations au niveau du cytosquelette d'actine. Nous avons alors souhaité analyser les conséquences de l'altération de Pcdh18a sur la dynamique de l'actine et la distribution des structures membranaires.

2.2. Dynamique de l'actine au cours de la migration cellulaire

2.2.1. Distribution et taille des filopodes

Pour étudier la dynamique de l'actine *in vivo*, nous avons utilisé le croisement de deux lignées décrit précédemment, pour obtenir des embryons Tg(*cspg4:Gal4* ; *UAS:Lifeact-GFP*). Les expériences ont été réalisées en triplicatas indépendants et à chaque fois, quatre embryons par condition ont été imagés en time-lapse. A partir des projections maximales des time-lapses, les cellules individuelles, les plus isolées possibles, qui sont en fait les cellules meneuses des chaînettes de migration, sont suivies toutes les 10 minutes pendant 90 minutes afin d'analyser leur comportement migratoire durant la phase précoce de migration que nous avons définie précédemment (cf. **Figure R10-Ca**), (**Figure R11-A**).

Les séquences time-lapses nous permettent d'avoir accès à la direction de la migration en prenant comme référence de départ le centre de la cellule à t_0 et comme point d'arrivée le centre de la cellule à t_{10} . Il est alors possible d'obtenir un angle brut de direction de migration par rapport à l'orientation de l'image. Avec le plugin « Filopodyan » de Fiji, les filopodes sont détectés de manière semi-automatique, et l'analyse nous procure la taille et l'angle brut d'orientation du filopode (également par rapport à l'orientation de l'image), (**Figure R11-Ba**).

L'utilisation d'un script permet de normaliser les valeurs angulaires brutes, afin d'obtenir des valeurs relatives de l'angle du filopode par rapport à la direction de la migration. Seules les valeurs absolues des angles ont été retenues, ce qui explique un intervalle allant de

0° à 180°, qui ne différencie pas la gauche et la droite (**Figure R11-Bb**). Plus les angles relatifs sont proches de 0° et plus le filopode est dirigé dans le sens de la migration ; des angles relatifs proches de 180° signifient que le filopode est dirigé en sens inverse.

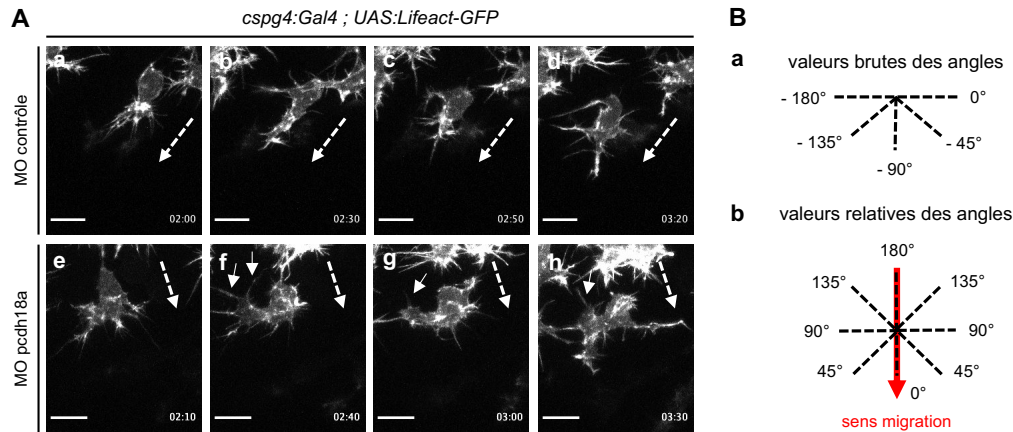


Figure R11 – Détection des filopodes et normalisation

A) Projections maximales d’acquisitions confocales *in vivo* en time-lapse (24 – 40 hpf), d’embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:Lifeact-GFP*) injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Cellules isolées où l’actine est marquée. Barre d’échelle : 10 μ m. La cellule est suivie pendant 90 minutes de migration, correspondant à 10 acquisitions. L’angle brut de migration correspond au vecteur partant du point de départ de la migration et allant au point d’arrivée (flèche blanche pointillée). L’utilisation du plugin « Filopodyan » de Fiji permet de détecter les filopodes de la cellule de façon semi-automatique. Ce plugin donne accès à l’angle brut de direction des filopodes par rapport au corps cellulaire et à la taille des filopodes. Visuellement, les filopodes des cellules contrôles semblent orientés dans le sens de la migration, tandis que les morphants présentent des filopodes opposés au sens de la migration (flèches). **B**) Le plugin fournit les valeurs brutes des angles des filopodes (**a**). Or, bien que la cellule migre globalement en direction ventrale, elle s’écarte souvent de cette direction moyenne, selon un angle de migration qui est propre à chaque cellule et à chaque instant. L’utilisation d’un script Python [obtenu grâce à une collaboration avec le hub d’analyse d’images de l’Institut Pasteur] permet de normaliser. Grâce aux angles bruts des filopodes et à l’angle brut de migration au même instant, il est possible d’obtenir les angles relatifs des filopodes, qui correspondent à l’orientation des filopodes par rapport à la direction de migration (**b**).

Après analyse de dix cellules par condition, provenant de time-lapses *in vivo*, issues de trois expériences indépendantes, les résultats obtenus permettent une analyse statistique. Les histogrammes circulaires, ou diagrammes en rose, permettent de représenter les fréquences d’apparition des angles des filopodes. Pour cette représentation, l’ensemble des filopodes de chaque cellule, détectés à chaque temps, est pris en compte (**Figure R12-A**). Le modèle linéaire à effets mixtes, qui permet d’ajouter une variable aléatoire afin de supprimer l’effet de répétition des mesures pour une même cellule, montre que les filopodes des cellules des morphants ont en moyenne des angles plus grands de 14,9° par rapport aux cellules des contrôles, ce qui est significatif.

Les cellules présentent le même nombre de filopodes (en moyenne 11,1) dans les deux conditions (**Figure R12-Ba**). Par contre, si l’on considère que les filopodes avec des angles

compris entre 0° et 40° sont dirigés vers l'avant et les filopodes avec des angles compris entre 140° et 180° sont dirigés vers l'arrière, il y a des différences entre les deux groupes.

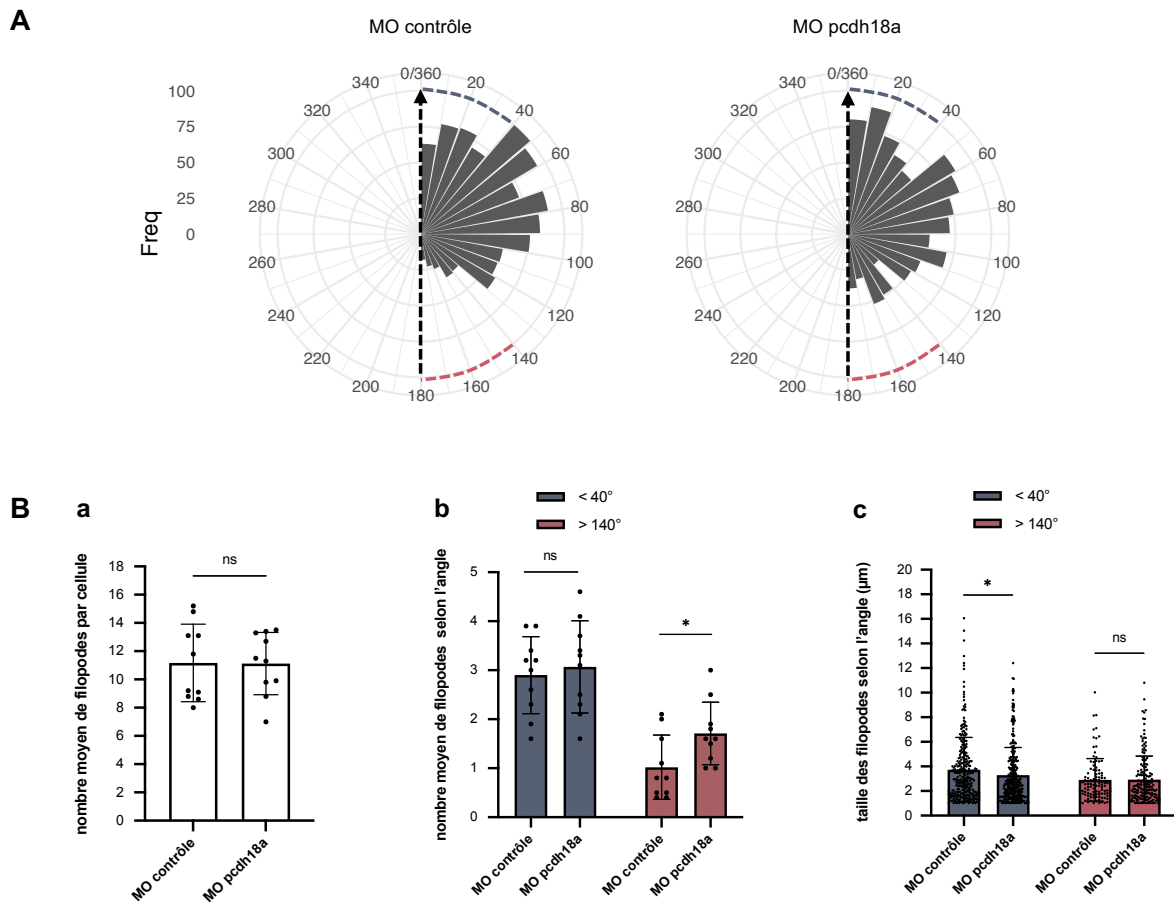


Figure R12 – Pcdh18a-ΔCP₁₀₆ modifie l'orientation et la taille des filopodes

Analyses statistiques sur l'ensemble des filopodes détectés lors de la migration des cellules stromales entre 24 et 27 hpf. Les embryons ont été injectés avec le MO contrôle ou avec le MO pcdh18a. Les échantillons proviennent de trois expériences indépendantes, réalisées dans les mêmes conditions. Analyse de 10 cellules par condition, suivies sur 10 temps, afin d'avoir une tendance moyenne lors de la migration précoce. **A**) Histogramme circulaire sous forme de diagramme en rose [obtenu grâce à une collaboration avec le hub de bio-statistiques de l'Institut Pasteur]. L'axe des abscisses représente les valeurs d'angles relatifs, qui ont été regroupés par dizaine, allant de 0° à 180° et l'axe des ordonnées représente les fréquences d'apparition des angles (0, 25, 50, 75 et 100). Le modèle linéaire à effets mixtes montre que les angles relatifs des filopodes sont en moyenne plus grands de 14,9° chez les morphants par rapport aux contrôles, ce qui est significatif ($p = 0,0041$). Les filopodes ayant des angles relatifs allant de 0° à 40° sont considérés comme étant dans le sens de la migration (pointillés bleus) et les filopodes ayant des angles relatifs allant de 140° à 180° sont considérés comme étant en sens inverse de la migration (pointillés rouges). Flèche noire : direction de la migration. **B-a**) Le test de Student indique que le nombre moyen de filopodes par cellule est similaire dans les deux conditions, avec 11,17 filopodes pour les contrôles et 11,12 filopodes pour les morphants ($p = 0,9647$). **B-b**) Nombre de filopodes dirigés dans le sens (0°-40°) ou en sens inverse (140°-180°) de la migration, en condition contrôle ou morphant. Les tests de Student indiquent qu'il y a le même nombre de filopodes dirigés vers l'avant chez les contrôles et les morphants, avec respectivement 2,9 et 3,07 filopodes ($p = 0,6666$), mais que les morphants possèdent un nombre plus élevé de filopodes dirigés en sens inverse, avec 1,71 filopodes contre 1,02 filopodes pour les contrôles ($p = 0,0284$). **B-c**) Taille des filopodes dirigés dans le sens (0°-40°) ou en sens inverse (140°-180°) de la migration, en condition contrôle ou morphant. Les tests de Mann-Whitney indiquent que les filopodes dirigés dans le sens de la migration sont significativement plus longs chez les contrôles (3,73 µm) par rapport aux morphants (3,29 µm), ($p = 0,0247$) mais que les filopodes dirigés en sens inverse de la migration ont une taille similaire, respectivement 2,91 µm et 2,92 µm, ($p = 0,5190$).

En moyenne, il y a le même nombre de filopodes dirigés vers l'avant dans les deux conditions (proche de 3 filopodes), tandis qu'il y a plus de filopodes dirigés vers l'arrière chez les morphants (moyenne de 1,71) par rapport aux contrôles (moyenne de 1,02), (**Figure R12-Bb**). Ceci est visible sur le diagramme en rose avec des fréquences équivalentes pour les angles compris entre 0° et 40°, mais des fréquences plus élevées chez les morphants par rapport aux contrôles pour les angles compris entre 140° et 180° (**Figure R12-A**). Aussi, les cellules des contrôles ont des filopodes à l'avant plus longs que ceux des morphants, avec des moyennes respectives de 3,73 μm et 3,29 μm , tandis que la taille des filopodes à l'arrière est similaire dans les deux conditions (**Figure R12-Bc**).

Ces résultats montrent que les cellules qui expriment *Pcdh18a- ΔCP_{106}* ont tendance à avoir des filopodes orientés de manière plus aléatoire que chez les contrôles, qui présentent eux de longs filopodes orientés dans le sens de la migration. Cela peut expliquer la vitesse réduite des cellules des morphants, qui ont du mal à connaître leur chemin et aller de l'avant. *Pcdh18a* est donc un acteur essentiel pour la mobilité cellulaire puisque la migration des cellules stromales est fortement affectée par son altération, indiquant qu'elles ne sont pas capables de combler son manque.

2.2.2. Mutation du domaine WIRS de *Pcdh18a*

Comme nous l'avons vu plus haut, la partie cytoplasmique des protocadhérines de la famille $\delta 2$ comporte un peptide baptisé WIRS par lequel ces protocadhérines peuvent se lier au complexe WAVE, et par là affecter la dynamique de l'actine. Afin d'étudier plus spécifiquement le rôle du peptide WIRS de *Pcdh18a* dans la dynamique de l'actine chez les cellules stromales en migration, nous avons construit une forme mutante comportant deux mutations ponctuelles (T977A/F978A) au niveau d'acides aminés conservés du domaine WIRS (**Figure R13-A**). Nous avons cloné la séquence codant la protéine entière, soit non mutée ou soit mutée, en aval de la séquence promotrice UAS, de manière à pouvoir la faire exprimer par nos cellules d'intérêt grâce au transgène *cspg4:Gal4*. La protéine *Pcdh18a*, mutée ou non, est fusionnée à la GFP en C-terminal (donc après sa partie cytoplasmique). La construction est de taille assez importante (environ 4700 pb) et, à la suite de l'injection dans les œufs fécondés, peu de cellules sont marquées au stade qui nous intéresse. Ceci est peut-être dû au fait que la probabilité d'insertion du transgène dans le génome diminue lorsque la taille de la construction à insérer augmente. Il est alors possible d'augmenter la concentration de plasmide injecté mais cela a une certaine limite, due à la toxicité. Lors des nombreux time-lapses réalisés, seules

quelques cellules GFP+ ont été identifiées comme étant exprimées par les cellules progénitrices au sein des somites.

Toutefois la tendance des résultats obtenus est intéressante. Dans l'expérience présentée, nous avons identifié trois cellules GFP+, localisées dans la partie ventrale des somites (**Figure R13-B**). La première cellule, qui tente d'émerger vers 23 hpf, entre immédiatement en apoptose. Elle est suivie de peu par la deuxième cellule, qui subit le même sort lorsqu'elle essaie de sortir du somite. Par contre, la troisième cellule n'émerge pas et reste au sein du somite pour s'allonger et devenir une fibre musculaire. Elle n'entre pas en apoptose alors qu'elle exprime à la même intensité que les autres la protéine mutante. Par ailleurs, suite à l'injection d'un transgène dans les embryons au stade une-cellule, il y a généralement un petit pourcentage d'expression ectopique. Nous avons identifié d'autres types cellulaires motiles qui entrent en apoptose lorsqu'ils expriment la construction, probablement des cellules hématopoïétiques, et d'autres type cellulaires immobiles de la notochorde qui n'entrent pas en apoptose. Cela suggère que seules les cellules qui ont besoin de mobilité entrent en apoptose, les cellules immobiles n'étant pas gênées par l'expression de la forme mutante. Bien que ce phénotype ne permette pas de suivre la cellule au cours de sa migration, il renforce nos résultats précédents indiquant que *Pcdh18a* est impliquée dans la mobilité cellulaire.

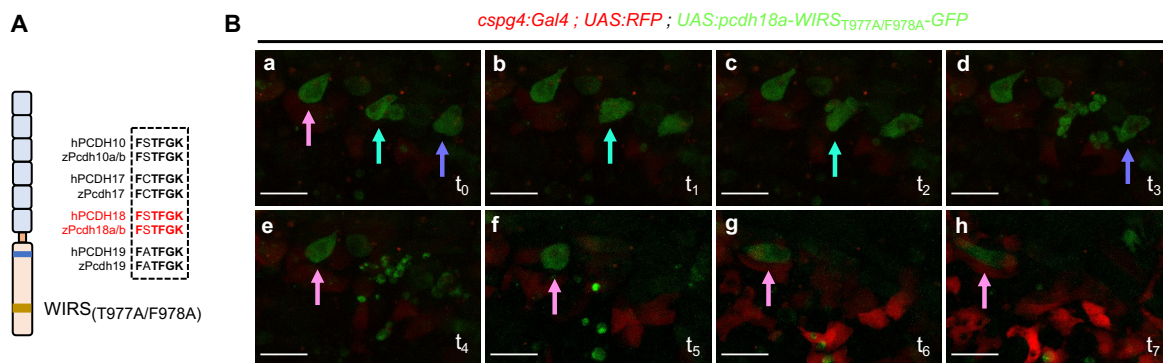


Figure R13 – La mutation du domaine WIRS de *Pcdh18a* induit l'apoptose

A) Le domaine WIRS est bien conservé entre les protocadhérintes $\delta 2$ chez différentes espèces. Afin d'étudier plus spécifiquement le rôle du domaine WIRS, nous l'avons muté à deux endroits : mutation de la Thréonine 977 en Alanine et mutation de la Phénylalanine 978 en Alanine. La séquence entière de *pcdh18a* est clonée en aval de la séquence activatrice UAS et fusionnée en C-terminal à la GFP, après la partie cytoplasmique. Le plasmide est injecté au stade une-cellule avec l'ARNm de la transposase Tol2. **B)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* en time-lapse, d'un embryon Tg(*cspg4:Gal4* ; *UAS:RFP*) injecté avec le plasmide (*UAS:pcdh18aWIRS^{T977A/F978A}-GFP*). Barre d'échelle : 20 μ m. **B-a)** A t_0 avant émergence vers 22 hpf, nous avons identifié trois cellules exprimant la construction et localisées dans les amas cellulaires ventraux des somites. **B-b/c)** A t_1 , la première cellule qui commence à émerger vers 23 hpf se condense et entre en apoptose au t_2 (flèche bleue). **B-d)** Pareillement à t_3 , la deuxième cellule entre en apoptose lorsqu'elle tente d'émerger, peu de temps après la première cellule (flèche violette). **B-e/h)** La dernière cellule, quant à elle, n'émerge pas et reste au sein du somite pour s'allonger progressivement et devenir une fibre musculaire. Bien qu'exprimant la construction, elle n'entre pas en apoptose (flèche rose).

Lors de l'ensemble de ces expériences, la partie extracellulaire de la protéine est encore présente. Les cellules sont alors toujours capables d'interagir entre elles grâce aux interactions homophiles de la protocadhérine. Les contacts intercellulaires étant primordiaux dans la migration semi-collective, nous avons alors entrepris d'étudier l'effet de la troncature de la partie cytoplasmique de Pcdh18a sur les interactions entre cellules.

2.3. Modulation des interactions entre cellules stromales

2.3.1. Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ favorise la rétention des contacts entre cellules

Lors de la migration cellulaire, les cellules établissent de nouveaux contacts avec leurs voisines via leurs filopodes. Grâce aux time-lapses où l'actine-F est marquée, il est possible de suivre ces interactions entre cellules au cours du temps et à plusieurs stades de la migration. Comme précédemment, nous nous sommes focalisés sur les cellules meneuses des chaînettes de migration. Au début de leur migration, chez les embryons contrôles, les cellules meneuses interagissent parfois, plutôt par contacts brefs. Il y a de la répulsion, c'est-à-dire que lorsqu'il y a contact, les filopodes ont tendance à changer de direction (**Figure R14-Aa-d**). L'intervalle de temps entre chaque acquisition d'images ne permet pas de connaître avec précision les temps d'interaction, mais en général, elles ne durent pas plus de 10 minutes puisque le contact est souvent rompu à l'acquisition suivante. En revanche chez les morphants, le contact qui s'établit via un filopode perdure (**Figure R14-Ae-h**) - il y a moins de répulsion - ce qui dévie la protrusion membranaire vers la droite et change la trajectoire cellulaire. Cela peut contribuer à expliquer notre observation précédente portant sur les cellules meneuses des morphants qui migrent de manière moins rectiligne que celles des contrôles. Les trajectoires des cellules contrôles sont moins influencées par les éléments avoisinants. Ces résultats montrent qu'il y a moins de répulsion entre les cellules meneuses exprimant Pcdh18a- Δ CP₁₀₆.

Les premières acquisitions d'images statiques des cellules en migration ont aussi révélé que chez les morphants, les cellules meneuses sont souvent reliées aux cellules suiveuses par des protrusions filiformes nettement plus longues – jusqu'à 30-40 μ m – que chez les contrôles (**Figure R14-B**). Des connexions filiformes de cette longueur sont rares chez les contrôles, et quand elles sont rencontrées, on constate que leur durée est nettement plus courte – la connexion se rompt plus rapidement.

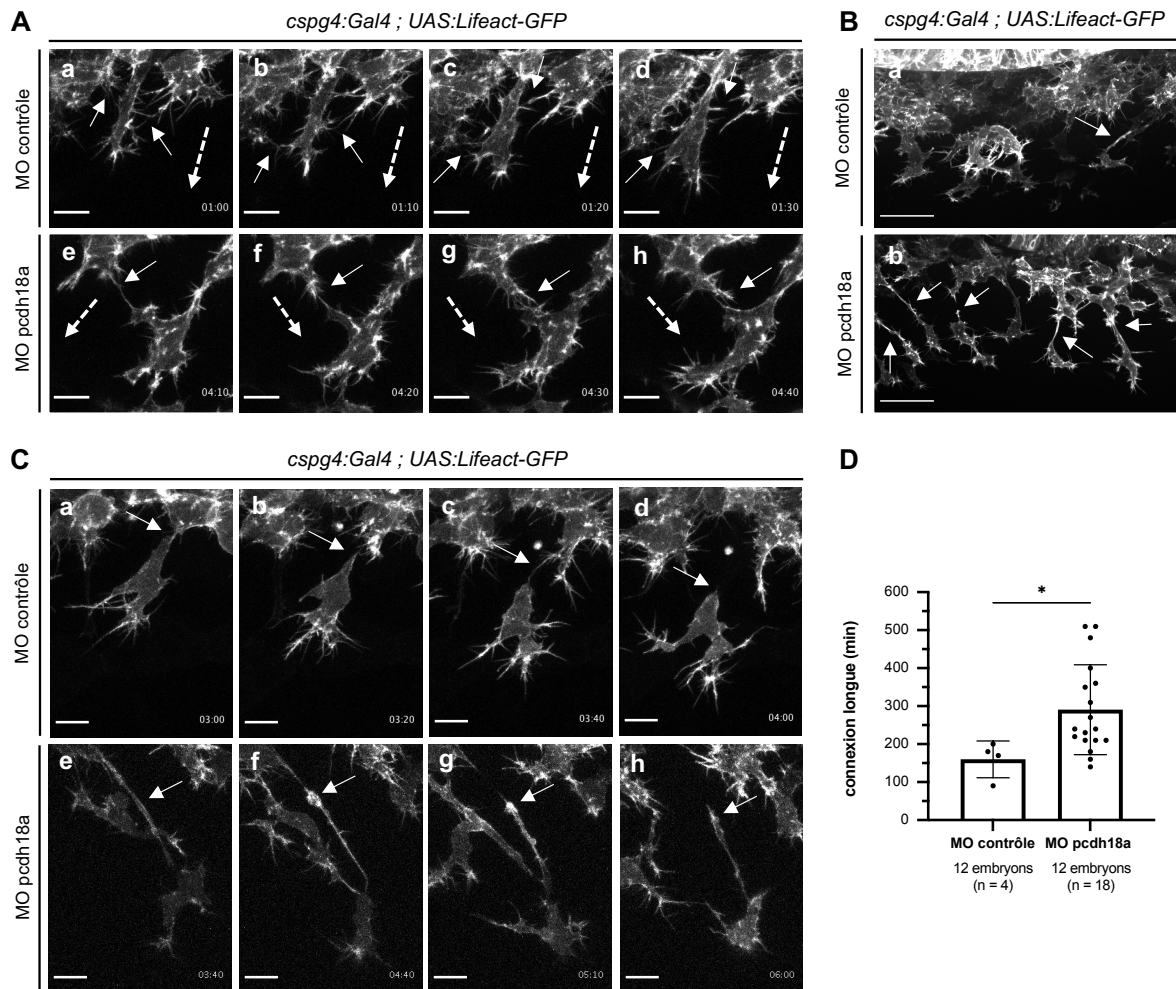


Figure R14 – Pcdh18a-ACP₁₀₆ favorise les contacts entre cellules stromales

A) Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* en time-lapse, d'embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:Lifeact-GFP*), injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Cellules en cours de migration. Barre d'échelle : 10 μ m. Les cellules des contrôles ont tendance à interagir avec leurs voisines par des contacts brefs via leurs filopodes (**a-d**), tandis que les filopodes des cellules des morphants ont tendance à avoir des contacts plus longs (**e-h**), ce qui peut attirer une protrusion membranaire de la cellule voisine (flèches). Les cellules migrent plus linéairement chez les contrôles (flèches pointillées), elles sont moins déviées par leurs voisines ce qui est le cas des cellules des morphants (flèches pointillées). **B)** Projections maximales d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant à 26 hpf. Barre d'échelle : 30 μ m. Les embryons morphants présentent des longues liaisons entre les cellules où l'actine est marquée fortement (flèches blanches). Chez les contrôles, les cellules ont tendance à être plus regroupées et proches, bien que ce genre de structure puisse être aussi retrouvé chez quelques cellules, mais de façon moins marquée. **C)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* en time-lapse (24 – 40 hpf), d'embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:Lifeact-GFP*) injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Cellules présentant des contacts par des projections de membrane à l'arrière. Barre d'échelle : 10 μ m. Tandis que chez les contrôles, la projection à l'arrière de la cellule se rétracte vite après perte du contact, les projections des morphants ont tendance à trainer plus longtemps vers l'arrière sans se rétracter (flèches blanches). **D)** Comptage du nombre de cellules présentant le phénotype de « connexion longue » et détermination des temps de contact chez 12 embryons pour chaque condition, issus de trois expériences indépendantes. Seules 4 cellules présentent le phénotype chez les contrôles tandis que 18 cellules ont été identifiées chez les morphants. Même si le nombre (n = 4) chez les contrôles est faible, le test de Mann-Whitney indique que les contacts sont significativement plus longs chez les morphants (en moyenne 4h50) que chez les contrôles (en moyenne 2h40), ($p = 0,0113$). Les valeurs extrêmes sont retrouvées uniquement chez les morphants.

Au total, sur douze embryons analysés par condition, issus de trois expériences d'imagerie time-lapse indépendantes, dix-huit cellules ont été trouvées chez les morphants avec ce phénotype de « connexion longue », et seulement quatre chez les contrôles. De plus, la durée moyenne de ce type de connexion était de 4h50 chez les morphants et 2h40 chez les contrôles (**Figure R14-D**). Les valeurs extrêmes de huit heures n'ont été trouvées que chez les morphants. Enfin, Les time-lapses montrent aussi que chez les contrôles, quand la connexion se rompt, la protrusion a tendance à se rétracter rapidement (**Figure R14-Ca-d**), alors que chez les morphants, la protrusion membranaire prend beaucoup plus de temps à se rétracter (**Figure R14-Ce-h**).

Ces résultats appuient le fait que les contacts sont plus forts lorsque Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée. Par ailleurs, la cellule semble moins capable de maintenir sa morphologie et de se remodeler après déformation, suggérant une dérégulation de la dynamique du cytosquelette d'actine-F. L'ensemble de ces résultats montrent que la partie cytoplasmique de Pcdh18a est importante pour la médiation des forces répulsives entre les cellules stromales, mais aussi pour réguler la dynamique du cytosquelette d'actine-F. Non seulement Pcdh18a est un acteur clé de la migration des progéniteurs, mais c'est aussi une protéine importante pour contrôler la dynamique des interactions entre ces cellules en migration.

2.3.2. *La rupture des contacts homophiles ne modifie pas le développement de la niche*

L'utilisation du morpholino Pcdh18a a finalement eu une action de renforcement des contacts entre les cellules stromales lors de leur migration. Afin d'étudier l'effet de la perte des interactions homophiles lors du développement du THC, nous avons utilisé la même approche que pour l'étude de Pcdh10b. Nous avons généré la forme mutante Pcdh18a- Δ CP-T-GFP, où les parties cytoplasmique (CP) et transmembranaire (T) sont remplacées par la protéine fluorescente GFP. Cette forme devrait donc être sécrétée, et agir de façon dominante négative en interférant avec les liaisons homophiles entre molécules de Pcdh18a endogènes. Le contrôle est constitué simplement de la protéine GFP avec le peptide signal de Pcdh18a en amont, que nous appelons GFPs pour « GFP sécrétée ». Ces deux constructions ont été clonées sous le promoteur *hsp70*, inductible par choc thermique (**Figure R15-A**).

Avant d'induire le choc thermique, quelques rares embryons sont légèrement GFP+ mais l'intensité est faible par rapport aux niveaux observés après induction de l'expression de la construction. La fuite du promoteur ne semble pas trop importante pour gêner l'expérience.

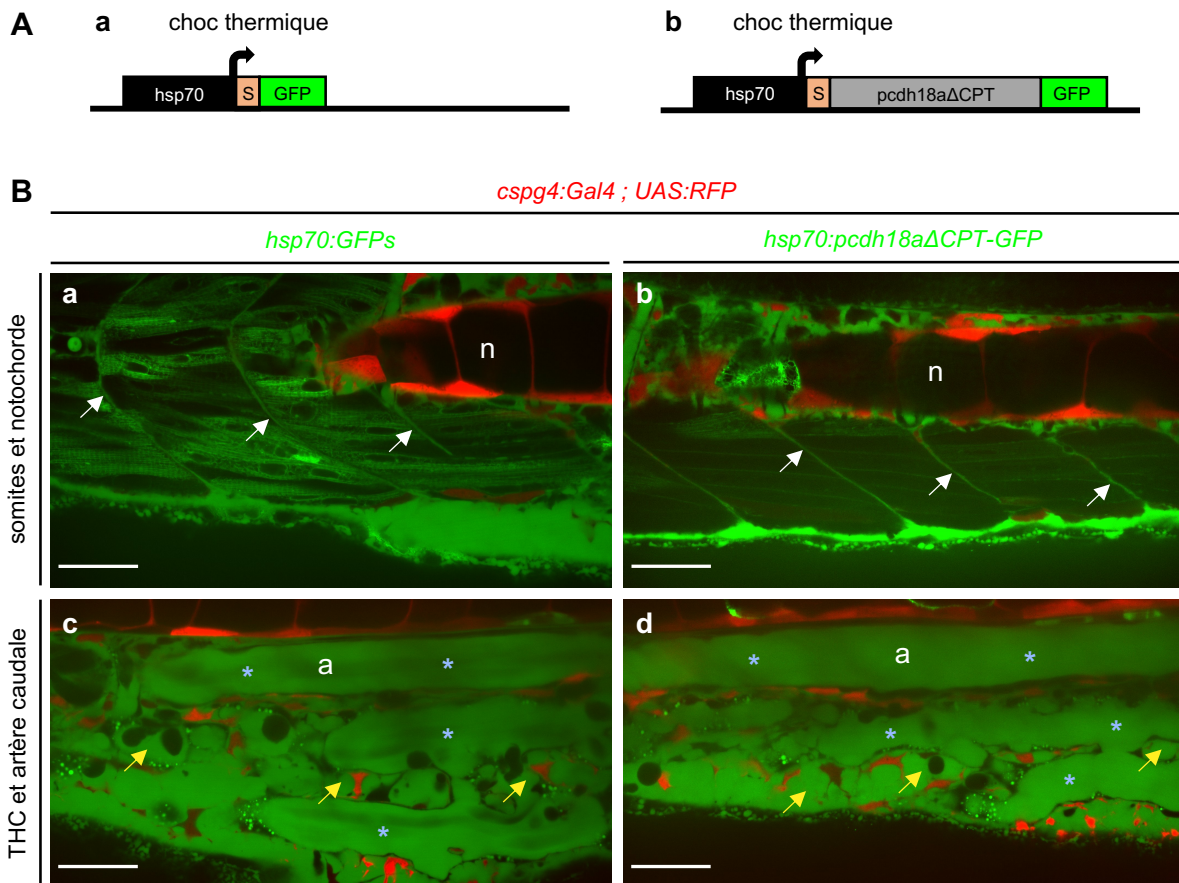


Figure R15 – La construction Pcdh18a-ΔCPT-GFP est sécrétée par les cellules

A) Clonage sous le promoteur *hsp70*, inducible par choc thermique, de la GFP seule (**a**), qui constitue le contrôle, ou de la partie extracellulaire de Pcdh18a, fusionnée à la GFP (**b**), appelée Pcdh18a-ΔCPT-GFP. Le peptide signal de Pcdh18a, permettant l'adressage à la membrane plasmique, est conservé pour Pcdh18a-ΔCPT-GFP et il est ajouté en amont de la GFP. Les constructions ont été réalisées par clonage Gibson et le choc thermique est induit par passage des embryons 30 minutes à 39°C. **B)** Plans uniques d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:RFP*) à 50 hpf, injectés avec le plasmide *hsp70:GFPs* (**a/c**) ou *hsp70:pcdh18a-ΔCPT-GFP* (**b/d**), ainsi que l'ARNm de la transposase. Choc thermique à 20 hpf. Barre d'échelle : 30 μm. **a/b)** Somites et notochorde (n) où l'on peut voir que les constructions GFP+ sont retrouvées dans l'espace inter-somitique (flèches blanches). **c/d)** Tissu hématopoïétique caudal et artère caudale (a) où l'on peut voir que les constructions GFP+ sont retrouvées dans l'espace interstitiel de la niche (flèches jaunes), mais aussi dans la circulation sanguine (astérisques bleus). Cela montre que les constructions sont sécrétées par les cellules.

La fluorescence commence à apparaître deux heures après le choc thermique et l'intensité augmente avec le temps. Le promoteur *hsp70* n'étant pas spécifique des cellules stromales, l'expression de la construction se fait alors par tous les types cellulaires de façon mosaïque. Nos acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant permettent de montrer que les constructions sont sécrétées par les cellules, aussi bien au niveau de l'espace interstitiel entre les cellules, que dans les vaisseaux sanguins. (**Figure R15-B**). L'intérieur de la plupart des cellules est GFP- tandis que l'espace extracellulaire est GFP+, ce qui montre que la sécrétion est efficace. Pour l'étude de la formation du plexus, le choc thermique est induit à 20 hpf et la

fluorescence est encore intense à 50 hpf, ce qui montre que la construction est stable dans le temps. Pour les contrôles GFPs, les embryons ont une fluorescence encore intense à 3 jpf, mais celle-ci décroît pour les embryons *Pcdh18a-ΔCPT-GFP* au même stade.

Néanmoins, l'injection de la forme dominante négative n'a pas permis d'induire de phénotype. Le nombre de cellules stromales est comparable à celui des contrôles et le plexus veineux caudal est normalement formé à 50 hpf (données non montrées). De plus, la morphologie des cellules stromales des embryons exprimant *Pcdh18a-ΔCPT-GFP* est similaire à celle des contrôles GFPs, et ce, chez tous les embryons observés (**Figure R16-A**). Enfin, nos données de PCRq (**Figure R16-B**) montrent qu'à 36 hpf, l'expression de *Pcdh18a-ΔCPT* n'induit pas de changement significatif d'expression de *Pcdh18a*, et que la fibronectine-1b est légèrement surexprimée (x 1,7), mais à des niveaux non comparables à ceux trouvés suite à l'injection du MO *pcdh18a* (voir plus loin, section 5.3).

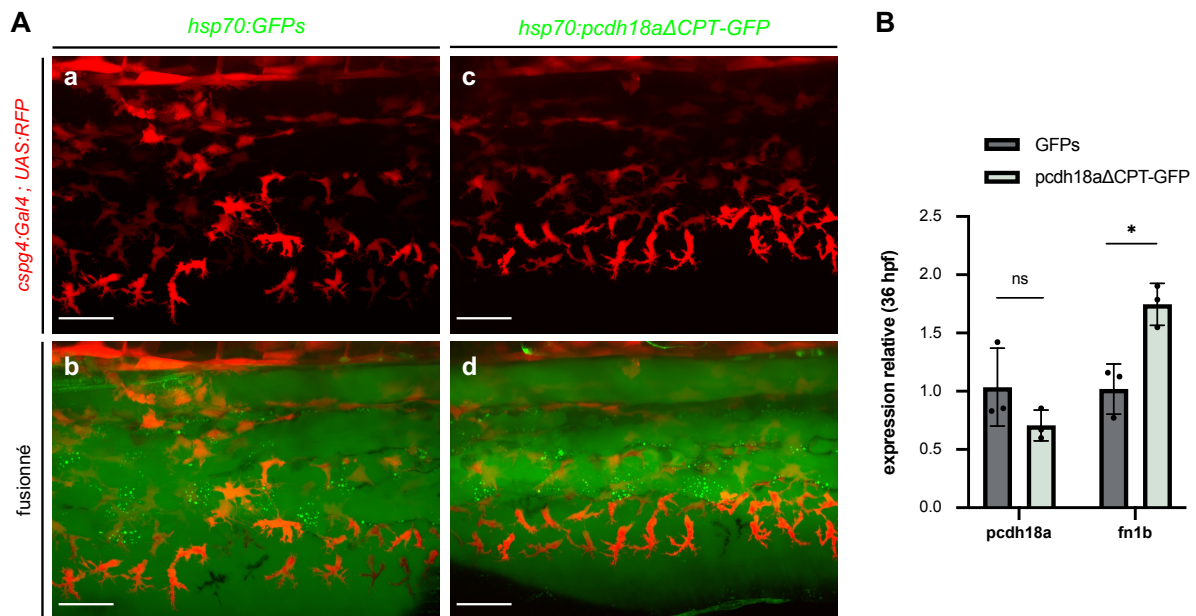


Figure R16 – *Pcdh18a-ΔCPT* n'a pas d'effet sur le développement des cellules stromales

A) Projections de 100 plans, d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons *Tg(cspg4:Gal4 ; UAS:RFP)* à 50 hpf, injectés avec le plasmide *hsp70:GFPs* (**a et b**) ou *hsp70:pcdh18a-ΔCPT-GFP* (**c et d**), ainsi que l'ARN de la transposase. Choc thermique à 20 hpf. Barre d'échelle : 30 μm. Le nombre et la morphologie des cellules stromales sont similaires dans les deux conditions. **B**) Données de PCRq mesurant l'expression relative à 36 hpf des gènes *pcdh18a* et *fn1b*, au niveau de la queue, en condition contrôle GFPs ou lorsque les embryons sont injectés avec *Pcdh18a-ΔCPT*, avec un choc thermique à 20 hpf. Le test de Student indique que l'expression de *pcdh18a* ne change pas significativement entre les deux conditions avec des moyennes de 1 et 0,7, ($p = 0,1896$). Le test de Student indique que l'expression de *fn1b* est plus élevée lorsque *Pcdh18a-ΔCPT* est exprimée, avec des moyennes de 1 et 1,7, ($p = 0,0109$).

Ces résultats suggèrent que l'injection de Pcdh18a- Δ CPT n'a pas d'effet sur la genèse des cellules stromales et sur le développement du THC. Cette observation concorde avec une étude portant sur le rôle de la protocadhérine 17 dans la formation des motoneurones, lors de la migration des axones. L'équipe n'a pas observé de défaut de migration et de développement lors de l'expression de Pcdh17- Δ CPT (Asakawa and Kawakami, 2018).

La rupture des interactions homophiles de Pcdh18a entre cellules stromales ne semble pas délétère pour la migration et la multiplication cellulaire, puisque le nombre de cellules stromales n'est pas diminué. C'est davantage la perte de la partie cytoplasmique et l'augmentation de l'adhésion cellulaire qui sont à l'origine des effets observés sur le développement des cellules stromales. Cela n'affecte pas non plus les interactions des cellules stromales avec les cellules endothéliales, qui utilisent probablement un autre mécanisme.

2.4. Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ affecte la production des cellules stromales

2.4.1. Effet de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ sur la cinétique d'apparition des cellules stromales

Lors des premières acquisitions d'embryons doubles transgéniques Tg(*ET37:GFP* ; *kdrl:ras-mCherry*), injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a, le nombre de cellules dérivées des progéniteurs des cellules stromales était fortement diminué à 50 hpf chez les morphants (**Figure R17-A**). Ce phénotype était reproductible et évident dans toutes les expériences réalisées. En revanche, à 26 hpf les embryons morphants ne sont pas distinguables à l'œil car le nombre de précurseurs qui émergent des somites ne semble pas différent des contrôles. La différence entre les deux conditions se fait sentir à partir de 36 hpf, et devient évidente à 50 hpf. Nous avons donc entrepris d'examiner de plus près la cinétique d'apparition des cellules dérivées des progéniteurs des cellules stromales, afin de déterminer le facteur à l'origine de cette diminution du nombre de cellules au cours du temps.

Nous avons imagé six embryons par conditions, contrôles ou morphants, à différents stades (26, 36 et 50 hpf) et compté le nombre de cellules dérivées des progéniteurs des cellules stromales au sein du THC, en englobant les cellules stromales du THC et les cellules mésenchymateuses de la nageoire (CMN), car elles ont la même origine somitique (**Figure R17-B**). Les acquisitions ont été faites avec les mêmes paramètres sur un champ qui correspond à environ cinq-six somites.

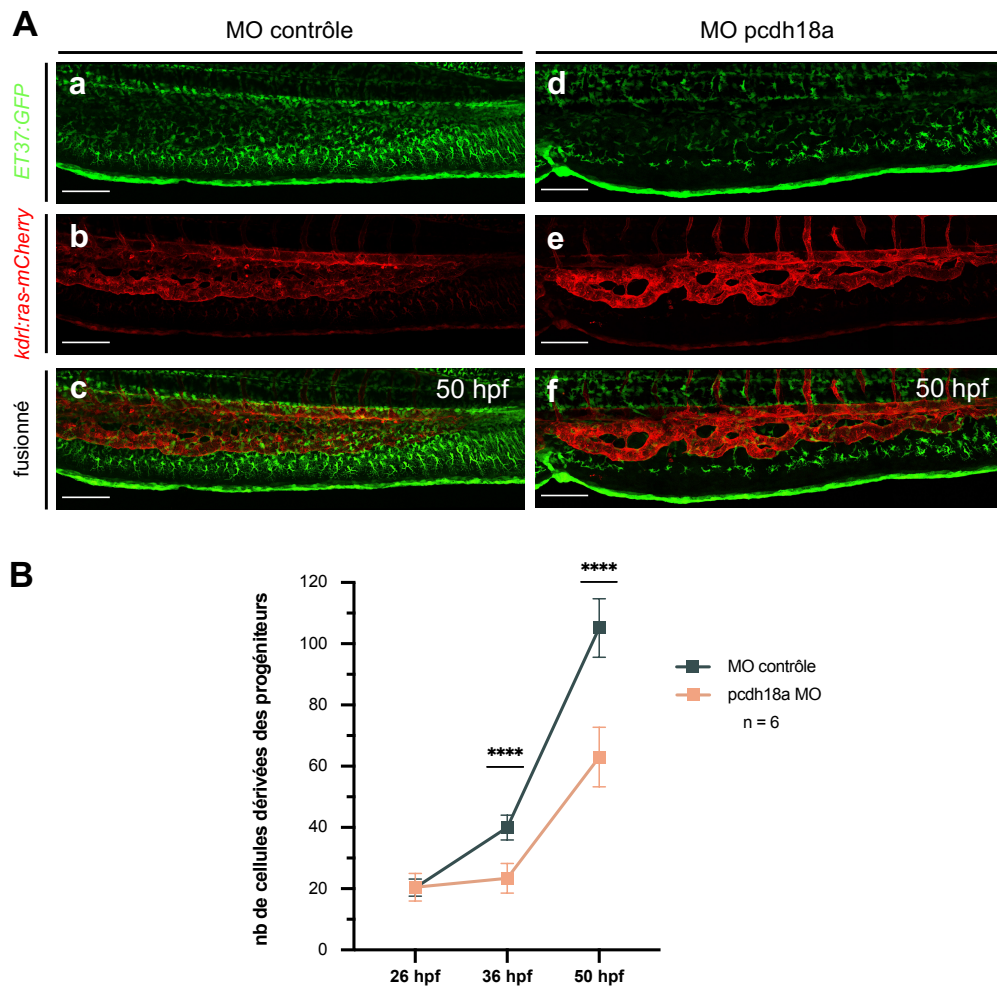


Figure R17 – Pcdh18a-ACP₁₀₆ provoque une diminution du nombre de cellules stromales

A) Projections maximales d’acquisitions confocales *in vivo* en tile scan, d’embryons Tg(*ET37:GFP* ; *kdrl:ras-mCherry*) à 50 hpf, injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Barre d’échelle : 100 μ m. **a/d)** canal *ET37:GFP* : réduction notable du nombre de cellules GFP+ avec un changement de morphologie cellulaire chez les morphants. **b/e)** canal *kdrl:ras-mCherry* : vue globale de la malformation du plexus caudal chez les morphants. **c/f)** fusion des deux canaux. **B)** Cinétique d’apparition des cellules dérivées des progéniteurs des cellules stromales, comprenant les cellules stromales du THC et les cellules mésenchymateuses de la nageoire, qui ont la même origine somitique. Comptage du nombre de cellules GFP+ chez 6 embryons par condition et par stade de développement, à partir d’acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant. Le champ est d’environ 5 à 6 somites. Le nombre moyen de cellules à 26 hpf est le même pour les deux conditions (20,5 cellules). A 36 hpf, le test de Student indique qu’il y a une diminution hautement significative du nombre de cellules chez les morphants (moyenne de 23,4 cellules) par rapport aux contrôles (moyenne de 40,5 cellules), ($p < 0,0001$). A 50 hpf, le test de Student indique qu’il y a aussi une diminution hautement significative du nombre de cellules chez les morphants (moyenne de 63 cellules) par rapport aux contrôles (moyenne de 105,2 cellules), ($p < 0,0001$).

A 26 hpf, la quantité de cellules émergeant des somites est la même pour les deux conditions, avec une moyenne de 20,5 cellules. Par contre à 36 hpf, il y a significativement moins de cellules chez les morphants par rapport aux contrôles (avec des moyennes respectives de 23,4 et 40,5 cellules). Cette différence est aussi fortement marquée à 50 hpf (avec des moyennes respectives de 63 et 105,2 cellules), soit une diminution de 40% de la quantité de

cellules dérivées des progéniteurs des cellules stromales chez les morphants. A priori deux facteurs pourraient en être la cause : une augmentation du taux d'apoptose, ou bien, une diminution du taux de division cellulaire. A première vue, nous n'avons pas détecté la présence d'un grand nombre de corps apoptotiques chez les morphants. Nous avons alors tenté de quantifier le nombre de divisions cellulaires.

2.4.2. Effet de *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* sur le taux de division cellulaire

Afin d'étudier les taux de division cellulaire, nous avons dans un premier temps réalisé des immunohistochimies à différents stades du développement, contre PH3 (pour « Phospho-Histone 3 »), marquant la phase de mitose du cycle cellulaire, et contre PCNA (pour « Proliferating Cell Nuclear Antigen »), marquant la phase S du cycle cellulaire (réplication du génome). Bien que ces expériences aient marché, elles ne nous ont pas permis d'évaluer avec précision d'éventuelles différences de taux de division cellulaire entre les deux conditions. En effet, au plus une, voire deux cellules marquées pouvaient être retrouvées dans un embryon au niveau du THC, mais dans la plupart des cas il n'y en avait pas. Les progéniteurs du tube neural représentent un bon contrôle positif puisque leur taux de division est élevé et beaucoup de cellules y sont effectivement marquées. Nous en avons conclu que les cellules stromales devaient avoir des taux de divisions trop faibles pour nous permettre de capter un nombre suffisant d'évènements avec cette méthode, afin de réaliser des analyses statistiques.

Nous avons finalement étudié ce paramètre par une analyse de séquences d'imagerie time-lapse. L'intervalle de temps entre chaque acquisition est de 10 minutes, ce qui est suffisant pour capter les évènements de division cellulaire, où l'on peut voir à t_0 la cellule avant division, à t_1 la cellule en cours de division (avec une morphologie ronde) et à t_2 les deux cellules filles issues de la mitose (**Figure R18-Aabc/Babc**). Nous avons utilisé des acquisitions d'embryons *Tg(pax3a:GFP ; TCF:nls-mCherry)*, allant de 24 à 36 hpf, pour étudier les taux de division cellulaire pendant la phase de migration (**Figure R18-A**) et des acquisitions d'embryons *Tg(ET37:GFP)*, allant de 36 à 46 hpf, pour étudier les taux de division cellulaire à des stades plus tardifs (**Figure R18-B**). Pour chaque expérience et chaque condition, nous avons compté le nombre de mitoses dans le THC de six embryons, et divisé par le nombre d'heures d'analyse, afin d'obtenir un nombre de divisions cellulaires par heure (**Figure R18-Ade/Bd**). Les comptages indiquent que ce nombre est similaire entre les contrôles et les morphants aux stades précoces, entre 24 et 36 hpf (**Figure R18-Ad/e**). Il ne permet donc pas d'expliquer l'accroissement nettement plus faible du nombre de cellules durant cette période chez les morphants (**Figure**

R17-B). De même, à partir de 36 hpf, où les cellules stromales sont déjà presque deux fois plus nombreuses chez les embryons contrôles (**Figure R17-B**), le nombre de divisions cellulaires observées par heure est également environ deux fois plus élevé que chez les morphants, ce qui indique que le taux de division par cellule est similaire (**Figure R18-Bd**) et cela est en accord avec le fait qu'à 50 hpf, les cellules stromales demeurent environ deux fois plus nombreuses que chez les morphants (**Figure R17-B**).

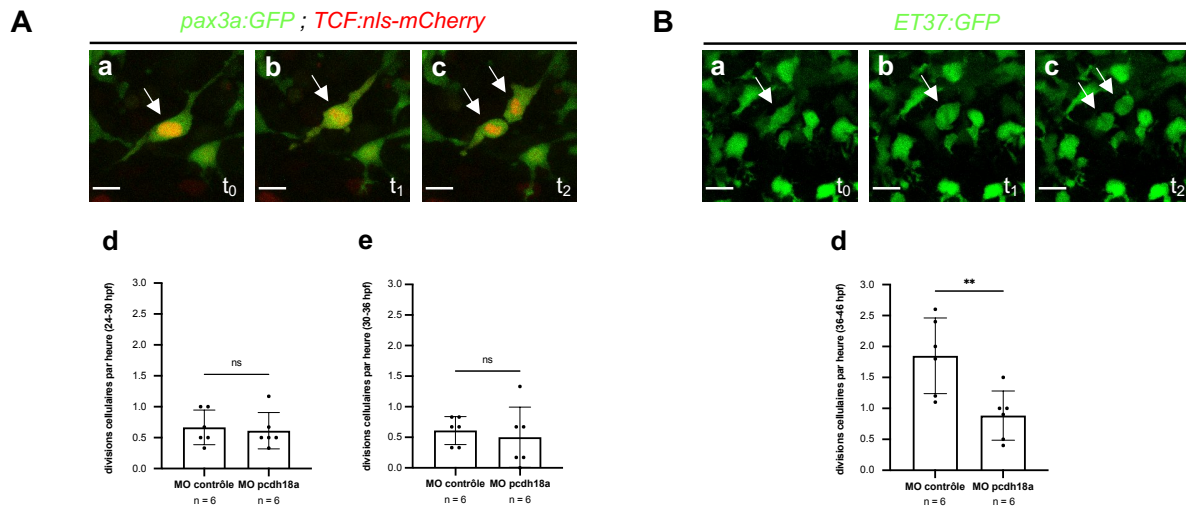


Figure R18 – Taux de division cellulaire lors de la migration et de la maturation des progéniteurs des cellules stromales

A/B) Acquisitions confocales *in vivo* time-lapse d'embryons Tg(*pax3a:GFP* ; *TCF:nls-mCherry*) ou d'embryons Tg(*ET37:GFP*), n = 6 embryons par expérience et par condition, issus de trois expériences indépendantes. Embryons imagés toutes les 10 minutes, ce qui est suffisant pour capturer les événements de division cellulaire : t₀ avant division (**a**), t₁ pendant la division (**b**), t₂ cellules filles après division (**c**). Barre d'échelle : 10 μm. Comptage du nombre de divisions cellulaires au cours de 6 heures (24-30 hpf et 30-36 hpf) ou de 10 heures (36-46 hpf) et établissement d'un ratio du nombre de divisions par heure, en condition contrôle ou morphant. **Ad)** Le test de Student indique que les taux de division cellulaire sont similaires pour les contrôles (moyenne de 0,67 division/heure) et les morphants (moyenne de 0,61 division/heure) entre 24 et 30 hpf, ($p = 0,7467$). **Ae)** Le test de Student indique que les taux de division cellulaire sont similaires pour les contrôles (moyenne de 0,61 division/heure) et les morphants (moyenne de 0,5 division/heure) entre 30 et 36 hpf, ($p = 0,6357$). **Bd)** Le test de Student indique que les morphants présentent moins de divisions cellulaires (moyenne de 0,88 division/heure) par rapport aux contrôles (moyenne de 1,86 division/heure) entre 36 et 46 hpf, ($p = 0,0088$).

Nous n'avons donc toujours pas d'explication claire pour la quasi-absence d'augmentation du nombre de cellules stromales chez les morphants durant la phase initiale de leur développement (24-36 hpf). Cependant, nous pouvons remarquer que chez les contrôles, durant cette phase, nous n'avons détecté qu'environ 7 mitoses en 12 heures parmi les progéniteurs des cellules stromales (sur une largeur de 5 somites), alors que nous avons compté en moyenne 20 cellules supplémentaires entre 26 et 36 hpf (également sur une largeur de 5 somites). Cela laisse supposer que la plus grande part de l'accroissement du nombre de cellules

GFP+ entre 26 et 36 hpf n'est pas due à des mitoses de cellules GFP+ déjà présentes à 26 hpf, mais à l'apparition de nouvelles cellules GFP+, sans doute émergées plus récemment des somites. S'il en est bien ainsi, le très faible accroissement du nombre de cellules GFP+ durant cette période chez les morphants signifierait simplement que l'émergence de nouvelles cellules GFP+ depuis les somites cesse plus tôt chez les morphants. Elle serait quasi-terminée dès 26 hpf, alors qu'elle continuerait chez les contrôles. C'est un point qu'il nous faudra examiner de plus près dans le futur.

Il est possible que cette diminution du nombre de cellules stromales, n'étant plus assez nombreuses pour accomplir leur fonction, soit à l'origine, du moins en partie, de la malformation du plexus caudal constatée chez morphants (voir plus loin, section 3.2).

3. Implication de Pcdh18a dans le développement du tissu hématopoïétique caudal

Le tissu hématopoïétique caudal est composé des cellules stromales mais également des cellules endothéliales constituant les vaisseaux. Ces deux types cellulaires interagissent transitoirement lors de la migration des cellules stromales, mais présentent des interactions plus fortes et durables lorsque le tissu se développe. Lors de sa maturation, il subit d'importants remaniements morphogénétiques très dynamiques, où chaque type cellulaire joue un rôle clé.

3.1. Développement du plexus veineux caudal

Avant le début de la migration des cellules stromales, le plexus veineux caudal n'est pas encore formé (**Figure R19-Aa**). La veine caudale primitive va subir des remaniements intenses entre 24 et 36 hpf avec une angiogenèse très dynamique, qui conduisent à la formation du plexus veineux caudal (**Figure R19-Ab**). Dans ce processus, des cellules endothéliales connectées à la partie ventrale de la veine primitive migrent à partir de 24 hpf et s'accolent au cours du temps avec les cellules voisines, afin de former les nouveaux segments vasculaires qui vont constituer le plexus veineux (**Figure R19-B**). A partir de 36 hpf, ce processus est encore assez dynamique mais il représente davantage une maturation du plexus.

La surface externe de la veine caudale primitive sert de matrice pour la migration initiale des précurseurs des cellules stromales, qui avancent progressivement sur ses parois (**Figure R20-Aab/Ba**). Durant cette première phase de migration, les cellules stromales ont donc une migration principalement 2D, à laquelle s'ajoutent sans doute des interactions 3D avec la matrice extracellulaire environnante (**Figure R20-Ca/b**). Lorsqu'elles atteignent le bord ventral de la veine primitive, elles continuent leur migration en direction ventrale, en interagissant et co-migrant maintenant en 3D (**Figure R20-Ca/c**) avec les cellules endothéliales qui vont former le plexus veineux, puis la veine caudale définitive (**Figure R20-Ba/Ac**). Les cellules stromales interagissent avec ces cellules endothéliales, soit en accompagnant leurs projections membranaires par un contact étendu, soit en contribuant sans doute au maintien des structures vasculaires nouvellement formées par des contacts plus ponctuels (**Figure R20-Bd**).

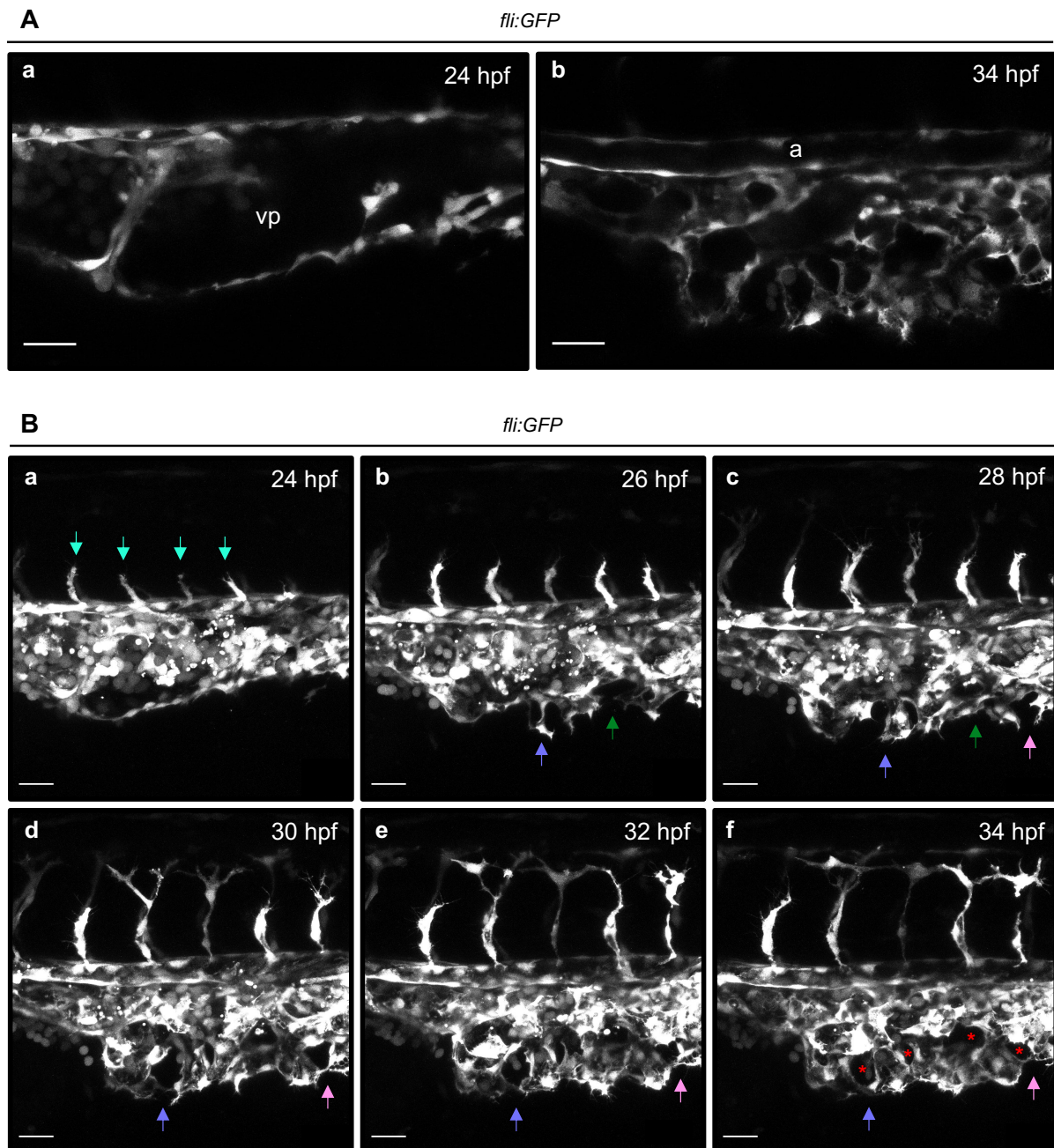


Figure R19 – Formation du plexus veineux caudal

Acquisitions confocales *in vivo* provenant d'un time-lapse d'un embryon Tg(*fli:GFP*), imagé toutes les 6 minutes pendant 10 heures (24 à 34 hpf). **A**) Extractions de plans uniques médiaux à 24 hpf (**a**) et à 34 hpf (**b**), pour visualiser l'intérieur des vaisseaux. La veine caudale primitive présente à 24 hpf évolue en un réseau vasculaire, le plexus veineux caudal, formé à 34 hpf. vp : veine primitive, a : artère caudale. Barre d'échelle : 30 μ m. **B**) Projections maximales toutes les deux heures, allant de 24 hpf (**a**) jusqu'à 34 hpf (**f**). **B-a**) A 24 hpf, seuls les vaisseaux intersegmentaires, partant de l'aorte, commencent à se former dorsalement (flèches bleues). **B-b,f**) A 26 hpf, les cellules endothéliales de la partie ventrale de la veine primitive migrent et s'accolent progressivement pour former un nouveau vaisseau (les flèches de différentes couleurs pointent un événement de formation de structures). **B-f**) à 34 hpf, les boucles du plexus sont visibles (astérisques rouges). Barre d'échelle : 30 μ m.

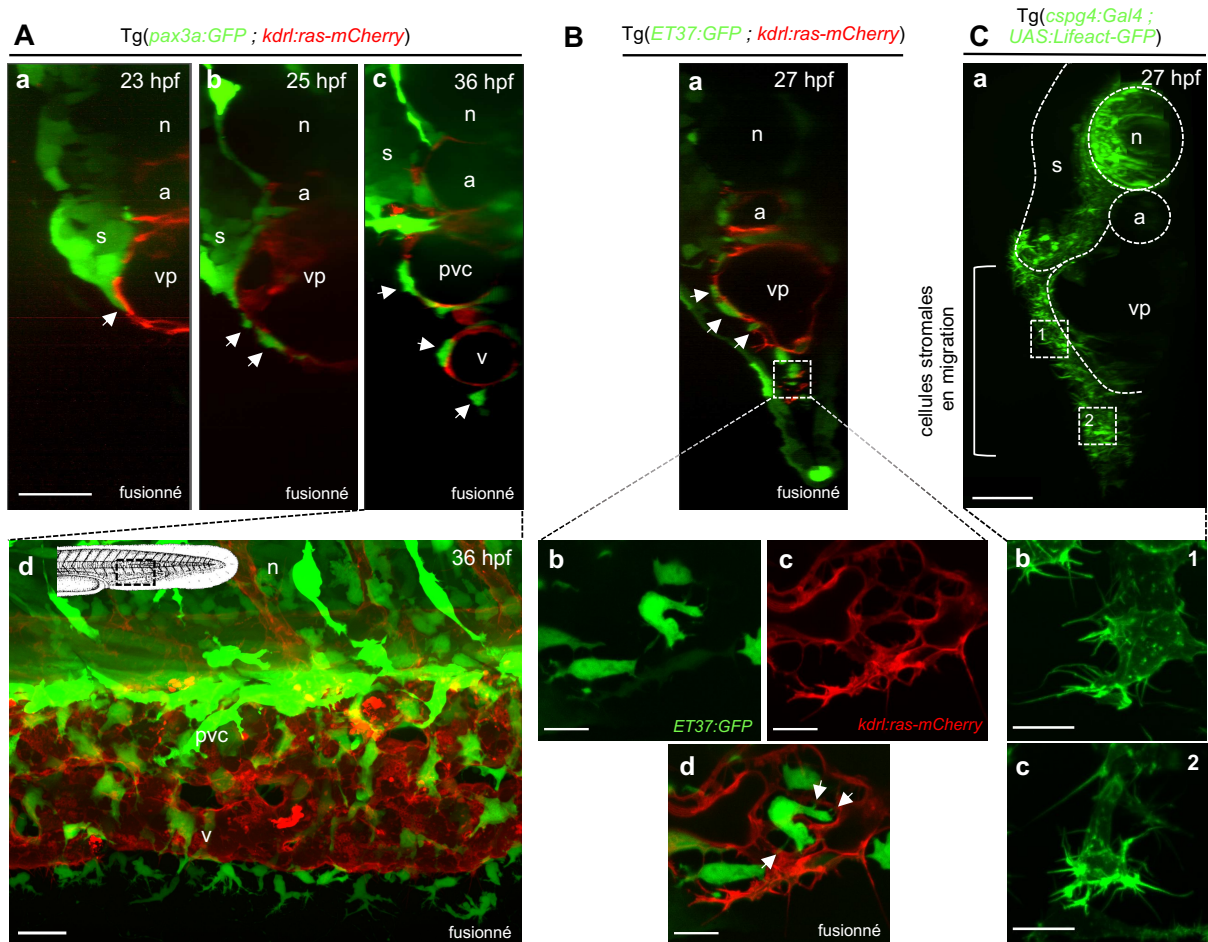


Figure R20 – Interactions entre cellules stromales et cellules endothéliales

A-a/b/c) Coupes optiques transverses d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant d'embryons Tg(*pax3a:GFP* ; *kdr:Ras-mCherry*) à 23, 25 ou 36 hpf réalisées grâce au logiciel Imaris. **(a)** A 23 hpf, la cellule progénitrice qui émerge du somite est en contact étendu avec la paroi endothéliale de la veine primitive (flèche) ; **(b)** à 25 hpf, les futures cellules stromales migrent en chaînette sur la paroi de la veine primitive (flèches). **(c)** A 36 hpf, la veine caudale définitive est en cours de formation et les cellules stromales sont présentes autour des structures vasculaires (flèches). n : notochorde, a : artère caudale, s : somite, vp : veine primitive, pvc : plexus veineux caudal, v : veine caudale définitive. Barre d'échelle : 30 μ m. **A-d)** Projection maximale de l'acquisition à 36 hpf en vue latérale. Le plexus veineux caudal est encore en remaniement car la veine caudale définitive n'est pas délimitée à tous les endroits. Barre d'échelle : 20 μ m. **B-a)** Coupe optique transverse d'une acquisition *in vivo* au confocal à disque tournant d'un embryon Tg(*ET37:GFP* ; *kdr:Ras-mCherry*) à 27 hpf, réalisée grâce au logiciel Imaris. Au cours de leur migration, les précurseurs des cellules stromales migrent ventralement sur les cellules endothéliales constituant la paroi de la veine primitive (flèches) et vont jouer un rôle dans formation de la future veine caudale définitive (encadré pointillé). n : notochorde, a : artère caudale, vp : veine primitive. **B-b/c/d)** Acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant d'un embryon Tg(*ET37:GFP* ; *kdr:Ras-mCherry*) à 27 hpf. Projections de 3 plans, correspondant à 0,6 μ m. Barre d'échelle : 10 μ m. Les cellules stromales participent aux remaniements du plexus veineux en interagissant avec les cellules endothéliales soit par contact extensif de leurs filopodes, soit en contribuant au maintien des structures endothéliales nouvellement formées (flèches). **C-a)** Coupe optique transverse d'une acquisition *in vivo* au confocal à disque tournant d'un embryon Tg(*cspg4:Gal4* ; *UAS:Lifeact-GFP*) à 27 hpf, réalisée grâce au logiciel Imaris. Au niveau de la veine primitive, il semble que les cellules stromales ont un mode de migration plutôt en 2D avec quelques interactions en 3D avec les éléments de la matrice extracellulaire, tandis que les cellules qui ont dépassé la veine primitive migrent plutôt en 3D. Barre d'échelle : 30 μ m. **C-b/c)** Projections latérales de cellules en migration soit sur la veine primitive avec une morphologie plane, étalée et avec des filopodes dirigés vers l'avant **(b)**, soit ventralement à la veine primitive avec une morphologie présentant un corps cellulaire fin et des filopodes dirigés dans toutes les directions **(c)**. Barre d'échelle : 10 μ m.

3.2. Altération de l'angiogenèse et de la morphologie du plexus par l'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆

Durant la formation du plexus veineux caudal chez les embryons contrôles, les cellules endothéliales interagissent transitoirement avec les cellules stromales au cours de leur migration, ce qui semble diriger leur migration, qui paraît se faire autour des cellules stromales, et favoriser la rencontre de cellules endothéliales adjacentes (**Figure R21-Aa-d**). Par contre, les embryons morphants Pcdh18a présentent moins d'interactions entre les deux types cellulaires et nous pouvons observer des cellules endothéliales en migration qui n'entrent pas en contact avec les cellules stromales (**Figure R21-Ae-h**). De plus, les embryons contrôles ont une répartition plutôt dispersée de leurs cellules stromales, tandis que ces cellules semblent davantage regroupées chez les morphants Pcdh18a (**Figure R21-A**), ce qui résulte sans doute du manque d'inhibition de contact que nous avons observé durant la migration des cellules stromales meneuses (cf. **Figure R14-A**).

Lors de cette angiogenèse, les cellules endothéliales présentent beaucoup de filopodes assez longs, permettant aux cellules d'interagir entre elles. Les cellules entrent en contact bref, s'accolent progressivement et se remodelent pour former un nouveau vaisseau. De façon surprenante, les cellules endothéliales des embryons morphants Pcdh18a ne présentent pas, ou du moins peu de filopodes à 34 hpf, moment du développement où l'angiogenèse est normalement encore très active (**Figure R21-B**).

L'imagerie time-lapse sur 20 heures (34 – 54 hpf) permet de suivre l'évolution des structures au cours du temps (**Figure R21-C**). Le plexus chez les morphants Pcdh18a présente des segments vasculaires plus larges et un moindre degré de ramification. L'angiogenèse semble se terminer plus rapidement que chez les contrôles puisqu'en 20 heures la structure reste quasi-inchangée. Chez les contrôles, le plexus s'affine au cours du temps et la veine définitive est formée à 54 hpf. Chez les morphants, la maturation du plexus est retardée et ce n'est qu'aux deux dernières heures du time-lapse (52-54 hpf), que le dernier segment vasculaire se forme mais en partant vers le haut, au lieu de s'accoler au groupe de cellules endothéliales sur la gauche (flèche verte, **Figure R21-Ce-h**). De plus, lorsque les cellules endothéliales se touchent, la formation du vaisseau est presque instantanée, tandis qu'elle est progressive chez les contrôles. Ces résultats montrent que l'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ par les cellules stromales modifie le comportement des cellules endothéliales et la morphologie résultante du plexus.

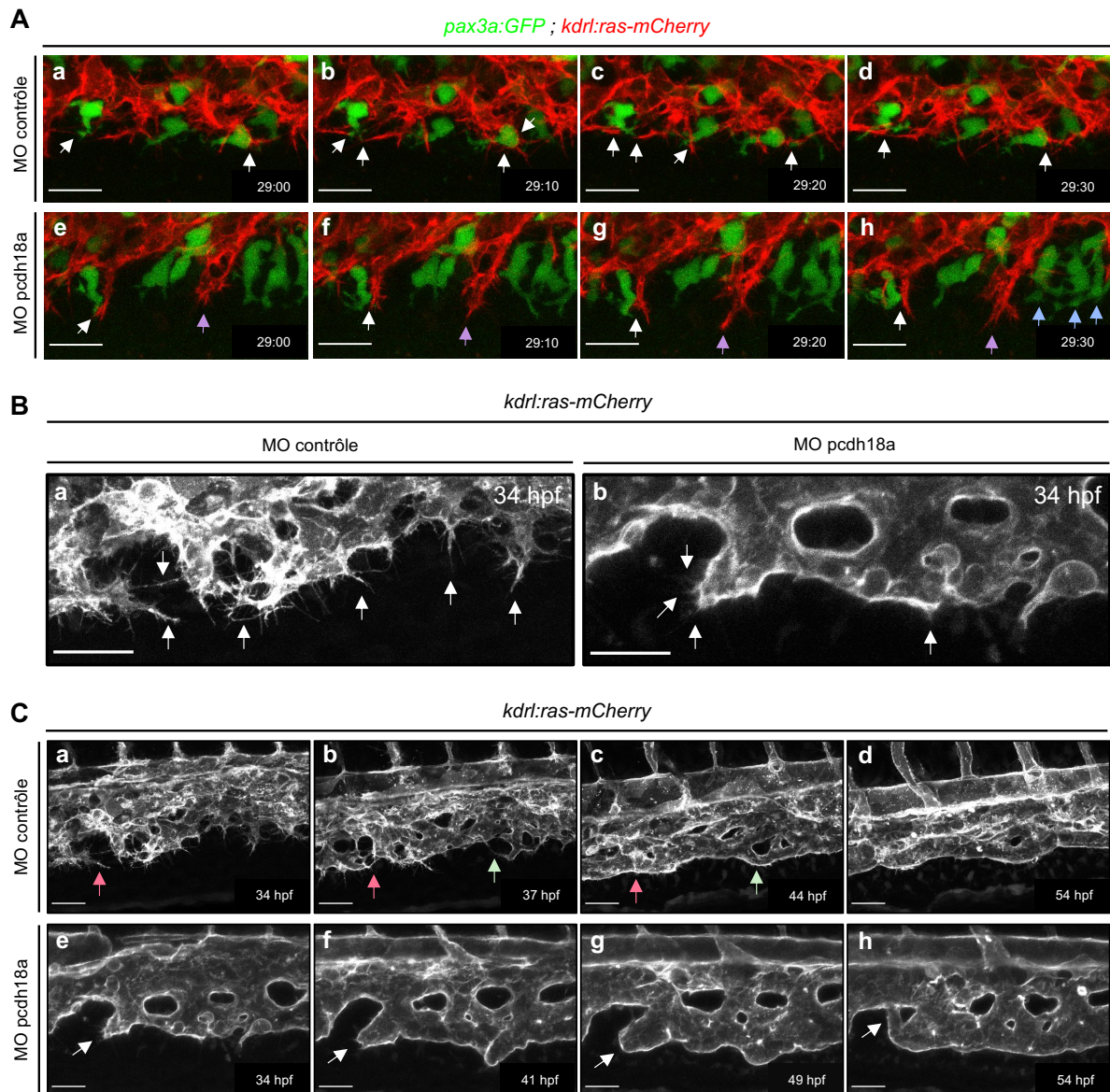


Figure R21 – Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ altère la formation du plexus veineux caudal

A) Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* en time-lapse d'embryons Tg(*pax3a:GFP*; *kdr1:ras-mCherry*), imagés toutes les 10 minutes pendant 10 heures (26 à 36 hpf), acquisitions extraites entre 29 et 29.5 hpf. Embryons injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. *Barre d'échelle* : 20 μ m. Lors de l'angiogenèse des embryons contrôles, les cellules endothéliales interagissent de façon dynamique avec les cellules stromales via leurs filopodes (flèches blanches) puis, lorsque deux cellules endothéliales se rencontrent, il y a rapprochement et accolement, ce qui permet la formation de structures vasculaires à l'origine des futurs vaisseaux. Chez les embryons morphants Pcdh18a, un groupe de cellules endothéliales n'interagit pas du tout avec les cellules stromales (flèches violettes) et les cellules stromales semblent regroupées (flèches bleues), tandis qu'elles sont plus dispersées chez les contrôles. **B et C)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* en time-lapse d'embryons Tg(*kdr1:ras-mCherry*), imagés toutes les 10 minutes pendant 20 heures (34 à 54 hpf). Embryons injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. **B)** Zoom pour visualiser les filopodes des cellules endothéliales (flèches blanche) à 34 hpf (t₀). Les cellules endothéliales des embryons contrôles ont des projections membranaires qui sont longues et fines (**a**) tandis que les cellules des morphants n'en ont presque pas (**b**). *Barre d'échelle* : 30 μ m. **C)** Les flèches de couleurs indiquent les différents événements de formation des vaisseaux par accolement des cellules endothéliales voisines. Chez les morphants, le plexus est moins structuré, plus épais et l'angiogenèse est moins dynamique que chez les contrôles. Alors qu'elle est terminée à 44 hpf chez les contrôles (**c**), le dernier vaisseau des morphants n'est toujours pas formé à 49 hpf (**g**), et il se forme au mauvais endroit à 54 hpf (**h**), (flèches blanches). *Barre d'échelle* : 30 μ m.

Afin de vérifier que ces résultats étaient reproductibles et de quantifier les phénotypes observés à 50 hpf, nous avons imagé 14 embryons Tg(*kdr1:ras-mCherry*) par condition, issus de deux expériences indépendantes (**Figure R22-A**). Pour chaque embryon, nous avons dans un premier temps compté le nombre de boucles du plexus (**Figure R22-Ba**). Les morphants ont significativement moins de boucles dans leur plexus (avec une moyenne de 3,8 boucles contre 5,9 boucles pour les contrôles), et certains ont un plexus malformé en forme de tube unique, confirmant que la morphogenèse est anormale. Les boucles du plexus veineux caudal sont également plus larges chez les morphants, avec une moyenne de 704,9 μm^2 contre 356,4 μm^2 pour les contrôles, ce qui résulte en une structure plus lâche (**Figure R22-Bb**).

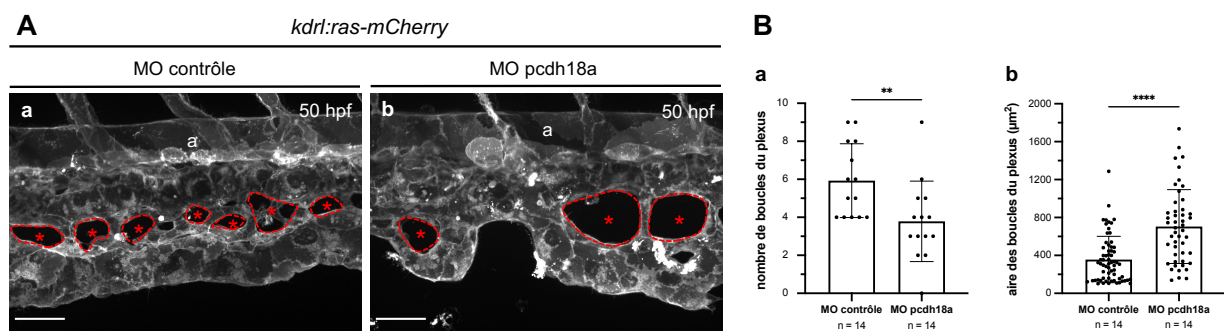


Figure R22 – Pcdh18a-ACP₁₀₆ modifie la morphologie du plexus veineux caudal

A) Projections maximales d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons Tg(*kdr1:Ras-mCherry*) à 50 hpf, injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Barre d'échelle : 30 μm . Pour chaque embryon, comptage du nombre de boucles dans le plexus (astérisques rouges) et mesure de l'aire en μm^2 de chaque boucle (pointillés rouges). **B-a)** Le test de Mann-Whitney indique que les morphants ont significativement moins de boucles dans leur plexus, avec une moyenne de 3,8 boucles contre 5,9 pour les contrôles, ce qui indique une malformation générale du plexus, ($p = 0,0066$). n = 14 embryons par condition, issus de deux expériences indépendantes. **B-b)** Le test de Mann-Whitney indique que les morphants ont des boucles du plexus significativement plus larges que celles des embryons contrôles, avec des moyennes respectives de 704,9 μm^2 et 356,4 μm^2 , ce qui indique que la structure du plexus veineux caudal est plus lâche, ($p < 0,0001$). n = 14 embryons par condition, issus de deux expériences indépendantes (n = 65 boucles pour les contrôles et n = 48 boucles pour les morphants Pcdh18a).

Il est probable que ce phénotype résulte d'un effet indirect, dû à l'altération de la fonction des cellules stromales, qui ne pourraient alors plus maintenir convenablement la structure du plexus. Nous avons alors entrepris d'étudier la maturation ces cellules après leur migration et leurs interactions avec les cellules endothéliales du plexus.

4. Maturation des cellules stromales et interaction avec les cellules endothéliales du plexus veineux

4.1. Implication de Pcdh18a dans la différenciation des cellules stromales

Lors de la maturation du THC, les progéniteurs des cellules stromales se différencient en deux types cellulaires principaux : les cellules stromales réticulaires qui interconnectent les segments du plexus veineux caudal, via leurs projections membranaires, et les cellules stromales périvasculaires, qui peuvent morphologiquement faire penser aux péricytes, qui s'étalent et entourent les vaisseaux pour maintenir leur intégrité. Certaines cellules progénitrices continuent leur migration au-delà du THC pour devenir les cellules mésenchymateuses de la nageoire. Ce type cellulaire ayant la même origine somitique que les cellules stromales, nous l'avons inclus dans l'analyse. Nous souhaitons savoir si l'un ou l'autre type cellulaire était particulièrement affecté par l'expression de *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆*. Les cellules commencent à se différencier vers 34-36 hpf et leur changement de morphologie est notable à partir de 48 hpf, ce qui accompagne la maturation de la niche et la prépare à accueillir les cellules souches hématopoïétiques.

Pour notre analyse, nous avons dans un premier temps, privilégié une distinction morphologique des types cellulaires à 50 hpf (**Figure R23-A**). En effet, à ce stade encore précoce de la différenciation cellulaire, nous ne disposons pas de marqueurs moléculaires permettant de distinguer à coup sûr l'un ou l'autre type cellulaire. Nous avons injecté des embryons *Tg(ET37:GFP ; kdrl:ras-mCherry)* avec le MO contrôle, le MO *pcdh18a*, ou bien avec une co-injection du MO *pcdh18a* et de l'ARNm de ce gène. Cette co-injection permet d'étudier un éventuel sauvetage phénotypique, possible dans certains cas grâce à la surexpression de l'ARNm intègre, masquant l'effet de la forme mutée. Néanmoins, la restauration du phénotype n'est pas toujours possible car l'ARNm est surexprimé par tous les types cellulaires, même ceux qui n'expriment pas normalement le gène, ce qui crée une expression ectopique de la protéine.

Nous avons imagé 14 embryons par condition, issus de deux expériences indépendantes, et compté le nombre de cellules de chaque type (**Figure R23-B**). La distinction morphologique est possible grâce au double marquage des cellules stromales et des cellules endothéliales, mais aussi grâce à l'acquisition haute résolution au microscope confocal à disque tournant, et à la visualisation 3D avec le logiciel Imaris.

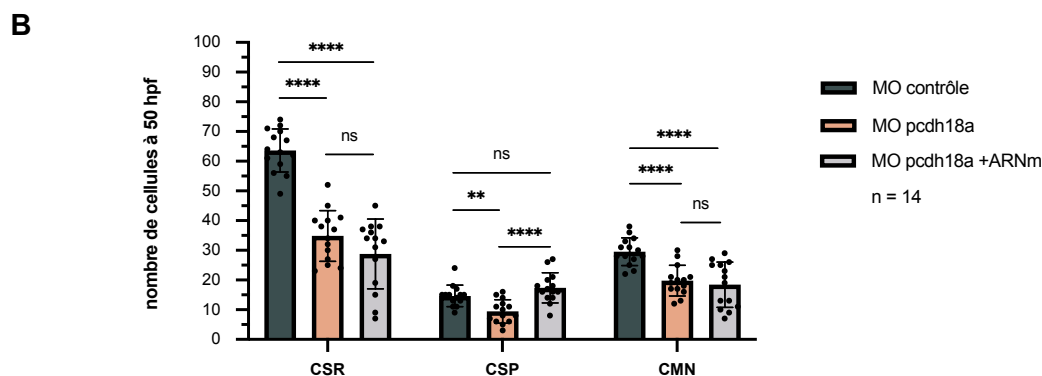
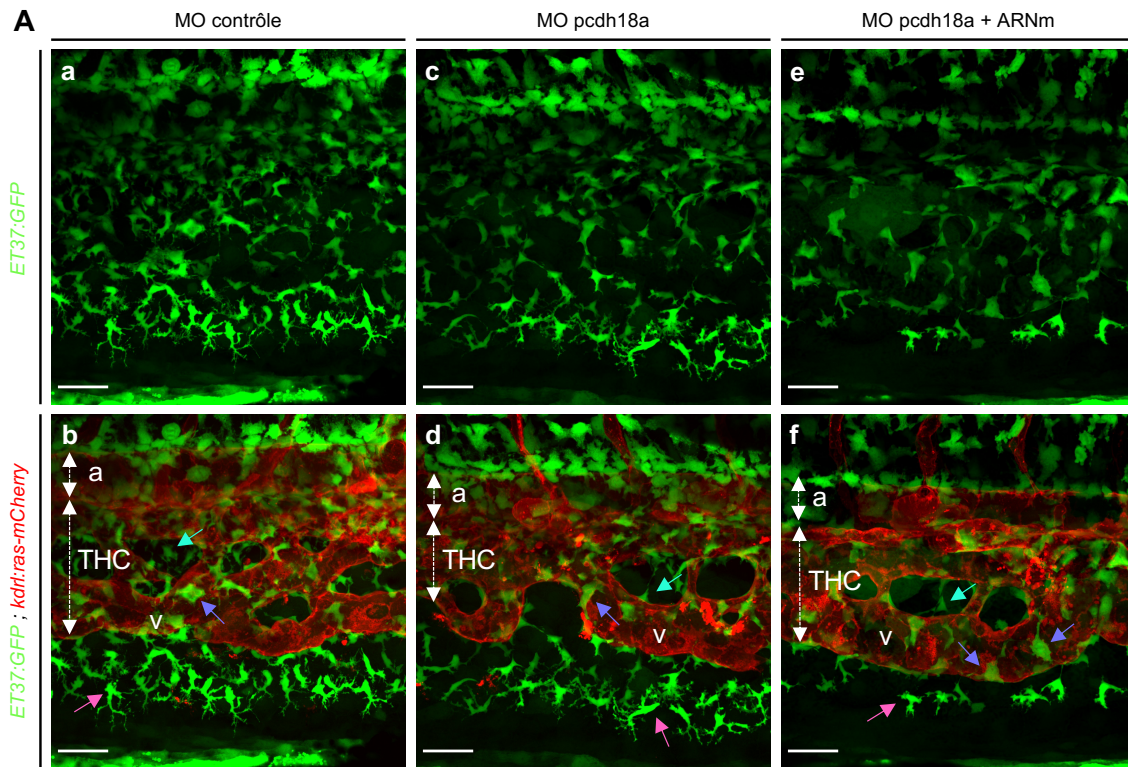


Figure R23 – Distinction morphologique des différents types cellulaires

A) Projections maximales d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons Tg(*ET37:GFP* ; *kdrl:ras-mCherry*) à 50 hpf, injectés avec le MO contrôle, le MO pcdh18a ou le MO pcdh18a + 125 pg d'ARNm pcdh18a. Barre d'échelle : 30 μ m. Grâce à une visualisation 3D avec le logiciel Imaris de Bitplane, il est possible de distinguer morphologiquement les différents types cellulaires à 50 hpf. Les cellules stromales périvasculaires (CSP) sont plutôt plates, entourent les vaisseaux et ont une grande surface de contact avec les cellules endothéliales (flèches violettes). Les cellules stromales réticulaires (CSR) ont plutôt un rôle de maintien du plexus et relient différents endroits du plexus grâce à leurs filopodes (flèches bleues). Les cellules mésenchymateuses de la nageoire (CMN) sont sorties du plexus et ont une apparence ramifiée (flèches roses). a : artère caudale, THC : tissu hématopoïétique caudal, v : veine définitive. **B)** Comptage des différents types cellulaires à 50 hpf avec n = 14 embryons pour chaque condition, issus de deux expériences indépendantes. Analyses statistiques par tests de Student. CSR : contrôles vs. morphants ($p < 0,0001$), contrôles vs. morphants + ARNm ($p < 0,0001$), morphants vs. morphants + ARNm ($p = 0,1295$). CSP : contrôles vs. morphants ($p = 0,0011$), contrôles vs. morphants + ARNm ($p = 0,1144$), morphants vs. morphants + ARNm ($p < 0,0001$). CMN : contrôles vs. morphants ($p < 0,0001$), contrôles vs. morphants + ARNm ($p < 0,0001$), morphants vs. morphants + ARNm ($p = 0,5863$).

Au niveau des cellules stromales réticulaires (CSR), les morphants présentent une diminution de près de moitié du nombre de cellules (moyenne de 34,9) par rapport aux contrôles

(moyenne de 63,6) et la co-injection de l'ARNm ne permet pas de restaurer la quantité de cellules (moyenne de 28,8), qui reste similaire à celle des morphants. Par contre, pour les cellules stromales périvasculaires (CSP), leur quantité est aussi plus faible chez les morphants (moyenne de 9,4) par rapport aux contrôles (moyenne de 14,6) mais le sauvetage avec l'ARNm permet cette fois de restaurer la quantité de cellules (moyenne de 17,4), à un niveau même plus élevé que celui des contrôles. Ce phénomène n'est pas rare puisque nous sommes ici dans des conditions de surexpression. Les morphants présentent aussi une plus faible quantité de cellules mésenchymateuses de la nageoire (CMN), (moyenne de 19,8) par rapport aux contrôles (moyenne de 29,6) et le sauvetage avec l'ARNm ne permet pas de restaurer le nombre de cellules (moyenne de 18,4), qui est similaire à celui des morphants. La diminution du nombre de CMN peut aussi s'expliquer, au moins en partie, par une réduction d'évènements de mitose parmi ces cellules chez les morphants par rapport aux contrôles (données non montrées).

Ces résultats montrent que l'expression de *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* induit une réduction des deux types de cellules stromales dans le THC, de 45% pour les CSR et de 36% pour les CSP, ainsi qu'une diminution de 33% du nombre de CMN. La co-injection de l'ARNm permet uniquement de restaurer la quantité de CSP. Ici, il est nécessaire d'être prudent car la morphologie du plexus caudal vasculaire est fortement altérée. Celui-ci présente des vaisseaux avec moins de boucles, ce qui peut modifier la place allouée à chaque type cellulaire. Il est nécessaire de distinguer les effets directs, des effets indirects, ce qui est parfois difficile.

4.2. Impact de *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* sur l'expression de *pdgfrβ*

Au cours de leur développement, les vaisseaux sont peu à peu entourés intimement de cellules murales – péricytes pour les capillaires et les veines, futures cellules musculaires lisses pour les artères. Ces cellules murales expriment le gène *pdgfr-β*, et corrélativement, chez le danio zébré, le transgène *pdgfrβ:mCherry* (Ando et al., 2016). En utilisant cette lignée *Tg(pdgfrβ:mCherry)* sous forme homozygote afin de maximiser le signal, nous avons pu constater que des cellules exprimant *pdgfrβ*, commencent à apparaître à partir de 36 hpf au niveau du plancher ventral de l'artère caudale, comme cela avait été décrit pour l'aorte par Ando et al. Nous avons alors engendré une lignée double transgénique *Tg(cspg4:GFP; pdgfrβ:mCherry)* homozygote pour les deux transgènes. Notre expérience d'imagerie time-lapse sur de tels embryons nous a permis d'établir que ce sont des cellules *cspg4:GFP+* déjà en place au plancher de l'artère caudale qui expriment progressivement *pdgfrβ*. Le signal augmente jusqu'à 50 hpf, reflétant le processus de différenciation cellulaire (**Figure R24-A**).

Comme *cspg4* marque spécifiquement les progéniteurs des cellules stromales et leurs dérivés, cela signifie que les progéniteurs, en plus des dérivés que nous avons déjà mentionnés, produisent également les cellules murales de l'artère caudale.

Nous avons alors souhaité connaître l'effet de l'expression de *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* sur la différenciation des cellules *cspg4*⁺ en cellules murales du plancher de l'artère caudale, et en cellules stromales périvasculaires autour du plexus veineux. Pour cela, nous avons injecté le MO contrôle ou le MO *pcdh18a* dans des embryons *Tg(cspg4:GFP ; pdgfrβ:mCherry)* et compté le nombre de cellules doublement marquées. La lignée *Tg(cspg4:GFP)*, disponible plus récemment au laboratoire que la lignée *Tg(cspg4:Gal4)*, a l'avantage de bien marquer la totalité des précurseurs et leurs dérivés, alors que *Tg(cspg4:Gal4)* présentait un certain mosaïcisme d'expression. Au total, nous avons analysé 14 embryons par condition, issus de deux expériences indépendantes. Visuellement, les morphants ont un nombre réduit de cellules *pdgfrβ:mcherry*⁺ (que nous abrègerons dans la suite en « *pdgfrβ*⁺ ») au niveau de l'aorte (**Figure R24-B**) et cela a été confirmé statistiquement (**Figure R24-C**). Alors que les contrôles ont en moyenne 12,6 cellules *pdgfrβ*⁺, les morphants en ont trois fois moins, avec une moyenne de 4,4 cellules *pdgfrβ*⁺. Ces résultats indiquent que *Pcdh18a* est impliquée dans le développement des cellules murales de l'artère caudale.

Dans le THC proprement dit, le statut des cellules *pdgfrβ*⁺ est moins clair. Bien que toutes les cellules *pdgfrβ*⁺ soient *cspg4*⁺ (donc bien dérivées des progéniteurs des cellules stromales), une partie seulement des cellules de morphologie périvasculaire apparaissent *pdgfrβ*⁺, et inversement certaines cellules stromales de morphologie réticulaire sont néanmoins *pdgfrβ*⁺. Chez les morphants, nous avons trouvé le même nombre de cellules *cspg4*⁺, *pdgfrβ*⁺ que chez les embryons contrôles (moyenne de 20,4 cellules pour les deux conditions), (**Figure R24-D**). Or les morphants possèdent en moyenne deux fois moins de cellules stromales *cspg4*⁺ (**Figure R24-E**), dont deux fois moins de CSP définis morphologiquement (**Figure R23-B**), par rapport aux contrôles. Cela suggère à minima que le déficit en CSP chez les embryons *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* n'est pas causé par une dérégulation transcriptionnelle du gène *pdgfrβ* dans les cellules stromales, mais plutôt par un déficit mécanique de l'adhésion des cellules sur les vaisseaux. De plus, du fait qu'il y a deux fois moins de cellules stromales chez les morphants mais le même nombre de cellules *pdgfrβ*⁺, la proportion de cellules stromales *pdgfrβ*⁺ est deux fois plus élevée chez les morphants, ce qui peut résulter d'un phénomène compensatoire.

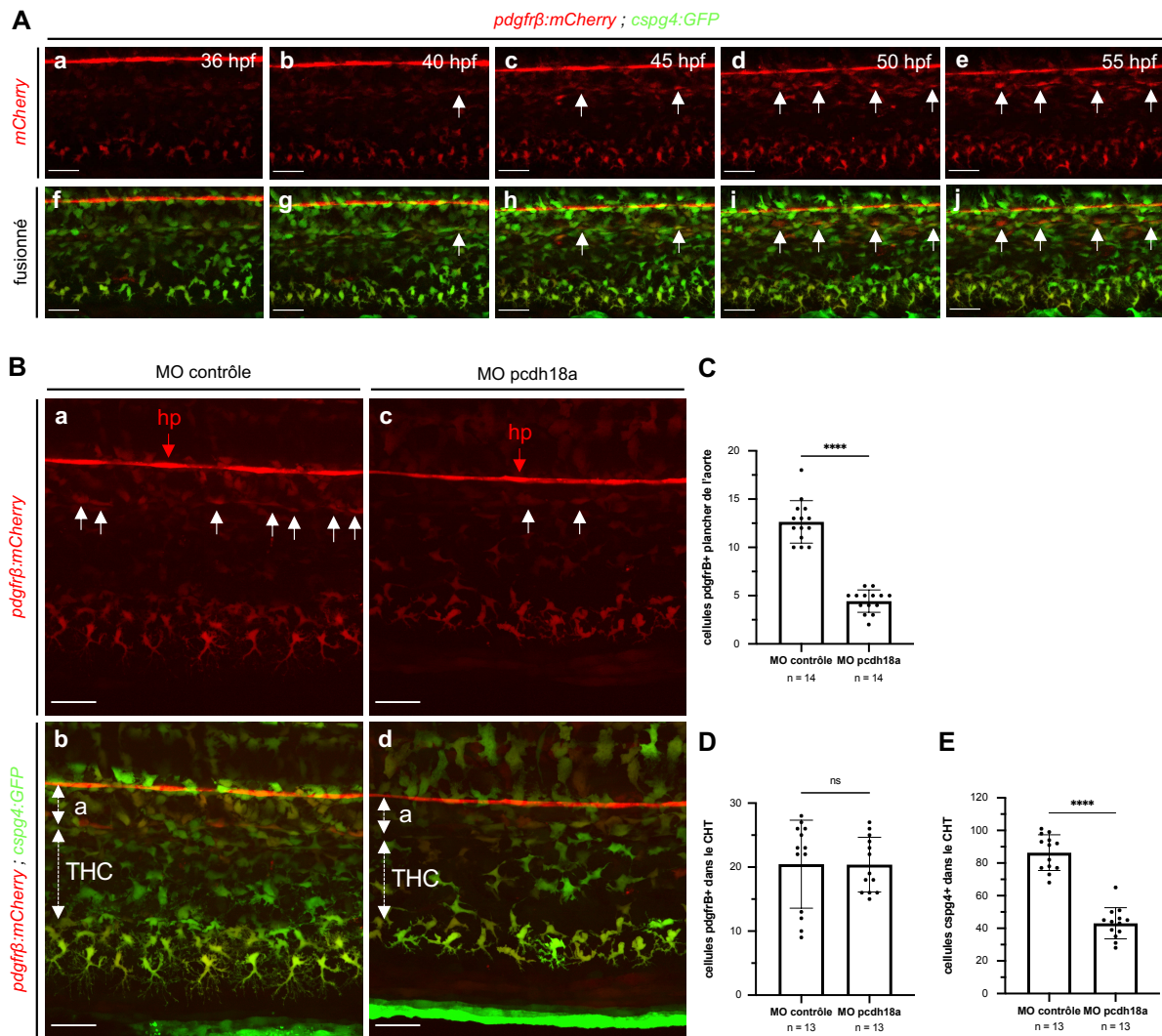


Figure R24 – Expression de *pdgfrβ:mCherry* à 50 hpf chez les embryons contrôle ou exprimant *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆*

A) Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* séquentielles en time-lapse (36-55 hpf), d'un embryon contrôle non injecté Tg(*cspg4:GFP ; pdgfrβ:mCherry*). Différenciation progressive des cellules *cspg4*⁺ en cellules *pdgfrβ*⁺ au niveau du plancher ventral de l'aorte (flèches blanches). **a/f** 36 hpf, **b/g** 40, **c/h** 45 hpf, **d/i** 50 hpf, **e/j** 55 hpf. Barre d'échelle : 30 μm. **B)** Projections maximales d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons Tg(*cspg4:GFP ; pdgfrβ:mCherry*) à 50 hpf, injectés avec le MO contrôle ou le MO *pdh18a*. Barre d'échelle : 30 μm. Grâce à une visualisation 3D avec le logiciel Imaris de Bitplane, il est possible de visualiser les cellules *pdgfrβ*⁺ localisées au niveau du plancher ventral de l'aorte (flèches blanches), endroits où ils apparaissent en premier et où leur distinction est possible. a : artère caudale, THC : tissu hématopoïétique caudal, hp : hypochorde (partie ventrale de la notochorde). **C)** Comptage du nombre de cellules *pdgfrβ*⁺ localisées au niveau du plancher de l'aorte, n = 14 embryons par condition issus de deux expériences indépendantes. Le test de Student indique qu'il y a une réduction hautement significative du nombre de cellules *pdgfrβ*⁺ chez les morphants (moyenne de 4,4 cellules) par rapport aux contrôles (moyenne de 12,6 cellules), ($p < 0,0001$). **D)** Comptage du nombre de cellules *pdgfrβ*⁺ localisées dans le THC, n = 13 embryons par condition issus de deux expériences indépendantes (pour chaque condition, un embryon était trop déformé pour compter le nombre de cellules dans le THC). Le test de Mann-Whitney indique que les embryons des deux conditions possèdent une quantité équivalente de cellules *pdgfrβ*⁺ dans leur THC (moyenne de 20,4 cellules pour les deux conditions), ($p = 0,7517$). **E)** Comptage du nombre de cellules *cspg4*⁺ localisées dans le THC, n = 13 embryons par condition issus de deux expériences indépendantes. Le test de Mann-Whitney indique que les morphants possèdent significativement moins de cellules *cspg4*⁺ que les contrôles (moyennes respectives de 43,1 et 86,4 cellules), ($p < 0,0001$).

4.3. Nature moléculaire des contacts entre cellules stromales et endothéliales

Suite à ces résultats, nous nous sommes demandé si Pcdh18a à la surface des cellules stromales pourrait former des interactions hétérophiles avec des composants à la surface des cellules endothéliales. Nous avons donc recherché si la séquence protéique extracellulaire de Pcdh18a comportait des motifs connus comme importants pour l'interaction avec les cellules endothéliales. La séquence du peptide REDV, présente au niveau de la fibronectine plasmatique humaine, a été identifiée comme favorisant l'adhésion des cellules endothéliales de façon spécifique (Hubbell et al., 1991). Depuis cette identification, quelques travaux s'y sont intéressés pour des approches de culture cellulaire et de sélection en microfluidique, mais jamais *in vivo*. La Pcdh18a contient deux peptides REDV dans sa partie extracellulaire, l'un situé dans la région EC1 et l'autre dans EC5 (**Figure R25-A**). Nous avons choisi d'étudier l'effet de la mutation de ces peptides dans l'adhésion des cellules stromales aux cellules endothéliales.

Lors de l'injection du plasmide contenant la séquence entière de Pcdh18a, fusionnée à la GFP, l'expression du transgène était retrouvée chez quelques cellules seulement, dû à sa longueur importante d'environ 4700 pb (voir précédemment, section 2.2.2.). De plus, la protéine entière a tendance à être recyclée dans des vésicules d'endocytose, tandis que la délétion de son domaine cytoplasmique empêche cette endocytose, ce qui augmente la quantité de protéines présentes à la membrane (Bosze et al., 2020).

Afin d'étudier la nature des interactions hétérophiles dans lesquelles la partie extracellulaire de Pcdh18a pourrait intervenir, nous avons donc décidé de faire exprimer uniquement cette partie extracellulaire de la protéine dans nos cellules d'intérêt. Pour cela, nous avons cloné la partie extracellulaire ainsi que la partie transmembranaire de Pcdh18a, et remplacé la partie cytoplasmique (CP) par la GFP. Cette forme mutante Pcdh18a- Δ CP-GFP a été clonée sous la séquence activatrice UAS, afin de faire spécifiquement exprimer la construction par les cellules stromales, en utilisant la lignée Tg(*cspg4:Gal4* ; *UAS:RFP*). Pour la mutation du peptide REDV, nous avons utilisé un site de prédiction des structures protéiques, afin de déterminer pour chaque candidat peptide de remplacement, si sa présence n'induisait pas de changement conformationnel trop important. Nous avons testé quatre peptides de remplacement et sélectionné le peptide AEAIV qui possédait le meilleur score (cf. légende **Figure R25-A/B**).

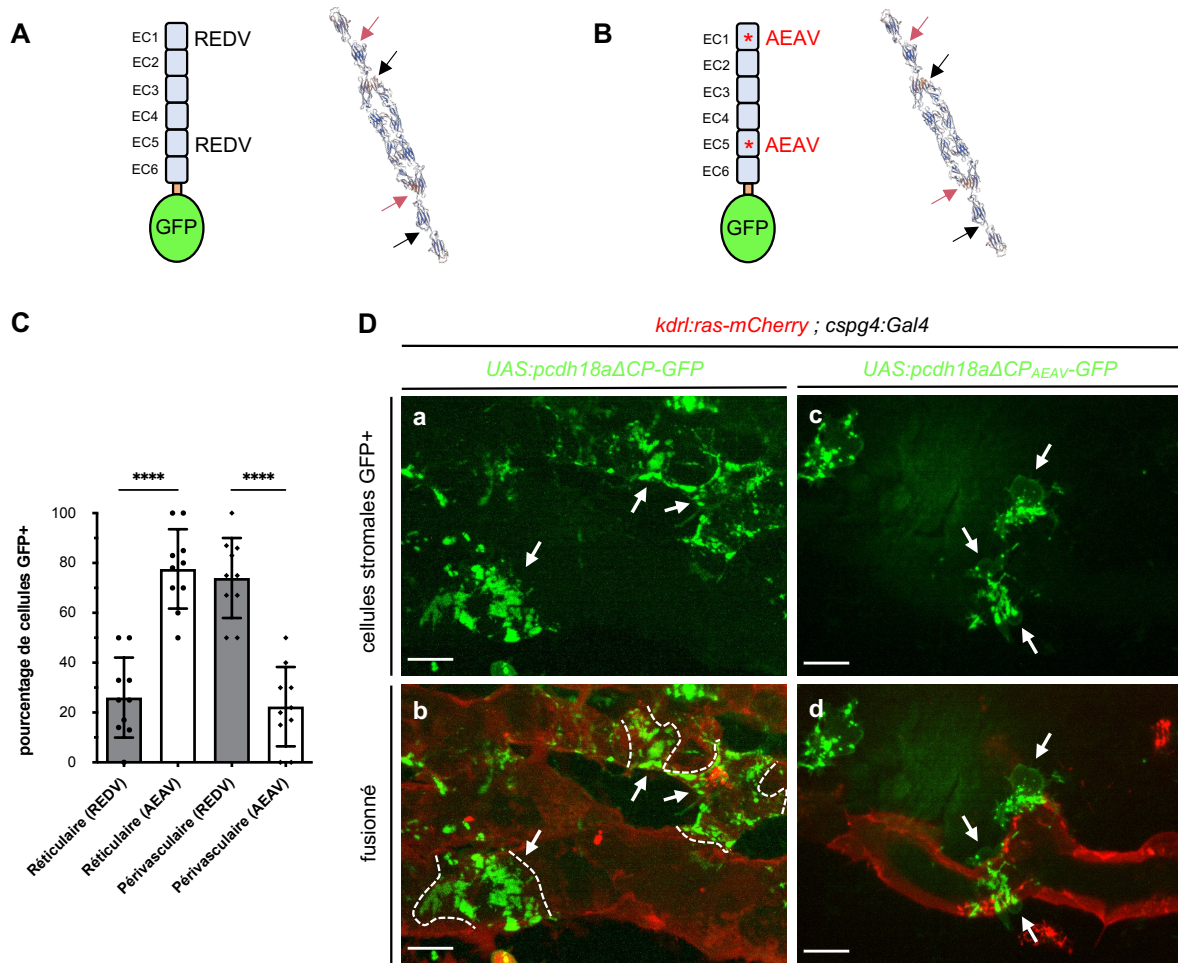


Figure R25 – Le motif REDV est nécessaire à l'étalement des cellules stromales

A) Clonage sous la séquence activatrice UAS des parties extracellulaire et transmembranaire de Pcdh18a, fusionnées à la GFP, appelée UAS:pcdh18a-ΔCP-GFP. Pcdh18a possède deux peptides REDV dans sa partie extracellulaire, l'un situé dans EC1 (aa 49-52) et l'autre situé dans EC5 (aa 536-539). Les constructions ont été réalisées par clonage Gibson. **B)** Utilisation du site de prédiction de la structure des protéines Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) pour déterminer par quel peptide remplacer REDV lors la mutagenèse. Nous avons testé les peptides AAAA, AEA, AEDA et RAAV et regardé dans un premier temps ceux dont le QMEAN (score global qui estime la qualité de la prédiction) est le plus proche de celui de REDV. AAAA et AEA avaient des scores trop bas. Ensuite, nous avons regardé la structure 3D globale du dimère et remarqué que le changement de REDV en RAAV induisait un changement conformationnel important au niveau de EC1. Nous avons donc choisi de muter REDV par AEA, qui présentent des QMEAN comparables, respectivement -2,74 et -2,37, et des structures 3D similaires lors de la dimérisation. La mutagenèse a été réalisée par PCR. **C)** Statistiques du pourcentage du nombre de cellules GFP+ de types réticulaire et périvasculaire retrouvées chez des embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:RFP ; kdr1:ras-mCherry*) à 45-50 hpf, injectés avec le plasmide UAS:pcdh18a-ΔCP-GFP ou UAS:pcdh18a-ΔCP_{AEA}-GFP. n = 10 embryons par condition. Le test de Student indique que les embryons injectés avec la forme mutée (AEA) présentent un pourcentage de cellules de type réticulaire significativement plus élevé que les contrôles qui expriment la forme non mutée (REDV), moyennes respectives de (77,6% et 26%), ($p < 0,0001$). Le test de Student indique que les embryons injectés avec la forme mutée (AEA) présentent un pourcentage de cellules de type périvasculaire significativement moins élevé que les contrôles qui expriment la forme non mutée (REDV), moyennes respectives de (22,4% et 74%), ($p < 0,0001$). **D)** Projections de quelques plans d'acquisitions *in vivo* au confocal à disque tournant, d'embryons Tg(*cspg4:Gal4 ; UAS:RFP ; kdr1:ras-mCherry*) à 50 hpf, injecté le plasmide UAS:pcdh18a-ΔCP-GFP (**a/b**) ou avec la forme mutante UAS:pcdh18a-ΔCP_{AEA}-GFP (**c/d**), ainsi que l'ARNm de la transposase. Barre d'échelle : 10 μm. Les cellules stromales qui expriment la forme non mutée REDV sont étalées sur les vaisseaux (flèches) tandis que celles qui expriment la forme mutante AEA peuvent être retrouvées seulement en partie en contact avec les cellules endothéliales (flèches). Délimitation des cellules stromales périvasculaires en pointillés blancs.

Nous avons injecté la forme “sauvage” UAS:pcdh18a- Δ CP-GFP ou la forme mutée UAS:pcdh18a- Δ CP_{AEAV}-GFP dans des embryons triples transgéniques (*cspg4:Gal4* ; *UAS:RFP* ; *kdrl:ras-mCherry*) afin de visualiser la position et la morphologie des cellules stromales qui expriment ces constructions, relativement aux cellules endothéliales. Nous avons analysé des acquisitions *in vivo* prises au confocal à disque tournant à 45-50 hpf, d’embryons issus de trois expériences indépendantes. Après analyse de 10 embryons par condition, exprimant convenablement les constructions, nous avons tout d’abord trouvé que les cellules stromales qui surexpriment ainsi la forme non mutée REDV sont à 74% de type périvasculaire, et donc à 26% de type réticulaire (**Figure R25-C**), ce qui est l’inverse des proportions trouvées chez l’embryon sauvage (cf. **Figure R23-B**). La surexpression de la partie extracellulaire de Pcdh18a à la surface des cellules stromales a donc très fortement promu leur différenciation en cellules stromales périvasculaires, intimement associés aux cellules endothéliales. En revanche, les cellules stromales qui surexpriment la forme mutée AEAV sont en moyenne pour 77,6% de type réticulaire et 22,4% de type périvasculaire (**Figure R25-C**), proportion similaire aux embryons sauvages, ce qui prouve que le fort effet de promotion de la différenciation en cellules stromales périvasculaires, causé par la surexpression de la partie extracellulaire intacte de Pcdh18a, dépend strictement du peptide REDV.

De plus, alors que les cellules stromales de type périvasculaire qui expriment Pcdh18a- Δ CP-GFP sont totalement étalées sur les vaisseaux (**Figure R25-Da/b**), les cellules qui expriment Pcdh18a- Δ CP_{AEAV}-GFP peuvent être retrouvées attachées seulement en partie sur le vaisseau (**Figure R25-Dc/d**). Cette particularité n’est pas retrouvée à chaque fois mais a été observée sur quelques cellules. Ces résultats suggèrent également que le peptide REDV de Pcdh18a est nécessaire à l’attachement et à l’étalement des cellules stromales sur les vaisseaux.

5. Implication de la protéine de matrice extracellulaire fibronectine

Les protéines d'adhésion cellulaire ne sont pas les seuls acteurs impliqués dans la médiation des contacts. La matrice extracellulaire (ECM) joue également un rôle fondamental dans la migration cellulaire, servant de support aux cellules et lors de la morphogenèse des tissus. Dans notre contexte, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression de la fibronectine car cette molécule est connue pour avoir des propriétés modulatrices de l'adhésion des fibroblastes et participe à la tubulogenèse et à l'angiogenèse des vaisseaux. L'homéostasie de cet élément est cruciale lors du développement et des dérégulations de son expression sont à l'origine de lourds dysfonctionnements.

5.1. La fibronectine permet de compartimenter le somite et d'isoler les progéniteurs

Les deux paralogues de la fibronectine, *fn1a* et *fn1b*, ont des profils d'expression distincts (**Figure R26-A**). A 22 hpf, l'expression de *fn1a* est plutôt ubiquitaire et non régionalisée dans des structures définies. L'expression de *fn1b* est, quant à elle, spécifique des somites dès le mésoderme pré-somitique et perdure dans les somites nouvellement formés (S₁ à S₅) pour finalement se régionaliser progressivement dans leur partie ventrale, au niveau des groupes cellulaires de cellules progénitrices, vers les somites S₃ à S₅, ce qui correspond au moment de spécification des progéniteurs. Les cellules somitiques sont donc capables d'exprimer la fibronectine et probablement de la sécréter dans l'espace extracellulaire.

Au niveau protéique, la fibronectine est détectée à des niveaux élevés dans l'espace inter-somitique, ce qui participe à la délimitation des somites après leur formation. Ce qui est nouveau est la détection de fibronectine autour des amas ventraux des cellules progénitrices, permettant d'isoler les groupes de cellules du reste du somite (**Figure R26-B**). Ici, la fibronectine est uniquement détectée à la périphérie des amas ventraux, et non entre les cellules de l'amas. Ceci contraste avec le cas de la molécule d'adhésion Alcama, qui est retrouvée aux interfaces des cellules des amas de progéniteurs, à des niveaux d'autant plus élevés que le somite est mature (données non montrées d'Emi Murayama). Il est fort probable que l'isolation des futurs précurseurs du reste du somite par la fibronectine participe à la régulation d'accès aux signaux extracellulaires et à la spécification des cellules.

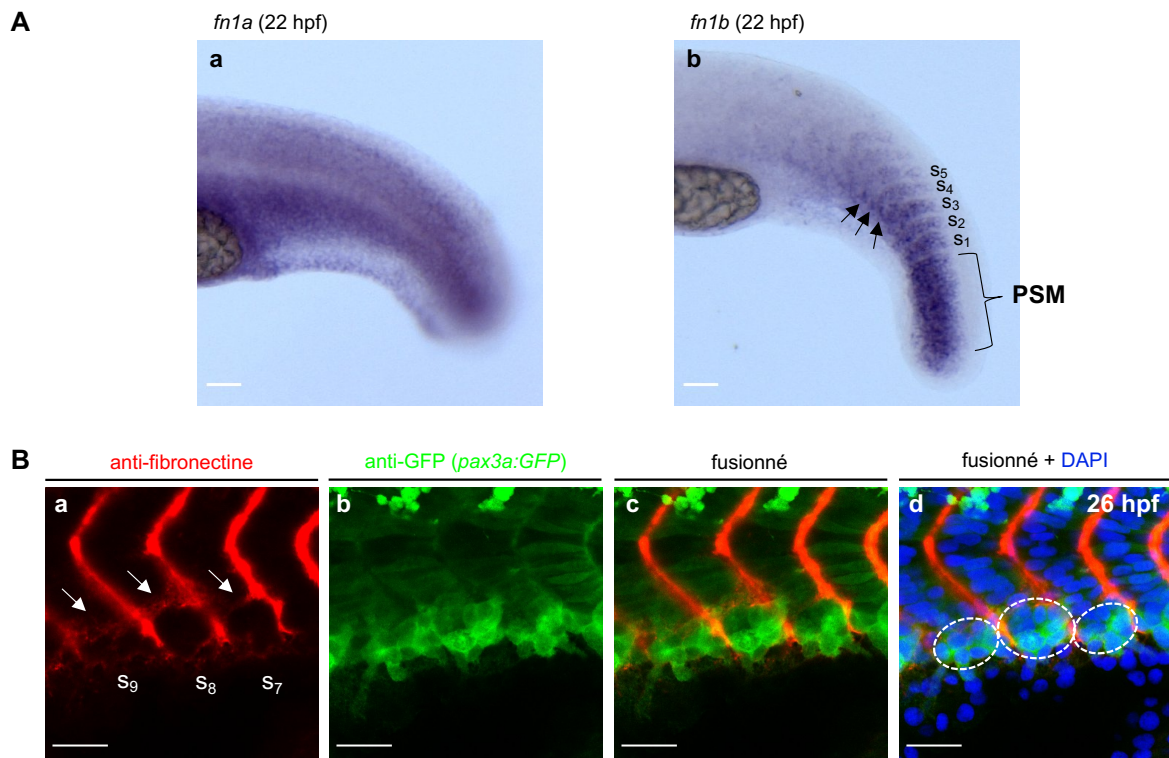


Figure R26 – La fibronectine isole les progéniteurs du reste du somite lors de leur spécification

A) WISH du profil d'expression endogène des gènes *fn1a* et *fn1b* à 22 hpf. Barre d'échelle : 50 μm . **a)** L'expression de *fn1a* est diffuse et n'est pas spécifiquement retrouvée au niveau des types cellulaires d'intérêt à ce stade du développement. **b)** *fn1b* présente une forte expression dans le mésoderme pré-somitique (PSM), puis dans l'ensemble du somite nouvellement formé (S1) et se restreint progressivement dans la partie ventrale. Un marquage plus intense est détecté au niveau des zones de spécification des précurseurs, aux somites S7, S8, S9 (flèches noires). **B)** Immunohistochimie réalisée sur des embryons Tg(*pax3a:GFP*) à 26 hpf pour détecter la fibronectine endogène. Projection de 5 plans d'acquisition réalisée au microscope confocal. Barre d'échelle : 20 μm . **a)** Révélation tyramide-Cy3 pour anti-fibronectine, **b)** révélation directe AF488 pour anti-GFP, **c)** fusion des deux canaux, **d)** ajout de DAPI pour marquer les noyaux. La fibronectine est retrouvée au niveau de l'espace inter-somitique et isole les groupes de précurseurs du reste du somite (flèches et pointillés blancs). Elle n'est pas retrouvée entre les cellules et délimite les structures tissulaires.

5.2. La fibronectine est surexprimée en condition *Pcdh18a- ΔCP_{106}*

Lorsque *Pcdh18a- ΔCP_{106}* est exprimée par les cellules stromales, celles-ci présentent des défauts de migration, et la formation du plexus veineux est altérée. Ce phénotype peut résulter d'un effet direct de la mutation de *Pcdh18a* sur les interactions stromales-endothéliales, mais peut aussi faire intervenir d'autres facteurs qui influencent le développement du plexus. Nous nous sommes intéressés à caractériser l'évolution des niveaux d'expression de la fibronectine au cours du développement et à identifier les types cellulaires qui la produisent en conditions contrôle ou morphant.

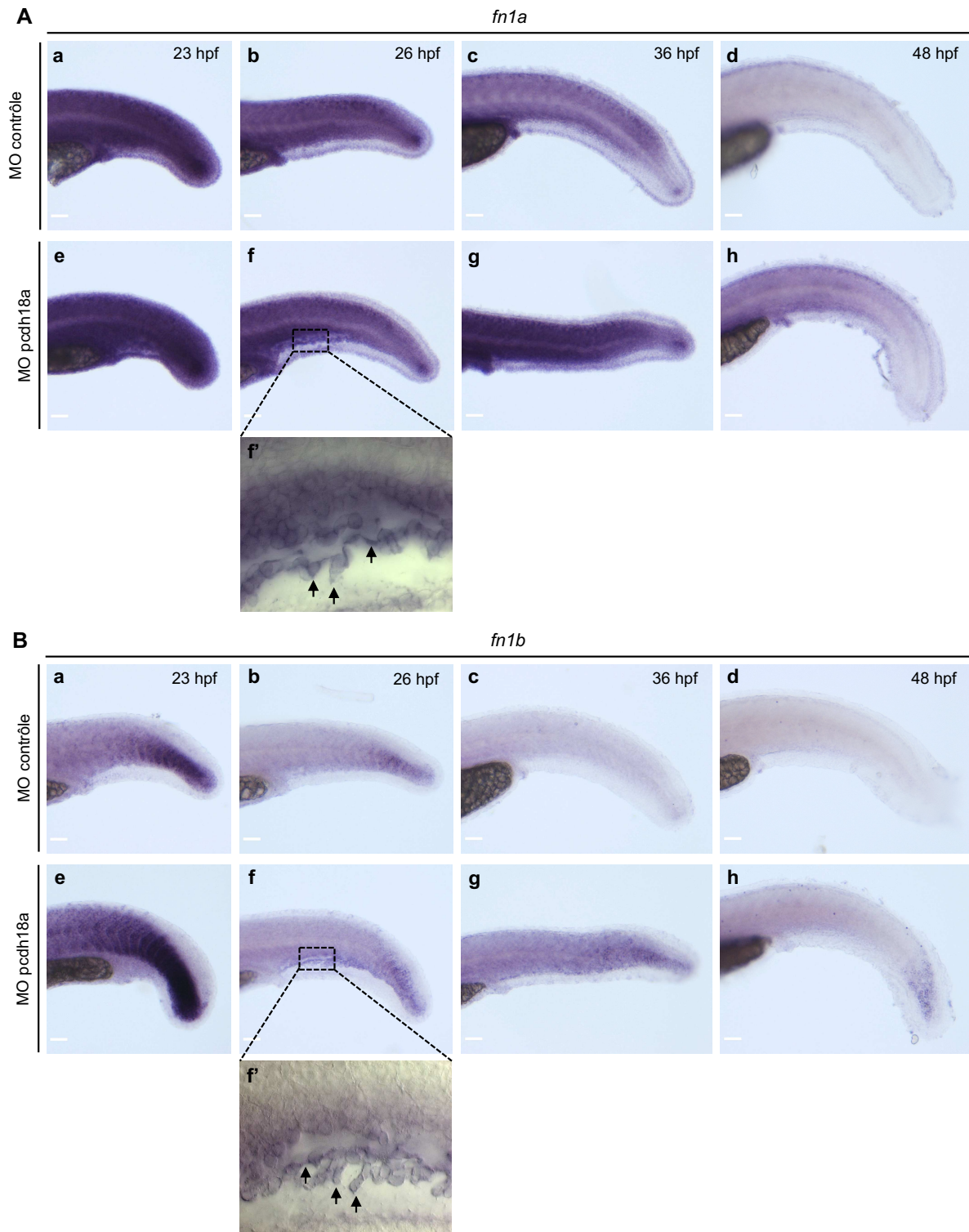


Figure R27 – Pcdh18a-ACP₁₀₆ induit une augmentation de l'expression de la fibronectine

WISH du profil d'expression endogène des gènes *fn1a* (A) et *fn1b* (B) à différents stades du développement chez des embryons injectés avec le MO contrôle (a-d) ou avec le MO pcdh18a (e-h). Les acquisitions ont été réalisées et traitées de la même manière pour chaque condition. Barre d'échelle : 50 μ m. De manière générale, les morphants présentent une expression augmentée des gènes de fibronectine par rapport aux contrôles. A 26 hpf, les morphants ont notamment un marquage plus fort au niveau des cellules endothéliales du plexus veineux en formation (f), confirmé par l'observation à plus fort grossissement (objectif 40x) par microscopie VE-DIC (f', flèches). Le contraste de la différence d'expression est davantage marqué pour *fn1b* car les embryons contrôles ne l'expriment presque pas à 26, 36 et 48 hpf, notamment au niveau du plexus veineux caudal.

Chez les contrôles, l'expression de *fn1a* est intense et ubiquitaire à 23 hpf, puis elle diminue progressivement au cours du temps pour n'être quasiment plus détectable à 48 hpf. Le marquage est encore fort à 26 et 36 hpf et, bien qu'il ne soit pas spécifique, il est tout de même retrouvé au niveau du plexus vasculaire (**Figure R27-Aa-d**). Par contre, l'expression de *fn1b* est exclusivement somitique, comme décrit précédemment, elle perdure à 26 hpf mais de façon moins marquée, puis s'éteint à 36 hpf et n'est plus détectable à 48 hpf (**Figure R27-Ba-d**). De manière générale, l'expression des deux paralogues est augmentée chez les morphants aux différents stades du développement. A 23 hpf, le contraste n'est pas évident pour *fn1a*, par contre l'expression de *fn1b* est fortement augmentée dans le mésoderme pré-somitique et s'étale davantage du côté rostral de l'embryon, incluant donc des stades plus matures des somites. A 26 hpf, les morphants ont une expression spécifiquement augmentée dans les cellules endothéliales. Ceci est visible pour les deux paralogues mais attire davantage notre attention pour *fn1b* du fait que les contrôles ne présentent aucune expression dans le plexus veineux. A 36 et 48 hpf, les morphants ont une expression augmentée de façon globale mais il est difficile de déterminer avec précision les types cellulaires qui expriment la fibronectine car le marquage est assez diffus.

Ces résultats montrent donc que de façon surprenante, l'expression d'une forme mutée de *Pcdh18a* dans les cellules stromales et leurs progéniteurs stimule fortement l'expression de la fibronectine par les cellules endothéliales à 26 hpf, moment de migration des cellules stromales. Cela peut suggérer que les cellules stromales en migration ont la capacité d'envoyer des signaux aux cellules endothéliales, qui peuvent modifier leurs niveaux de production de matrice extracellulaire. L'augmentation d'expression perdure à 36 hpf mais commence à s'éteindre et à retrouver des niveaux comparables à ceux des contrôles à 48 hpf, stade du développement où *pcdh18a* n'est plus exprimé.

5.3. *Pcdh18a*- Δ CP₁₀₆ modifie le dépôt de fibronectine sur le plexus vasculaire

La fibronectine est connue pour être sécrétée dans l'espace extracellulaire et pour interagir avec les intégrines présentes à la surface cellulaire. Nos expériences de PCRq sur la région caudale confirment que l'expression de fibronectine est augmentée à 36 hpf en condition morphant par rapport aux contrôles (**Figure R28-A**). L'expression relative moyenne de *fn1a* est augmentée d'un facteur 2, et celle de *fn1b* d'un facteur 4, relativement aux contrôles. Ces données sont issues de trois expériences indépendantes, avec à chaque fois trois répliques biologiques.

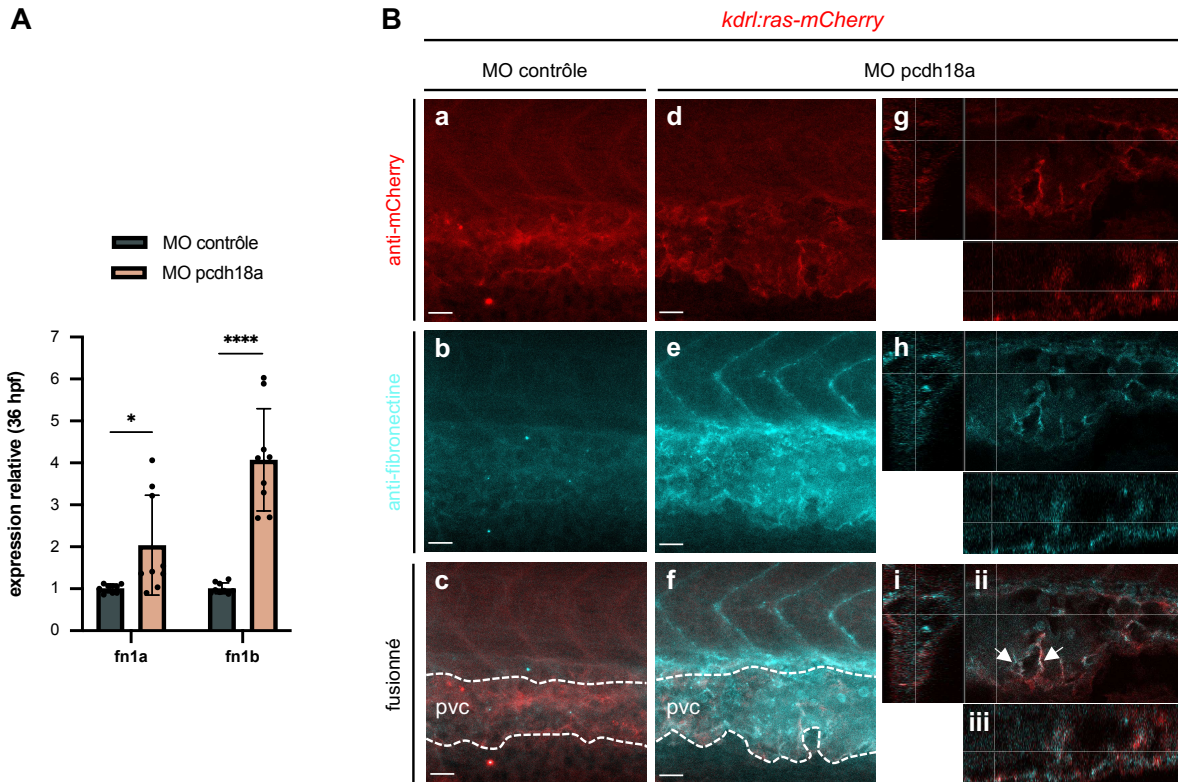


Figure R28 – Régulation du dépôt de fibronectine sur les cellules endothéliales à 36 hpf

A) Données de PCRq mesurant l'expression relative à 36 hpf des gènes *fn1a* et *fn1b*, au niveau de la queue, en condition MO contrôle ou MO pcdh18a. Données issues de trois expériences indépendantes avec à chaque fois trois répliques biologiques, contenant trois répliques techniques. Le test de Student indique que l'expression relative de *fn1a* est en moyenne augmentée de deux fois chez les morphants par rapport aux contrôles (respectivement 2 contre 1), ($p = 0,0202$). Le test de Student indique que l'expression relative de *fn1b* est en moyenne augmentée de quatre fois chez les morphants par rapport aux contrôles (respectivement 4,1 contre 1), ($p < 0,0001$). **B)** Immunohistochimie réalisée sur des embryons Tg(*kdr1:ras-mCherry*) à 36 hpf, injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. Révélation tyramide-Cy3 pour anti-mCherry et tyramide-AF647 pour anti-fibronectine. Les embryons ont été traités de la même manière pour les deux groupes et les acquisitions et traitement d'images de même. Barre d'échelle : 20 μm . **(a-f)** Projections de piles de quelques plans permettant de voir les somites et le plexus veineux caudal (pvc). **(g-i)** Coupes optiques des morphants permettant de visualiser la localisation de la fibronectine (i : transverse, ii : sagittale, iii : frontale). La colocalisation avec les cellules endothéliales montre que la fibronectine semble déposée sur le plexus veineux caudal (flèches blanches).

Bien que l'expression des gènes ne soit pas tout à fait stable pour les trois expériences indépendantes, l'expression relative de *fn1b* chez les morphants n'est jamais descendue en dessous de 3 fois celle des contrôles ; cette surexpression est donc reproductible. Ceci est moins notable pour *fn1a* qui n'a été surexprimé que dans une expérience sur trois (d'un facteur 3 à 4), mais nos hybridations in situ (**Figure R27-Ac/g**) confirment tout de même cette tendance. Ces résultats montrent que Pcdh18a- ΔCP_{106} a davantage d'effet sur l'expression de *fn1b* que sur celle de *fn1a*. Notre immunohistochimie, réalisée sur embryons Tg(*kdr1:ras-mCherry*) à 36 hpf, confirme au niveau protéique que les morphants ont davantage de fibronectine dans la région caudale que les contrôles, visible par l'intensité plus forte de la fluorescence (**Figure R28-B**).

La fibronectine est située dans l'espace inter-somitique, mais aussi, abondamment, au niveau du plexus veineux caudal (**Figure R28-Bf**). Les coupes optiques montrent une colocalisation du marquage de la fibronectine avec le marquage du plexus veineux (**Figure R28-Bii**).

Ces résultats montrent que les embryons qui expriment Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ présentent une déposition importante de fibronectine sur les cellules endothéliales. Cette quantité plus importante de fibronectine dans l'espace extracellulaire et notamment à la surface des cellules endothéliales est probablement en partie responsable du phénotype observé sur la formation du plexus veineux.

6. Conséquences sur le développement des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques dans le THC

Enfin, nous souhaitons étudier si la fonction du THC, qui est d'accueillir et de soutenir la prolifération des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CSPH), est maintenue ou bien altérée en condition morphant. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la genèse des CSPH, qui émergent vers 35 hpf dans le tronc à partir de l'endothélium hémogénique de l'aorte dorsale. En effet, il est nécessaire de vérifier si la production initiale de ces cellules se fait correctement avant d'évaluer leur capacité à se loger, se multiplier et se différencier dans la niche hématopoïétique caudale.

Pour cela, nous avons réalisé une hybridation *in situ* sur embryon entier, dirigée contre le gène *myb* à 36 hpf, correspondant au début des événements d'émergence des CSPH (**Figure R29-A**). Le gène *myb* (anciennement appelé *c-myb*) est un facteur de transcription exprimé par les CSPH, et essentiel à leur prolifération et leur différenciation. A 36 hpf, les morphants présentent un signal *myb* légèrement plus intense que les contrôles au niveau de l'aorte dorsale. Ces résultats montrent que les CSPH peuvent être produites correctement en condition morphant.

Ensuite, à 60 hpf, nos données *in vivo* sur embryons Tg(*CD41:GFP*), où la GFP marque les CSPH (et, plus fortement, les thrombocytes qui en sont issus), montrent que les morphants ont une diminution significative de plus de moitié du nombre de cellules CD41:GFP⁺ dans leur THC par rapport aux contrôles, avec des moyennes de 30 cellules chez les morphants et 70 cellules chez les contrôles (**Figure R29-B**).

Nous avons ensuite de nouveau réalisé l'hybridation *in situ* dirigée contre *myb*, à des stades plus avancés, 3 et 5 jpf, où l'activité hématopoïétique dans le THC est maximale (Murayama et al., 2006). L'expérience confirme une forte réduction du nombre de CSPH dans le THC des morphants par rapport aux contrôles (**Figure R29-C**). La diminution du signal est déjà visible dès 3 jpf mais le contraste est plus fort à 5 jpf, où seules quelques cellules *myb*⁺ sont retrouvées dans le THC des morphants. Ces résultats confirment que la fonction du THC est profondément altérée chez les morphants puisque les CSPH ne sont plus capables de se loger et de proliférer dans la niche hématopoïétique.

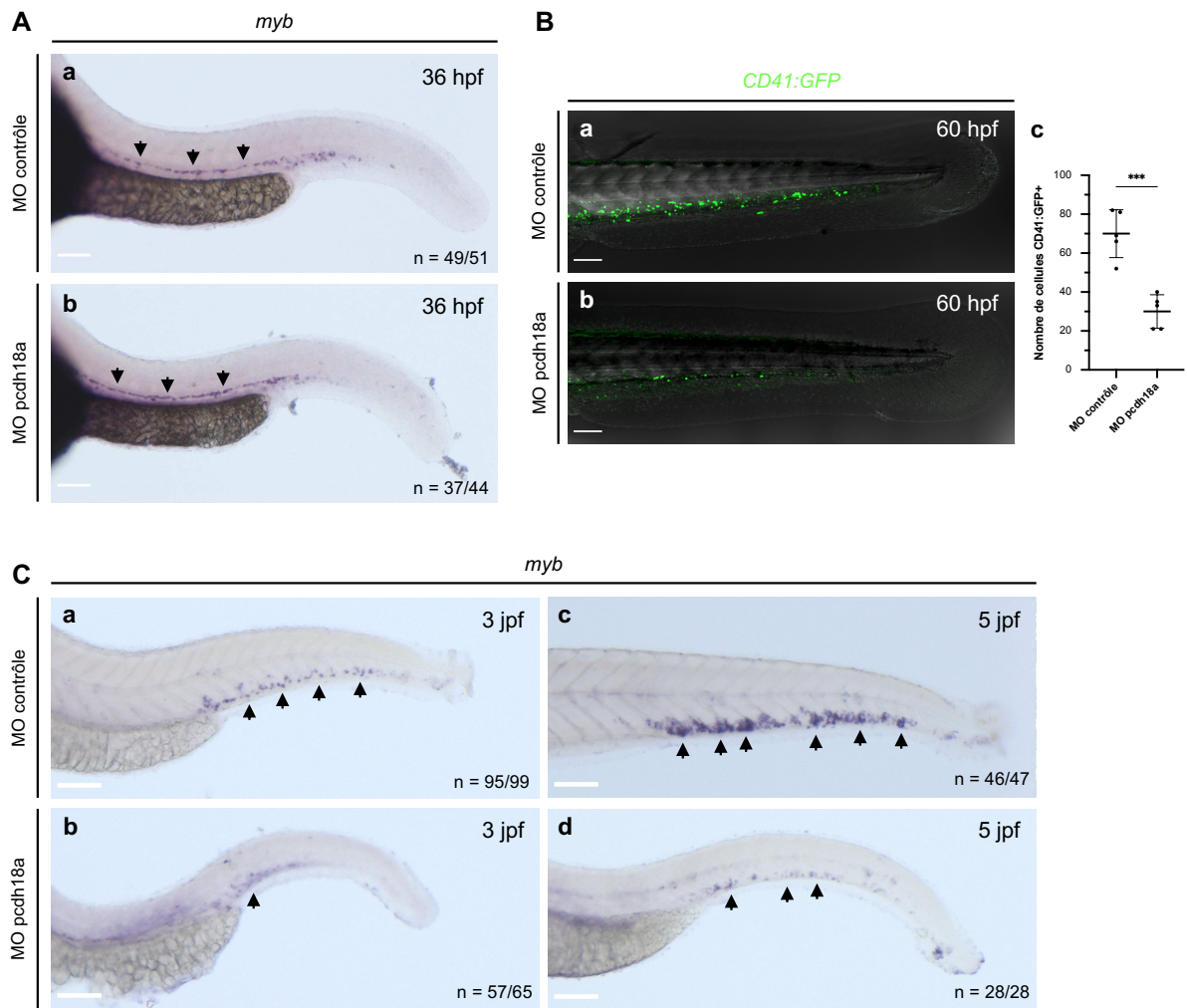


Figure R29 – Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ altère la fonction du THC

A) WISH marquant le gène *myb* à 36 hpf, réalisée sur embryon entiers, injectés avec le MO contrôle (**a**) ou le MO pcdh18a (**b**). Le signal *myb* est légèrement plus fort chez les morphants par rapport aux contrôles au niveau de l'aorte dorsale (flèches), ce qui montre que les CSPH peuvent être produites en condition morphant. *Barre d'échelle* : 100 μ m. **B)** Projections maximales d'acquisitions confocales *in vivo* à 60 hpf, d'embryons Tg(*CD41:GFP*) injectés avec le MO contrôle ou le MO pcdh18a. **a/b**) Superposition avec le canal fond clair. *Barre d'échelle* 100 μ m. **c)** Comptage du nombre de cellules CD41:GFP+ dans le THC à 60 hpf de 5 embryons par condition. Le test de Student indique une diminution hautement significative du nombre de CSPH dans la niche des morphants (moyenne de 30 cellules) par rapport aux contrôles (moyenne de 70 cellules), ($p = 0,0003$). **C)** WISH marquant le gène *myb* à 3 jpf (**a/b**) et 5 jpf (**c/d**), réalisée sur embryon entiers, injectés avec le MO contrôle (**a/c**) ou le MO pcdh18a (**b/d**). Chez les contrôles, les cellules *myb* positives sont réparties de façon homogène dans l'ensemble du THC à 3 jpf et le signal est plus intense à 5 jpf (flèches). Les morphants présentent beaucoup moins de cellules *myb* positives dans leur THC, ce qui montre que les CSPH ne sont pas capables de se loger et de proliférer dans la niche hématopoïétique en condition morphant. *Barre d'échelle* : 100 μ m.

Discussion

Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que la protocadhérine 18a est bien plus qu'une simple molécule impliquée dans l'adhésion cellulaire. Exprimée par les cellules stromales de la future niche hématopoïétique au cours de leur développement, cette protéine est essentielle pour moduler le cytosquelette d'actine et permettre la migration cellulaire. Elle est aussi importante pour médier les interactions avec les éléments adjacents, afin de répondre à la présence de cellules voisines. Nos résultats mettent en évidence un rôle dual des interactions homophiles de Pcdh18a sur la migration des progéniteurs des cellules stromales, ainsi que des interactions hétérophiles de type adhésif qui permettent l'attachement des cellules stromales sur les cellules endothéliales. Enfin, ils montrent *in vivo* que les cellules endothéliales sont capables de réagir au défaut de Pcdh18a dans les progéniteurs des cellules stromales en augmentant leur production de matrice extracellulaire, en l'occurrence de fibronectine.

Cette partie vise à replacer les résultats obtenus dans un contexte plus général, afin de mettre en parallèle mes conclusions et celles d'autres études, et de proposer des modèles sur les mécanismes mis en jeu. J'ai essayé, dans la mesure du possible, de conceptualiser les hypothèses émises sous forme de schémas, de manière à obtenir un rendu visuel de mon interprétation des données. Cette réflexion tente d'apporter une meilleure compréhension de mes travaux et de soulever des perspectives intéressantes pour étayer cette étude par la suite.

Pcdh18a contribue à la migration des cellules stromales

Les cellules mésenchymateuses ont une organisation polarisée de leur réseau de cytosquelette, qui représente le moteur de la migration dirigée. Un grand nombre d'acteurs sont impliqués comme des protéines de polarité, des molécules d'ancrage et senseurs, ou encore des acteurs de la polymérisation d'actine. Il est bien connu que leur dérégulation est à l'origine de sévères dysfonctionnements de la migration, mais aussi d'altération de transmission de signaux, qui peuvent modifier les réponses cellulaires.

Dans notre modèle où Pcdh18a est tronquée dans sa partie cytoplasmique, l'empêchant d'interagir avec l'actine, les cellules stromales présentent une migration moins dirigée et des vitesses de déplacement plus faibles (**Figure D1**). Tout d'abord, cela identifie Pcdh18a comme

indispensable et essentielle à la migration des cellules stromales puisque les autres acteurs moléculaires ne sont pas capables de compenser son altération. Les protocadhérines $\delta 2$ ont la capacité d'induire le recrutement du complexe WAVE au niveau des lamellipodes lors de la migration cellulaire. Il a été montré que leur perturbation provoque des défauts de migration axonale (Biswas et al., 2014; Hayashi et al., 2014) et d'autres types cellulaires (Aamar and Dawid, 2008; Williams et al., 2018). Dans notre cas, la Pcdh18a des cellules stromales n'est plus en mesure d'interagir correctement avec le cytosquelette d'actine car son site de liaison avec WAVE est absent. Or, la polymérisation d'actine est cruciale pour la génération de forces qui poussent la membrane cellulaire vers l'avant et permet la naissance de nouvelles adhésions focales au niveau des pseudopodes, nécessaires à l'ancrage de la cellule à la matrice et à la génération de forces de traction. Ces adhésions focales sont dites stables lorsque le groupe d'intégrines engagé dans la liaison à la matrice a une surface suffisamment importante. Le niveau de stabilité influence les forces adhésives et la tension exercée sur le cytosquelette d'actine (Coyer et al., 2012). Le phénotype que nous avons observé peut-être expliqué par une dérégulation de la dynamique de l'actine, dû à son absence d'interaction avec une des protéines qui l'ancre à la membrane. L'extension du lamellipode est alors réduite, ce qui diminue la probabilité de formation de nouvelles adhésions focales. Les forces sont plus faibles, ce qui se répercute sur la vitesse de migration et les trajectoires cellulaires, puisque le front de migration est moins défini.

En condition où Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée, les cellules stromales présentent le même nombre de filopodes que chez les contrôles, mais orientés de façon plus aléatoire (**Figure D1**). Ces résultats suggèrent que la disruption de l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane via l'intermédiaire de WAVE n'a pas d'effet sur la formation des filopodes. Cela a été confirmé par (Steffen et al., 2006) qui ont montré *in vitro* que la sous-expression de Nap1, composant du complexe WAVE, a bien un effet néfaste sur la formation des lamellipodes mais ne modifie pas le nombre de filopodes et leur vitesse de formation. Il semble que le phénotype que nous avons observé soit alors davantage dû à des difficultés de la cellule à capter les signaux environnants. La cellule y répond en générant des protrusions membranaires dans toutes les directions, augmentant ses chances de rencontrer un signal. Dans notre contexte, le facteur spécifique qui attire les cellules stromales en direction ventrale n'a pas encore été découvert. Les difficultés de sondage de l'environnement peuvent être dues à une présence plus faible ou plus diffuse des molécules dans l'environnement, ou bien à des problèmes d'accès à ces molécules.

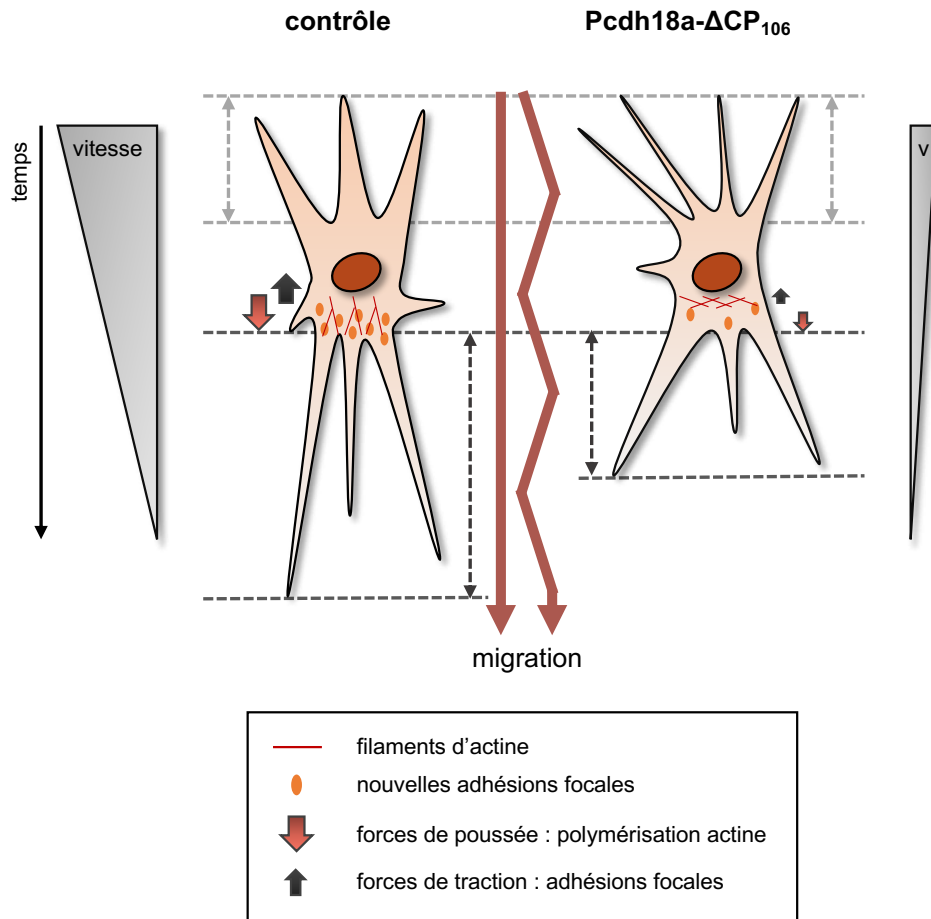


Figure D1 – Pcdh18a contribue à la migration des cellules stromales

a) Au cours de leur migration, les progéniteurs des cellules stromales émergent des somites et migrent ventralement jusqu'au futur THC. Lors des deux premières heures de migration, les cellules migrent rapidement et de manière rectiligne, puis la vitesse décroît au fil du temps. Les cellules peuvent soit s'arrêter dans le THC et se différencier en cellules spécialisées soit continuer leur chemin jusqu'à la nageoire caudale. La cellule avance grâce à la polymérisation de l'actine qui pousse le lamellipode vers l'avant et permet la formation de nouvelles adhésions focales. Les filopodes sont plutôt dirigés dans le sens de la migration, ce qui montre que la cellule est capable d'assimiler les signaux extracellulaires et d'y répondre, afin de diriger sa migration jusqu'à son site final. **b)** Dans le modèle proposé, lorsque Pcdh18a est dépourvue de sa partie cytoplasmique, elle ne peut plus interagir avec le cytosquelette d'actine via le complexe WAVE. La migration cellulaire est ralentie, du fait de problèmes de polymérisation de l'actine. La cellule répond par l'envoi de projections de membrane dans toutes les directions, reflétant des difficultés à sonder l'environnement et à répondre aux gradients moléculaires.

En effet nous avons vu que les embryons qui expriment Pcdh18a- Δ CP₁₀₆, présentent une production nettement plus forte de fibronectine dans l'espace extracellulaire dès le stade de migration des progéniteurs des cellules stromales. Or la matrice extracellulaire joue le rôle de réservoir de molécules signalisatrices, qui sont normalement sous forme de gradients, indiquant le chemin aux cellules. Les niveaux plus élevés de fibronectine peuvent influencer la localisation et l'accès à ces molécules. De plus, nous avons constaté que les cellules stromales migrent d'abord sur une matrice de cellules endothéliales (la paroi de la veine primitive), avant de participer à la formation du plexus veineux caudal (et il est probable que les interactions

entre les deux types cellulaires fassent appel dès ce stade aux peptides REDV de Pcdh18a). Il est possible que chez les embryons exprimant Pcdh18a- Δ CP₁₀₆, la présence beaucoup plus abondante de fibronectine à la surface de l'endothélium entre en compétition avec les cellules stromales pour leur adhésion sur la paroi de la veine primitive, ce qui pourrait modifier leur comportement migratoire. Néanmoins, les cellules stromales parviennent à leur site final de migration, ce qui signifie que des signaux sont tout de même perçus et parviennent à guider ces cellules.

Enfin, nous avons vu que la migration des cellules stromales se déroule en plusieurs phases. La première étape de migration précoce correspond aux premières 90 minutes après émergence du somite. La vitesse cellulaire est plutôt élevée et il est probable que ce moment corresponde à la migration des progéniteurs sur la paroi de la veine caudale primitive, donc plutôt en 2D. Ensuite, lorsque la cellule atteint le bord ventral de la veine primitive, il est possible qu'elle marque un temps d'arrêt, dû au changement de type de substrat, ce qui correspondrait à la phase décisionnelle que nous avons repérée (**Figure R10-Ca**). Ensuite lors de la phase de migration tardive, la cellule progénitrice pourrait soit rester à l'endroit où elle se trouve, soit continuer son chemin et participer à la co-migration avec les cellules endothéliales pour la formation du plexus veineux caudal. Il s'agirait alors d'une migration en 3D dans l'ECM, ce qui pourrait expliquer la diminution des vitesses de migration. Chez les morphants, les cellules stromales ont des vitesses de migration plus faibles que les contrôles, ce qui est particulièrement marqué lors de la phase initiale de migration sur la veine primitive. Néanmoins, nous n'avons pas observé de différence notable quant au moment d'arrivée des cellules stromales au niveau de la partie ventrale de la veine primitive, où elles entament leur co-migration avec les cellules endothéliales qui vont former le plexus veineux.

La partie cytoplasmique de Pcdh18a est requise pour la régulation des interactions homophiles

En plus d'être importante pour relier les protéines transmembranaires au cytosquelette, la partie cytoplasmique des protéines est nécessaire pour la transmission de signaux sous différentes formes. En général, la fixation de ligands extracellulaires active un signal par phosphorylation ou changement conformationnel, qui recrute d'autres molécules et déclenche une cascade de signalisation, ou encore, par un clivage qui transduit un signal au noyau et active la transcription de gènes. Les protocadhérines $\delta 2$ ont un domaine SH3 de liaison aux kinases

Src, qui peut potentiellement leur procurer des capacités activatrices de ces kinases. De plus, elles possèdent des domaines conservés CM1 et CM2 dans leur partie cytoplasmique dont la fonction n'est actuellement pas connue.

Par rapport aux cadhérines classiques, les capacités adhésives des protocadhérines sont moins fortes, et bien qu'elles possèdent des parties extracellulaires similaires, leurs propriétés adhésives diffèrent (Bisogni et al., 2018). Nos résultats montrent que dans la migration semi-collective des précurseurs des cellules stromales, l'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ provoque une augmentation des contacts durables entre cellules meneuses, suggérant une fonction répulsive, ou du moins inhibitrice d'adhésion, de la partie cytoplasmique lors de ces interactions chez l'embryon normal. Ceci a été observé pour d'autres protocadhérines δ 2 dans des contextes différents. Lorsque Pcdh17 est exprimée en l'absence de sa partie cytoplasmique, les axones ont tendance à s'agglutiner et la migration des motoneurones est altérée, ce qui n'est pas le cas lors de l'expression de la protéine entière (Asakawa and Kawakami, 2018). Par ailleurs, des cellules transfectées avec Pcdh19 entière forment des agrégats plus petits que lorsque la protéine est déléetée de son domaine cytoplasmique (Tai et al., 2010). Ces études indiquent que la partie cytoplasmique des protocadhérines δ 2 est nécessaire pour transmettre un signal répulsif entre cellules, mais le mécanisme d'action est resté inconnu. A ce titre, il est bon de préciser que les études portant sur les expériences d'agrégation/dissociation des différentes protocadhérines δ ont été réalisées avec la partie extracellulaire des protéines uniquement (Bisogni et al., 2018; Harrison et al., 2020).

Cette fonction d'inhibition de contact/répulsion peut être mise en parallèle avec le mécanisme bien décrit CIL (pour « Contact Inhibition Locomotion »). Ce phénomène se fait en plusieurs étapes avec, dans un premier temps, la reconnaissance du contact par la cellule, puis la transmission du signal en intracellulaire et se termine par l'arrêt de la cellule avec sa repolarisation, afin de modifier la trajectoire de migration. Le mécanisme CIL est important pour la migration semi-collective des cellules de la crête neurale et implique notamment la cadhérine-11 chez le xénope (Becker et al., 2013). Il a été montré que cette cadhérine forme des interactions homophiles et qu'elle est à l'origine d'une réponse répulsive après collision cellulaire. Sa présence est requise pour diriger et réguler la migration puisque la perte de ses capacités adhésives procure des propriétés invasives aux cellules. Nos résultats montrent qu'en condition où Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée, les cellules meneuses de la migration en chaîne des précurseurs des cellules stromales tendent à établir des interactions durables entre elles, ce

qui modifie leurs trajectoires, au lieu d'interagir ponctuellement, via leurs filopodes, sans modifier leurs trajectoires. Il semble donc qu'en absence d'une grande partie du domaine cytoplasmique de Pcdh18a, ces cellules n'aient plus la capacité de réagir convenablement aux contacts. Notre étude n'a pas porté sur la localisation des protéines de polarité cellulaire. Il n'est donc pas possible de statuer plus avant sur l'implication de Pcdh18a dans l'inhibition de contact à proprement parler. Le mécanisme proposé est d'ordre plus général (**Figure D2**). Il fait intervenir une transmission de signal après contact homophile, qui nécessite la présence de la partie cytoplasmique. Une réponse répulsive est alors générée, ce qui empêche les cellules de former des contacts forts et persistants. En condition mutée, la transmission de signal est bloquée par l'absence de la partie cytoplasmique de la protéine, ce qui résulte en une augmentation de l'adhésion, détectable par des temps de contacts plus longs.

Par ailleurs, notre expérience d'expression d'une forme dominante négative, où la partie extracellulaire de Pcdh18a est sécrétée (Pcdh18a- Δ CPT), suggérant qu'une disruption mécanique des interactions homophiles, n'a pas eu d'effet notable sur le développement des cellules stromales. Une observation similaire a été faite suite à l'expression de Pcdh17- Δ CPT, qui n'a pas eu d'effet sur l'agglutination des axones lors du développement des motoneurones (Asakawa and Kawakami, 2018). Cela peut suggérer que la forme soluble se fixe trop transitoirement sur les protocadhérines endogènes pour perturber les interactions, ou bien qu'il soit nécessaire qu'il y ait un signal de tension mécanique sur le cytosquelette d'actine pour produire un signal, activé uniquement par le contact de deux cellules mais pas par la fixation de la forme soluble. Dans tous les cas, ces résultats confirment que les régulations sont régies par la partie cytoplasmique de la protéine.

Enfin, il est aussi possible que Pcdh18a coopère ou interagisse d'une certaine manière, par contact physique ou régulation génique, avec d'autres acteurs, comme la protéine d'adhésion Alcama. Cette Ig-CAM est exprimée par les progéniteurs des cellules stromales comme Pcdh18a, à partir du stade de leur manifestation morphologique initiale dans les somites en tant qu'amas cellulaires ventraux (au stade S₅ de maturation du somite). Immunodétectée à la membrane des cellules de l'amas, Alcama perdure au cours de leur migration au niveau des zones de contact entre les cellules. La perte de fonction de cette protéine induit une diminution du nombre de progéniteurs qui émergent du somite et une altération de leur migration semi-collective en chaînette, qui ressemble à ce que nous avons observé lors de la perte de fonction de Pcdh18a (Murayama et al., manuscrit en préparation). Il est possible qu'Alcama soit plutôt

responsable du maintien des interactions cellulaires lors des premières heures de migration, et que Pcdh18a soit davantage impliquée dans la dissociation des interactions, ou du moins dans la médiation d'interactions moins fortes, participant à la séparation des chaînettes de migration en empêchant les cellules meneuses des différentes chaînettes d'interagir trop fortement entre elles.

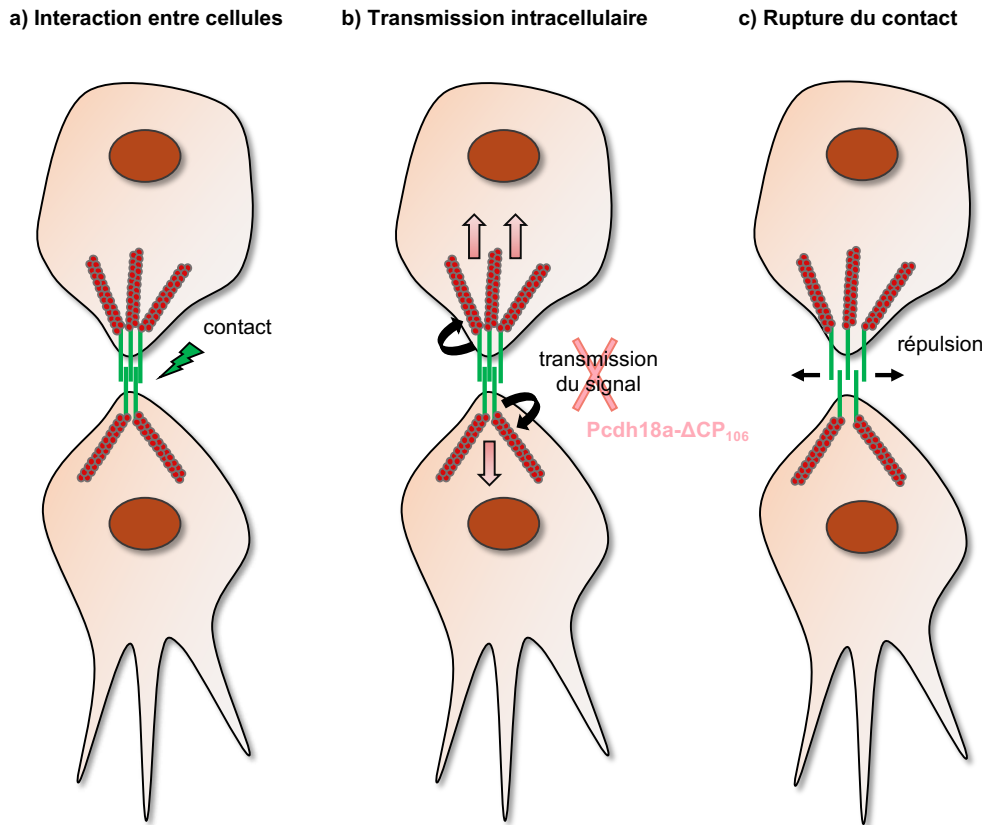


Figure D2 – La partie cytoplasmique de Pcdh18a est nécessaire à la régulation du contact homophile

Le modèle présenté montre les progéniteurs des cellules stromales en migration, exprimant Pcdh18a (vert). **a)** Deux cellules stromales entrent en contact ; les domaines extracellulaires de leurs Pcdh18a engagent des interactions homophiles. **b)** Cette interaction est détectée par la partie cytoplasmique de Pcdh18a, peut-être sous la forme d'un changement conformationnel, induisant éventuellement d'autres événements de signalisation intracellulaire. Le signal ne peut pas être transmis lorsque Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée car il manque une grande partie du domaine cytoplasmique de la protéine. **c)** Par un mécanisme aujourd'hui inconnu, il y aurait une réaction répulsive de Pcdh18a, qui régule négativement l'intensité du contact en extracellulaire. Lorsque Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée, le contact serait plus fort et persistant, dû à l'absence de la réponse répulsive au niveau extracellulaire.

Il a par ailleurs été montré que les protocadhérines $\delta 2$ ont la capacité d'emporter avec elles des molécules transmembranaires lors de leur recyclage par endocytose, et que cette endocytose nécessite la présence de la partie cytoplasmique de la protéine. En effet, Pcdh8 peut s'associer en *cis* au niveau des synapses avec la N-cadhérine, et a la capacité d'induire son

endocytose, ce qui participe à réguler le nombre de dendrites (Yasuda et al., 2007). De même, lors du développement de la plaque préchordale de l'embryon de poisson zèbre, la Pcdh18a emporte avec elle la E-cadhérine dans des endosomes de recyclage, mais reste bloquée à la membrane en absence de son domaine cytoplasmique (Bosze et al., 2020). Dans notre cas, la E-cadhérine n'est pas exprimée par les cellules stromales, mais nous pouvons nous demander si Pcdh18a n'emporterait pas de façon similaire des protéines voisines lors de son endocytose.

Rôle de Pcdh18a dans la production et la différenciation des cellules stromales du THC

Lorsque Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée par les cellules stromales, le nombre de cellules produites à 26 hpf est similaire, mais augmente ensuite très peu jusqu'à 36 hpf, alors que chez les contrôles il double entre 26 et 36 hpf. Nos données indiquent que cette différence n'est pas due à un taux de division cellulaire plus faible chez les morphants. Il semble que ce soit davantage la quantité de progéniteurs, produits à partir des somites, qui diffère entre les deux conditions, où la durée d'émergence cellulaire serait réduite chez les morphants, avec une production qui s'arrêterait autour de 26 hpf. Il est possible que l'arrêt précoce de l'émergence des précurseurs des cellules stromales chez les morphants soit dû à la forte production de fibronectine dès 26 hpf (cf. **Figures R26-B et R27-B**), en périphérie des amas cellulaires ventraux des somites, ce qui bloquerait ou du moins perturberait la sortie cellulaire. Aux stades plus tardifs du développement (36-46 hpf), le nombre de cellules stromales est diminué de moitié chez les morphants, ce qui explique que le taux de division cellulaire soit deux fois plus faible.

Une des conséquences est que les morphants ont 2.5 fois moins de cellules stromales périvasculaires (CSP) que les contrôles au niveau de la partie ventrale de l'artère caudale. Le recrutement des CSP se fait via la sécrétion de PDGF- β par les cellules endothéliales, qui est capté par le récepteur PDGFR- β des CSP. Chez les morphants, le ratio de cellules stromales qui expriment PDGFR- β dans le THC est deux fois plus élevé que chez les contrôles, ce qui suggère un phénomène de compensation. Dans ce contexte de stress, il est possible que les cellules endothéliales sécrètent davantage de PDGF- β dans l'environnement, et que ce facteur de croissance ait un effet de régulation positive sur son récepteur au niveau des cellules stromales avoisinantes (**Figure D3**). Cependant, malgré cela, l'altération de Pcdh18a ne leur permettrait pas de rétablir le nombre normal de cellules stromales périvasculaires autour des vaisseaux.

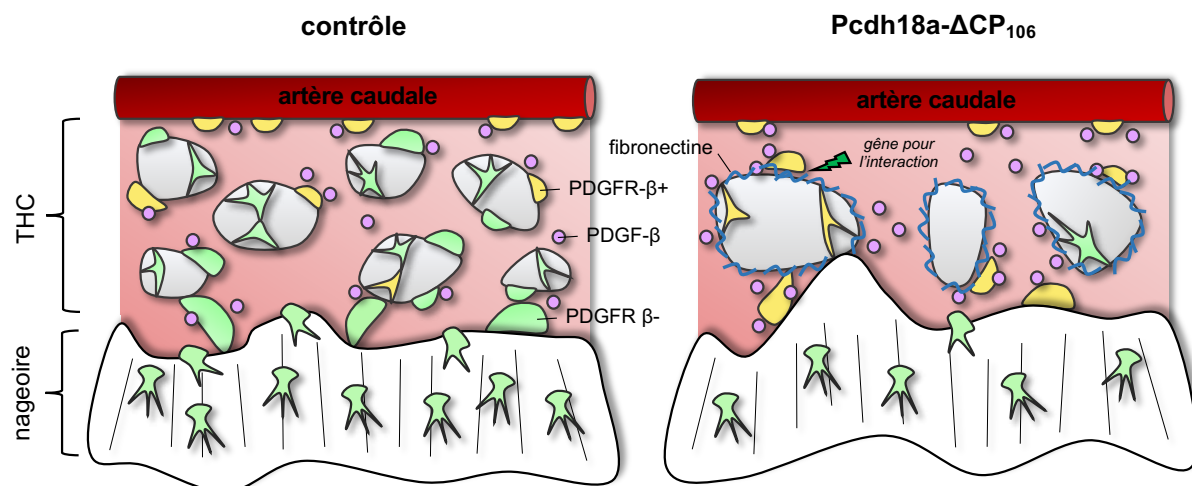


Figure D3 – Pcdh18a dans le développement et la différenciation des cellules stromales

A 50 hpf, les embryons exprimant Pcdh18a-ΔCP₁₀₆ ont environ deux fois moins de cellules stromales dans leur THC, avec une baisse de près de moitié du nombre de CSP. Le modèle propose alors une réponse des cellules endothéliales au stress engendré par le manque de CSP, avec une sécrétion plus importante du facteur de croissance PDGF-β, pour tenter d'en recruter davantage. Suite à une réponse positive, les cellules stromales exprimeraient à des niveaux plus élevés PDGFR-β mais le recrutement des cellules stromales périvasculaires serait gêné par la présence de fibronectine surabondante à la surface des cellules endothéliales.

Les protocadhérines sont plutôt connues pour leur interactions homophiles. Néanmoins, nous nous sommes intéressés à l'identification de certains motifs dans la partie extracellulaire des protocadhérines δ2 qui seraient susceptibles d'interagir avec les cellules endothéliales. Les PCDH17 et PCDH19 possèdent un peptide RGD dans leur partie EC2, dont la position est conservée, mais qui n'a jamais été étudié pour ses éventuelles interactions avec les intégrines. La PCDH18 que nous avons étudiée ne possède pas de domaine RGD, cependant elle comporte deux domaines REDV dans ses parties EC1 et EC5. Ce peptide a été identifié pour la première fois dans la fibronectine plasmatique humaine, comme interagissant avec les cellules endothéliales (Hubbell et al., 1991). Depuis, peu d'études se sont intéressées à sa caractérisation et à l'identification de son partenaire de fixation. Nos résultats montrent pour la première fois *in vivo* que ce peptide semble effectivement essentiel pour l'interaction directe des cellules stromales avec les vaisseaux, qui les conduit à devenir des cellules stromales périvasculaires. Sa mutation induit une adhésion incomplète au vaisseau chez certaines cellules stromales de morphologie périvasculaire, tandis que sa surexpression à la surface des cellules stromales conduit à une très forte augmentation (de 20% à 80%) de la proportion des cellules stromales qui deviennent des CSP. Les PCDH8 et PCDH10 ne possèdent pas de peptides RGD ou REDV dans leur partie extracellulaire. La fonction d'interaction de Pcdh18a avec les cellules endothéliales, via le motif REDV, serait donc propre à cette protéine au sein des

protocadhérines $\delta 2$. Cela souligne le rôle dual de Pcdh18a, qui serait impliquée dans la migration des cellules stromales aux étapes précoces du développement via des interactions homophiles, mais aussi dans les interactions cellules stromales-endothéliales via des interactions hétérophiles, au cours de la migration des cellules stromales sur la paroi de la veine primitive puis lors de la formation du plexus veineux caudal.

Réponse des cellules endothéliales aux modifications du protéome des cellules stromales.

Nos résultats ont décrit deux réponses principales des cellules endothéliales à l'expression de la forme tronquée de Pcdh18a par les cellules stromales : une augmentation de la production de fibronectine et une altération de l'angiogenèse au cours de la formation du plexus veineux puis de la veine définitive. Il est fort possible que ces deux perturbations soient liées.

L'angiogenèse des morphants est présente mais est désorganisée. Les embryons se développent normalement jusqu'à 24 hpf ; la vasculogenèse n'est pas affectée car la veine primitive est correctement formée. L'angiogenèse démarre, à partir du bord ventral de la veine primitive, mais les interactions entre cellules stromales et endothéliales sont diminuées, voire absentes à certains endroits, ce qui semble altérer la migration et les interactions des cellules endothéliales. De plus, les cellules stromales paraissent regroupées chez les morphants, ce qui peut s'expliquer par l'absence d'inhibition de contact entre cellules de ce type. Les distances entre les cellules endothéliales en migration sont alors plus grandes, ce qui peut perturber leur rencontre et la formation des structures vasculaires. Les cellules endothéliales émettent beaucoup moins de filopodes que chez les embryons contrôles, et fusionnent plus rapidement après contact, ce qui résulte en un réseau vasculaire mal formé. Les boucles du plexus sont plus larges et en nombre insuffisant, la veine caudale définitive est dans la plupart des cas interrompue.

Dans les étapes précoces, la réponse des cellules endothéliales pourrait éventuellement s'expliquer par le défaut de contact avec les cellules stromales. En effet, à 26 hpf il y a le même nombre de cellules stromales dans le THC, mais il y a déjà une surexpression de la fibronectine par les cellules endothéliales de la veine primitive à ce stade. Comme vu précédemment, la migration des cellules stromales qui expriment Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est altérée, sans doute suite à des défauts dans la dynamique de l'actine, qui pourraient générer un stress. Il est possible que

les cellules stromales envoient alors un signal aux cellules endothéliales, les invitant à produire davantage de matrice extracellulaire. Une étude sur l'induction de tumeurs, réalisée chez la souris, a montré que l'expression de la GFP sous le promoteur VEGF est enrichie dans les fibroblastes autour du nodule néoplasique et promeut l'angiogenèse ainsi que la croissance tumorale. Le signal GFP n'est pas retrouvé au sein de la tumeur, ce qui montre que les fibroblastes sont capables de répondre à un stimulus en sécrétant davantage de VEGF, capté ensuite par les cellules endothéliales du microenvironnement (Fukumura et al., 1998). Dans le modèle présenté en Figure D4, le signal reçu par les cellules endothéliales est représenté de façon générale comme un stimulus externe qui active les cellules pour produire davantage de matrice extracellulaire. Quel que soit ce stimulus, nos données ont mis en évidence une expression quatre fois plus importante de la fibronectine en condition morphant, et le dépôt massif de cette protéine fibreuse sur le plexus veineux à 36 hpf. De plus, par immunohistochimie (résultats non montrés), nous avons détecté sur les cellules endothéliales l'expression de la chaîne d'intégrine $\alpha 5$ qui, en hétérodimère avec la chaîne $\beta 1$, est connue pour interagir avec le(s) peptide(s) RGD de la fibronectine (et la fibronectine 1b surexprimée ici contient deux peptides RGD). Il apparaît probable que l'interaction forte des cellules endothéliales avec cette fibronectine surabondante ait de multiples conséquences sur leur comportement, y compris sur les événements plus tardifs lors du remodelage du plexus et de la formation de la veine caudale définitive (voir plus loin).

Au stade où le plexus se remodèle et où l'angiogenèse est active, la niche contient environ deux fois moins de cellules stromales lorsqu'elles expriment Pcdh18a- Δ CP₁₀₆. Cette quantité plus faible de cellules peut avoir de multiples conséquences sur le développement du plexus : d'une part la probabilité de rencontre et de contact des cellules stromales et endothéliales est réduite, et d'autre part les concentrations de molécules sécrétées par les cellules stromales sont diminuées. A cela s'ajoutent les niveaux élevés de fibronectine présents dans le microenvironnement, qui pourraient piéger des molécules signalisatrices et désorganiser des gradients de cytokines et de facteurs de croissance à l'origine de la migration dirigée. Le dépôt intense de fibronectine sur les cellules endothéliales pourrait aussi par lui-même les empêcher de migrer correctement, si elles n'ont pas suffisamment de métalloprotéases pour la dégrader, au moins partiellement. Enfin, il est possible que cette gaine de fibronectine interfère avec l'interaction cellules endothéliales / cellules stromales, médiée par le peptide REDV de la Pcdh18a à la surface des cellules stromales, qui promeut leur différenciation en CSP pleinement adhérents à l'endothélium. A 50 hpf, dans les embryons contrôles, la plupart des CSP sont

retrouvés autour de la veine caudale définitive. La formation de celle-ci peut être particulièrement touchée par le défaut de cellules stromales périvasculaires, aussi bien au niveau des contacts physiques, qu'au niveau de l'accès aux molécules qu'ils sécrètent. L'ensemble de ces régulations est repris dans le modèle proposé, qui se veut assez général mais évocateur de possibilités (**Figure D4**).

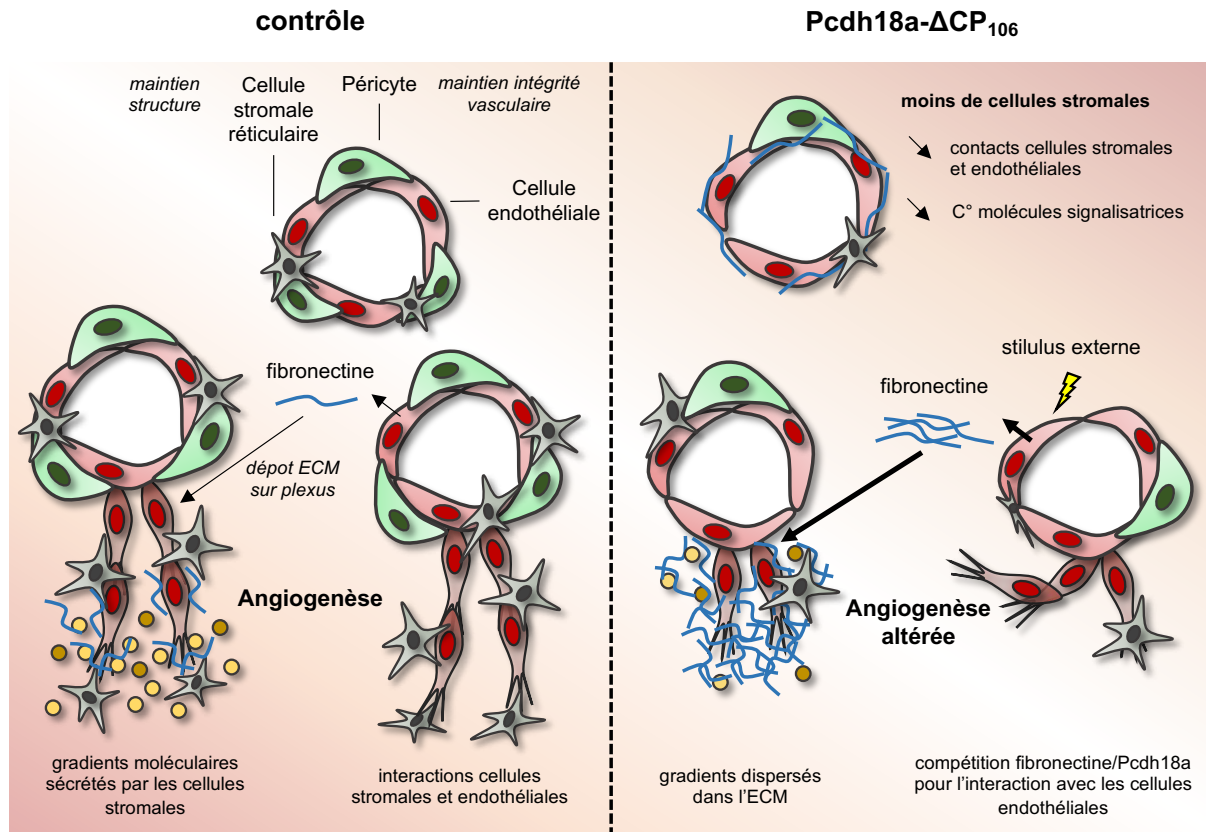


Figure D4 – Réponse des cellules endothéliales à l'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆

En condition contrôle, il y a au final une homéostasie entre les cellules stromales réticulaires qui maintiennent le plexus, les cellules stromales périvasculaires qui maintiennent l'intégrité des vaisseaux et les cellules endothéliales qui composent le réseau vasculaire du THC. Aux alentours de 25 hpf, les cellules endothéliales entament leur angiogenèse à partir de la veine caudale primitive et migrent en interaction proche avec les cellules stromales. Pour migrer, les cellules endothéliales nécessitent des contacts avec l'ECM afin de générer des forces de traction. Le modèle présenté propose certains facteurs qui peuvent expliquer l'altération de l'angiogenèse lorsque Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ est exprimée par les cellules stromales. A partir de 26 hpf et au moins jusque 36 hpf, les cellules endothéliales expriment davantage la fibronectine suite à un stimulus extérieur, probablement un signal envoyé par les cellules stromales (stress migratoire ou problème d'interaction). Le dépôt plus important de fibronectine sur le plexus peut perturber la migration des cellules endothéliales. De plus, le nombre réduit de cellules stromales dans le THC diminue les concentrations de molécules signalisatrices sécrétées, qui tendent à être piégées et dispersées dans la matrice dense. Enfin, l'altération du recrutement des CSP, et en particulier au niveau de la veine caudale définitive, peut être à l'origine des défauts de développement observés à cet endroit.

Perspectives

Ces travaux de thèse ont pleinement tiré avantage des caractéristiques de l'embryon de poisson zèbre qui se prête particulièrement à la microscopie live *in vivo*. Nous avons pu étudier le dynamisme d'une migration cellulaire dans un environnement complexe. De façon surprenante, la fibronectine s'est avérée être surexprimée en condition où *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* est exprimée par les cellules stromales au lieu de la protéine complète. Des études se sont intéressées à la migration *in vitro* de fibroblastes sur des matrices de fibronectine, mais cela a rarement été étudié *in vivo* où la complexité de l'environnement joue un rôle primordial. Toutefois, il a été montré *in vivo* que la fibronectine est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale, qui présente des similarités avec la migration des cellules stromales que nous avons étudiée. Cette surexpression de fibronectine ne nous permet pas de savoir avec certitude quels sont les phénotypes spécifiques de la mutation de *Pcdh18a* et quels sont ceux qui sont dus aux changements de l'environnement extracellulaire. Il serait bien par la suite de se placer en condition de surexpression de *fn1b* sans que *Pcdh18a* ne soit mutée, par exemple avec l'utilisation d'un promoteur *hsp70* pour une induction vers 24 hpf, et d'observer les effets sur le développement des cellules stromales et du plexus veineux caudal. Ceci permettrait de déterminer les effets indirects, dus à la surexpression de fibronectine, notamment au niveau de l'angiogenèse qui est connue comme sensible aux variations des composants de l'ECM. Aussi, il pourrait être intéressant de se placer en condition de sous-expression de *fn1b*, tout en mutant *Pcdh18a*. L'utilisation d'un morpholino à action directe, dirigé contre *fn1b* risque d'être délétère pour le développement embryonnaire précoce. Il serait possible d'essayer la méthode de co-injection du morpholino normal avec son morpholino de séquence complémentaire (anti-MO) photo-clivable, qui permet d'induire l'activité du morpholino au stade désiré. Ceci est possible en exposant l'embryon co-injecté sous une source UV, dans notre cas autour de 22 hpf au niveau de la région caudale, ce qui induit le clivage de l'anti-MO et libère le morpholino qui peut alors se fixer sur sa séquence complémentaire d'ARN. Ceci permettrait d'étudier les effets directs de la mutation *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆* sans la surexpression de fibronectine. Cependant, des tests préalables, notamment sur l'efficacité du clivage et la toxicité de la co-injection avec l'exposition aux UV, s'imposent.

Aussi, au niveau de la migration cellulaire, nous n'avons pas identifié la ou les molécule(s) importante(s) pour guider les cellules stromales à leur site d'arrivée. En général la migration collective, ou semi-collective, fait appel à des molécules signalisatrices de type cytokines ou facteurs de croissance qui guident, sous forme de gradients présents dans l'environnement extracellulaire, les cellules au cours de leur migration. Il serait bien à l'avenir d'identifier ces molécules attractrices et d'évaluer si leur sous-expression récapitulerait, du moins en partie, le phénotype migratoire observé sur la migration des cellules stromales et/ou l'altération de la formation du plexus veineux caudal des embryons morphants. Egalement, il serait bien d'évaluer avec plus de précision l'influence de la répartition des cellules stromales sur le développement du plexus veineux caudal. Il semble, chez les embryons contrôles, que les structures vasculaires se forment autour des cellules stromales individuelles et que l'emplacement de celles-ci, en plus des interactions cellulaires, soit alors important pour organiser l'angiogenèse. Chez les morphants, les cellules stromales paraissent plus regroupées et localisées à certains endroits du plexus. Si cela constitue un phénotype caractéristique, il pourrait expliquer pourquoi les boucles du plexus sont plus larges et en nombre réduit chez les embryons exprimant *Pcdh18a-ΔCP₁₀₆*.

Au niveau des interactions homophiles médiées par les protocadhérines $\delta 2$, la notion de répulsion avait déjà été évoquée dans d'autres études sans parvenir à déterminer le mécanisme mis en jeu. C'est un concept intéressant mais difficile à se représenter puisque la famille des cadhérines est plutôt connue comme impliquée dans la médiation d'interactions. De plus, il n'a jamais été décrit d'éventuel changement conformationnel des protocadhérines $\delta 2$, procurant un repliement activé pour l'adhésion et un autre désactivé pour la répulsion. Aussi, le fait que la production d'une forme secrétée, susceptible d'entrer en compétition avec les interactions homophiles, n'ait pas conduit à observer de phénotype est intrigant. En effet, on s'attendait à une diminution de l'intensité des interactions cellulaires, qui aurait conduit à des problèmes, mêmes mineurs, sur le développement du THC. Il est d'ailleurs possible que la sous-expression de *Pcdh18a* n'aurait pas provoqué le phénotype observé mais que ce soit grâce à l'utilisation du morpholino, qui délète la protéine d'une partie de son domaine cytoplasmique, que nous ayons pu obtenir les résultats décrits. La partie cytoplasmique de *Pcdh18a* semble donc indispensable à la régulation de l'adhésion cellulaire et il serait intéressant pour la suite de comprendre les éléments et mécanismes mis en jeu. Est-ce que la protéine est capable d'avoir deux configurations ON/OFF ? Est-ce le contact extracellulaire avec une autre protéine qui

induit le signal ? Le cytosquelette d'actine est-il important pour transmettre le signal ? Est-ce que la répulsion fait appel à une autre molécule transmembranaire ?

Nous avons également évoqué de probables interactions hétérophiles entre les peptides REDV de Pcdh18a et les cellules endothéliales, et c'est la première fois que cela a été étudié *in vivo*. Néanmoins il serait bien de vérifier *in vitro* que Pcdh18a peut effectivement se lier aux cellules endothéliales, par exemple par des techniques de microfluidique en tapissant le dispositif avec la protéine et en évaluant si elle est effectivement capable de retenir les cellules endothéliales de manière spécifique. Aussi, il serait intéressant d'identifier le partenaire de liaison du peptide et de vérifier qu'il est bien exprimé par les cellules endothéliales du plexus veineux caudal. Est-ce similaire à la liaison du peptide mieux connu RGD sur les intégrines $\alpha 5\beta 1$, peut-être via l'intégrine $\alpha 4$ (Hubbell and Massia, 1992), ou est-ce différent, via l'intermédiaire d'une autre famille de molécules ?

Enfin, nous avons montré que chez les embryons morphants Pcdh18a- Δ CP₁₀₆, les CSPH sont bien produites à partir de l'endothélium hémogénique de l'aorte dorsale mais sont incapables de s'installer et se multiplier dans la niche hématopoïétique du THC. Cependant, nous n'avons pas pleinement étudié ce processus dans son ensemble : sont-elles capables de se loger initialement dans cette niche ? Est-ce que la diminution de leur quantité résulte d'un problème à se diviser ? La disparition des cellules provient-elle d'une apoptose précoce, et/ou repartent-elles dans la circulation sanguine ? Répondre à ces questions permettrait de mieux caractériser l'altération observée chez les embryons morphants. Par exemple, la surexpression de fibronectine au niveau du plexus veineux caudal pourrait empêcher les CSPH d'entrer dans la niche, ou la malformation de celle-ci et/ou le nombre plus faible de cellules stromales pourrait ralentir ou inhiber leur prolifération.

Matériels et Méthodes

1. Elevage et maintien des lignées

Les poissons sont tous issus de l'animalerie de notre laboratoire où ils sont nés et ont été élevés selon les règles d'éthique en vigueur et en accord avec le guide pour l'utilisation du poisson zèbre en laboratoire (Westerfield, 2000).

1.1. Croisements

Chez le poisson zèbre, la fécondation est externe, ce qui implique que le mâle et la femelle libèrent leurs gamètes simultanément dans le milieu. Dans la nature, les conditions idéales regroupent la présence de galets pour protéger les œufs, ainsi qu'une eau peu profonde et chaude. En laboratoire, nous essayons de reproduire au maximum ces éléments grâce à des bacs d'accouplement supplémentés de billes et d'algues synthétiques, où la température de l'eau est finement régulée dans la pièce. Les mâles et les femelles sont placés la veille de l'accouplement dans des bacs spéciaux à double-fond, permettant de collecter les œufs sans que les parents les ingèrent. Si l'heure de la ponte nécessite d'être précise pour l'expérience, un séparateur est placé entre les individus de différents genres, de façon à induire la rencontre des individus au moment voulu. Les poissons sont laissés toute la nuit à l'animalerie, où la lumière est éteinte de 23h à 9h pour reproduire précisément le cycle jour/nuit. La lumière du matin stimule la danse du mâle autour de la femelle qui l'aide à expulser ses œufs, tout en sécrétant ses spermatozoïdes dans l'eau. Les œufs sont collectés grâce à une passoire, soit au compte-goutte en attendant un minimum de 10 minutes afin de permettre la fécondation pour les expériences de micro-injections, soit en début d'après-midi pour récolter l'ensemble des pontes. Les poissons sont soit croisés en couple, avec seulement une femelle et un mâle, soit à 4 ou 5 individus pour augmenter la quantité d'œufs récoltés. Ceci est adapté en fonction des besoins de l'expérience. Les femelles sont sollicitées au maximum une fois par semaine et les mâles jusqu'à deux fois. Effectivement, la femelle produit des œufs en continu et plus elle est sollicitée fréquemment, moins elle donnera d'ovocytes dans la ponte. Nous essayons d'introduire des périodes de repos où les poissons ne sont pas utilisés pendant une à plusieurs semaines, ce qui permet souvent d'obtenir de meilleures pontes par la suite.

1.2. Traitement des embryons en vue des expériences

Les œufs sont récoltés quelques heures après la ponte et les œufs non fécondés sont éliminés par triage à la loupe binoculaire. Ils sont ensuite disposés dans une boîte de pétri contenant de l'eau de source *Volvic*. Cette eau est supplémentée de 280 µg/L de bleu de méthylène (*Sigma*, M4159) afin d'éviter le développement de champignons et de 0,003% de 1-phényl-2-thiouré (PTU, *Sigma*, P7629) afin d'empêcher la production de mélanine, par inhibition de la tyrosinase des mélanocytes, pour préserver la transparence des embryons. Les embryons sont maintenus dans un incubateur à 28°C, qui est la température de référence dans la description des stades de développement du poisson zèbre (Kimmel et al., 1995). Il est possible de diminuer ou d'augmenter cette température à 24°C et à 33°C, afin de respectivement ralentir ou accélérer le développement des embryons de 25%.

Si les expériences nécessitent des embryons de stades précoces, avant l'éclosion qui a lieu aux alentours de 72 hpf, il est nécessaire de les déchorioner manuellement avec des pinces Dumont #5, ce qui n'affecte en rien leur développement et leur survie.

1.3. Maintien des larves destinées à l'élevage

Les œufs destinés à l'élevage doivent être nettoyés des pathogènes potentiels qui entourent la surface du chorion. Pour cela, 50 à 100 œufs fécondés sont placés dans des tubes *Falcon* où 50 ml d'eau *Volvic*, supplémentée de 30 µl de javel à 5,25% est ajoutée pendant 5 minutes. Les œufs sont ensuite rincés 2 à 3 fois avant d'être placés dans une boîte de pétri. Si les embryons doivent être sélectionnés à la loupe à fluorescence avant d'être transférés à la nurserie, pour savoir s'ils sont porteurs du transgène, alors ils sont placés dans de l'eau *Volvic* avec bleu de méthylène et PTU, afin d'inhiber la production de pigment noir (mélanine). Après tri, le PTU est enlevé du milieu de développement avant de les déposer à la nurserie. Si les embryons ne nécessitent pas de sélection préalable, ils sont directement placés dans de l'eau *Volvic* avec bleu de méthylène et sans PTU. Les embryons éclosent d'eux même, c'est-à-dire qu'ils sortent du chorion, entre 48 et 72 hpf, après quoi on les appelle désormais « larves nageuses », jusqu'à ce qu'elles aient atteint le stade du « poisson juvénile » à environ 4-6 semaines. Leur transfert à la nurserie se fait au plus tard à 5 jpf où ils seront nourris pour la première fois. A partir d'un mois, ils sont déplacés à l'animalerie où un système de recirculation et nettoyage de l'eau (via filtres suivis de stérilisation aux UV) permet de la garder propre. La détermination du sexe des individus n'est pas Mendélienne et dépend des conditions d'élevage. Le sexage peut se faire entre 3 et 4 mois où les femelles présentent un ventre blanchâtre et rond

tandis que les mâles sont plus fins et moins colorés. A ce moment-là, les poissons ont atteint leur maturité sexuelle et peuvent être croisés (**Figure M1**). Les lignées sont relancées à l'âge d'environ un an et les adultes âgés de deux ans sont euthanasiés.

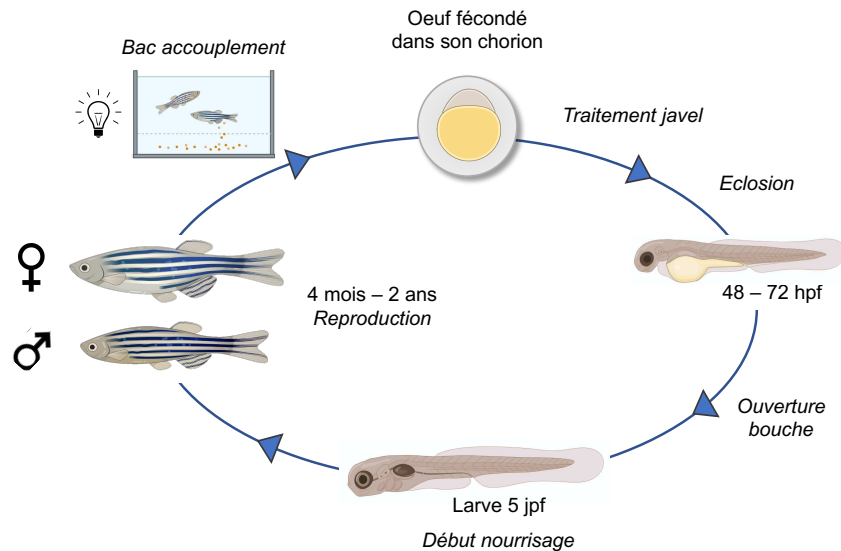


Figure M1 – Cycle de reproduction du poisson zèbre en laboratoire

Les œufs fécondés sont traités à la javel pour éliminer les pathogènes du chorion. Les larves éclosent entre 48 et 72 hpf puis sont transférées à la nurserie au maximum à 5 jpf où elles sont nourries pour la première fois. Les adultes sont matures sexuellement à 4 mois et sont placés dans des bacs d'accouplement pour se reproduire et fournir des œufs.

1.4. Euthanasie des poissons adultes

Lorsque les poissons vieillissent, leurs capacités de reproduction diminuent. Les individus âgés de plus de deux ans ne sont plus aussi fertiles que les jeunes et sont plus sensibles aux maladies. Cela concerne également les individus non porteurs des transgènes d'intérêts, par soucis de place à l'animalerie. Ils sont euthanasiés par immersion dans de l'eau froide, entre 0°C et 1°C, supplémentée de Tricaïne 1x (*Sigma Aldrich*, A5040).

1.5. Anesthésie des embryons

Les embryons sont anesthésiés avec de la Tricaïne, ou ester éthylique méthane-sulfonate de l'acide 3-aminobenzoïque (*Sigma Aldrich*, A5040). Cet anesthésiant est ajouté dans l'eau pour atteindre une concentration finale de 160 µg/ml. En effet, à partir de 18 hpf les terminaisons nerveuses des motoneurons sont établies au niveau des muscles, provoquant des contractions aléatoires non contrôlées ou en réponse à des stimuli sensoriels à partir de 24 hpf. Pour éliminer l'anesthésique, le milieu est simplement renouvelé avec de l'eau dépourvue de Tricaïne, ce qui permet de réverser son effet immédiatement.

1.6. Fixation des embryons

Après déchorionnage et anesthésie des embryons, ceux-ci sont fixés dans du formaldéhyde « methanol-free » (*Polysciences*, 4018) à 4% de concentration finale. La solution stock à 10% est diluée dans du PBT 1x (PBS 1x, Tween 0.1%, *Sigma* P1379). L'incubation se fait avec agitation soit à température ambiante pendant 2 heures, ce qui est préféré pour les immunohistochimies, soit pendant la nuit à 4°C, notamment pour les hybridations in situ. Les embryons sont ensuite rincés trois fois au PBT et conservés pendant une semaine maximum à 4°C pour réaliser une immunohistochimie, ou bien transférés en méthanol 100% et conservés plusieurs mois à -20°C pour réaliser une hybridation in situ.

1.7. Lignées transgéniques utilisées

Les lignées transgéniques listées ci-dessous sont disponibles au laboratoire et ont été utilisées pour réaliser les expériences de ce manuscrit. Elles ont été obtenues auprès d'autres laboratoires, après publication préalable, ou bien générées par des membres du laboratoire. Les lignées créées pendant la thèse seront détaillées dans une autre sous-partie.

N°	Lignée transgénique	Types cellulaires / éléments marqués <i>in vivo</i>	Référence
1	Tg(<i>CD41:GFP</i>)	Cellules souches progénitrices hématopoïétiques (GFP ^{low}) et thrombocytes (GFP ^{high})	(Lin et al., 2005)
2	Tg(<i>cspg4:Gal4 ; UAS:RFP</i>)	Cellules mésenchymateuses issues des somites, marquées durablement au cours du temps	Créée par E. Murayama
3	Tg(<i>cspg4:Gal4 ; UAS:Lifect-GFP</i>)	Actine-F des cellules mésenchymateuses issues des somites	Croisement des lignées 2 et 6
4	Tg(<i>cspg4:GFP</i>)	Cellules mésenchymateuses issues des somites marquées durablement au cours du temps	Créée par E. Murayama
5	Tg(<i>ET37:GFP</i>)	Cellules mésenchymateuses d'origine mésodermique. Les progéniteurs émergeant des somites sont marqués durablement au cours du temps	(Parinov et al., 2004)
6	Tg(<i>gata2b:Gal4 ; UAS:Lifect-GFP</i>)	Actine-F de l'endothélium hémogénique et des CSPHs	(Butko et al., 2015) (Helker et al., 2013)
7	Tg(<i>fti1:GFP</i>)	Système vasculaire, cellules myéloïdes primitives, érythrocytes primitifs (faiblement)	(Lawson and Weinstein, 2002)
8	Tg(<i>kdrl:ras-mCherry</i>)	Membranes des cellules endothéliales, système vasculaire	(Chi et al., 2008)
9	Tg(<i>pax3a:GFP</i>)	GFP ^{low} : Progéniteurs des cellules stromales issus du somite GFP ^{high} : Cellules issues de la crête neurale (cellules pigmentaires)	(Seger et al., 2011)
10	Tg(<i>pdgfrβ:mCherry</i>)	Cellules murales des vaisseaux ; CMN	(Ando et al., 2016)
11	Tg(<i>TCF:nls-mCherry</i>)	Noyaux des cellules des somites et des progéniteurs qui émergent	(Moro et al., 2012)

Tableau M2 – Lignées transgéniques utilisées pour les expériences

Les types cellulaires décrits comme marqués par le transgène sont ceux qui nous intéressent pour notre étude. Néanmoins, il est possible que la lignée transgénique cible d'autres types cellulaires qui ne sont pas mentionnés pour filtrer les informations non essentielles et permettre une meilleure clarté du tableau.

2. Création des constructions génétiques par biologie moléculaire

Historiquement, la biologie moléculaire est l'étude du fonctionnement du matériel génétique, mais ce terme recouvre de nos jours plutôt un ensemble, en continuelle évolution, de techniques de manipulation du génome, avec l'ajout ou la suppression de séquences d'acides nucléiques ou encore l'introduction de mutations ciblées. Les phénotypes observés et les quantifications réalisées permettent d'en apprendre davantage sur les effets provoqués par la modification génétique. Une comparaison est faite entre les contrôles, où la manipulation réalisée n'induit pas de changement, et les mutants de la condition testée.

2.1. Outils et traitement des séquences

Afin de manipuler les séquences génétiques et gérer visuellement les constructions à réaliser, j'utilise le logiciel SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/>) qui permet de positionner les amorces, de délimiter des motifs et de révéler les sites de clivage par les enzymes de restriction. Pour l'alignement des séquences, je privilégie l'alignement global de deux séquences où la référence est comparée à celle issue du séquençage. J'utilise la fonction « Pairwise Sequence Alignment » du site EMBOSS Needle de l'EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) et je sélectionne les séquences qui ne présentent aucune mutation par rapport à la référence, ou bien des mutations silencieuses, c'est-à-dire que le changement de nucléotide n'impacte pas la nature de l'acide aminé de la protéine, dû à la redondance du code génétique. Les amorces sont créées à l'aide du logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>), ou bien conçues manuellement, avec une température d'hybridation (T_m) proche de 58-60°C, une taille d'environ 18-20 nucléotides et un pourcentage de GC aux alentours de 50%. La formation non désirée de dimères d'amorces est contrôlée par le logiciel Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) et, dans le cas échéant, un nouveau design d'amorces est réalisé. Les amorces pour le clonage par la technique Gibson sont plus longues avec des bras libres qui possèdent une homologie avec un autre fragment d'ADN à l'extrémité. Il n'est pas rare d'avoir des amorces avec des T_m supérieurs à 70°C et une taille allant jusqu'à 120 nucléotides lors de l'ajout d'un Tag. Le design est différent des autres amorces classiques et est réalisé grâce au logiciel NEBuilder de BioLabs (<http://nebuilder.neb.com/>) ou bien manuellement. Afin de réaliser le clonage Gibson, les calculs des quantités de plasmide et fragments à utiliser en fonction de leur taille et du nombre de moles désiré sont réalisés grâce au site NEBioCalculator de BioLabs (<https://nebiocalculator.neb.com/>).

2.2. Génération des fragments d'ADN par PCR et clonages intermédiaires

Le laboratoire de Tohru Murakami nous a donné un plasmide contenant la séquence de *pcdh10b* (Murakami *et al.*, 2006). Nous avons donc directement réalisé le clonage Gibson à partir de cet élément, ce qui nous a permis de passer les étapes de cette section pour ce gène.

D'autre part, notre gène d'intérêt *pcdh18a* est relativement long, plus de 3000 paires de bases (pb), et des plasmides commerciaux contenant sa séquence génique ne sont pas disponibles. Dans ce cas, plusieurs étapes sont nécessaires avant de cloner le gène entier dans le vecteur d'expression final, avec dans l'ordre : 1) l'extraction des ARN messager (ARNm) aux stades et tissus d'intérêts, 2) la synthèse des ADN complémentaires (ADNc), 3) la synthèse des fragments du gène par PCR et 4) le clonage des fragments d'ADN dans des plasmides intermédiaires, mais cette dernière étape est facultative.

Pour une description détaillée de l'extraction des ARNm et de la synthèse des ADNc, se référer au points 5.2 et 5.3 de la section matériels et méthodes. Après extraction des ARNm totaux, à partir de pool de queue d'embryons âgés de 23 à 25 hpf, correspondant à la période d'expression des gènes dans nos tissus d'intérêts, les ADNc sont synthétisés grâce au kit Super Script IV (Thermo Fisher, 18090010).

L'ARNm étant assez instable, il est possible que les ADNc résultants ne soient pas complets. Pour le clonage de *pcdh18a*, nous avons alors privilégié la synthèse par étapes de plusieurs petits fragments du gène au lieu de synthétiser la séquence entière directement, plus difficile à obtenir du fait de la longueur du gène. Les banques d'ADNc sont utilisées pour synthétiser des fragments d'environ 1000 pb par PCR, grâce à la polymérase Expand High Fidelity (Sigma Aldrich, 11732641001) en privilégiant un grand volume de réaction. Cette Polymérase est connue pour sa haute fidélité, c'est-à-dire qu'elle introduit moins d'erreurs de réplication que d'autres enzymes, comme la polymérase LA Taq (Takara, RR002A) que nous utilisons plutôt en routine pour les contrôles. Les quatre fragments du gène obtenus sont purifiés préalablement sur gel d'agarose 1%, puis sur colonne grâce au kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.50). La concentration des fragments est mesurée au Nanodrop (Thermo Fisher) et les fragments sont conservés à 4°C pour une utilisation rapide, ou à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Taille fragment	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' – 3')
Fragment 1 1106 pb	Pcdh18a F1	GATACGCGCAACAGATTTCTCC
	Pcdh18a R1	TTCCCATGGCCCCCTTCATC
Fragment 2 1151 pb	Pcdh18a F2	CTGACTCGAACGACAACAATCC
	Pcdh18a R2	AACAACAGAGCAGGAGAGGTC
Fragment 3 1101 pb	Pcdh18a F3	ACGTGACTGTTGTGTTGACTG
	Pcdh18a R3	ACTCCTCCGTACACAATCTCATG
Fragment 4 1011 pb	Pcdh18a F4	CGAGGCCAGCTTCAGAG
	Pcdh18a R4	CGTCTCACGTGCGACTCAATC

Tableau M3 – Amorces utilisées pour le clonage intermédiaire des fragments de *pcdh18a*

Les quatre produits de PCR sont ensuite insérés dans un vecteur intermédiaire grâce au kit TA cloning (*Thermo Fisher*, K202020) qui permet un clonage rapide de petits fragments d'ADN. Après transformation, les clones bactériens sont étalés sur boîte en présence de l'antibiotique approprié et incubés toute la nuit à 37°C. Les colonies testées le lendemain pour la présence de l'insert par PCR et les positives sont incubées une deuxième nuit à 37°C dans du milieu Luria-Bertani (LB) en présence d'antibiotique. Les plasmides sont purifiés par Miniprep à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid® (*Macherey Nagel*, 740588.50) et envoyés à séquencer. Seules les séquences sans mutation sont conservées pour la suite.

2.3. Création des vecteurs d'expression par clonage Gibson

Cette section correspond à la création des vecteurs finaux, pour injection dans le zygote afin de permettre l'expression de notre construction d'intérêt. Les vecteurs utilisés possèdent deux sites *Tol2*, reconnus par la transposase, permettant l'intégration de la séquence dans le génome. Ils sont situés de part et d'autre d'un promoteur spécifique d'un type cellulaire ou bien, qui nécessite la fixation de protéines pour être actif dans des conditions particulières. En aval du promoteur, la présence de sites multiples de clonage est importante pour insérer la cassette contenant la construction génétique. Celle-ci se compose d'une séquence Kozak (GCCACCATGG) qui permet l'initiation de la traduction, de la séquence d'ADNc du gène d'intérêt et de la séquence d'une molécule fluorescente (eGFP ou mKate2). Dans certains cas, nous avons ajouté des séquences de liaison (GGAGCCGGA pour Gly-Ala-Gly) entre le gène et la séquence de la protéine fluorescente, et les cadres de lecture des deux éléments sont toujours en phase.

Les deux vecteurs utilisés sont : 1) le vecteur pG1_Tol2_hsp70 qui est activé par la chaleur et permet d'induire l'expression de la construction aux stades désirés et 2) le vecteur 4Xnr_UAS_GFP qui est activé lors de la fixation de la protéine Gal4 sur sa séquence cible UAS (**Figure M4**). En réponse à un choc thermique, induit par un changement brutal de température, l'organisme produit une réponse au stress et synthétise des protéines chaperonnes HSP. Ces éléments se fixent sur des séquences cibles pour activer l'expression de gènes spécifiques et cette technologie a été détournée à des fins de contrôle temporel (et parfois spatial) de l'expression génétique en utilisant le promoteur hsp70. Le système UAS/Gal4 a été découvert chez la levure et depuis, a été détourné à des fins de contrôle tissu-spécifique de l'expression génétique. L'expression de l'activateur Gal4 est régulée par un promoteur spécifique d'un type cellulaire, et Gal4 se fixe ensuite sur le promoteur UAS pour l'activer afin d'induire l'expression d'un gène d'intérêt uniquement dans le type cellulaire choisi. De plus, de nouvelles combinaisons « gène d'intérêt / type cellulaire » peuvent être engendrées par simple croisement des lignées, lorsque les deux éléments sont insérés indépendamment dans le génome. Une limitation de ce système est que l'expression obtenue, bien que forte et tissu-spécifique, présente souvent un certain mosaïcisme.

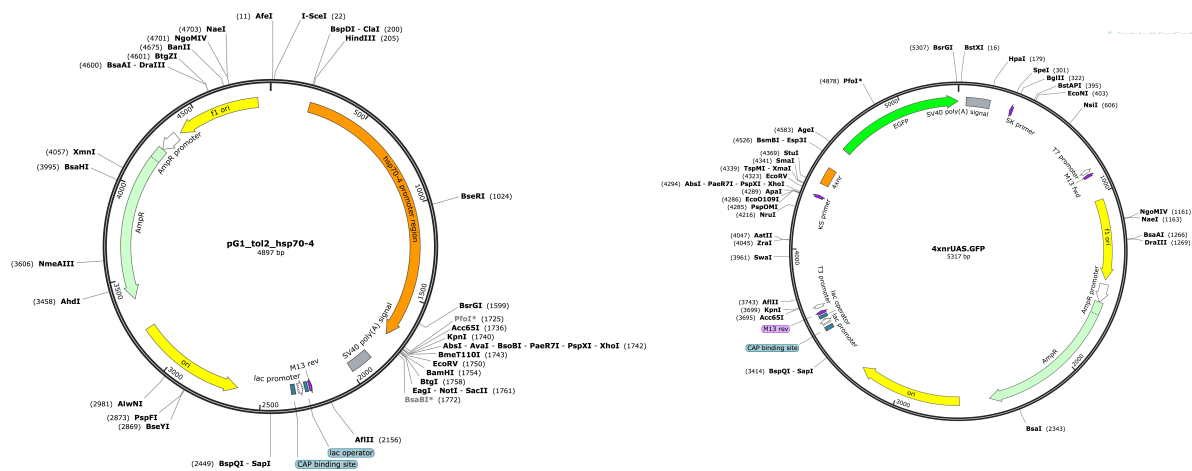


Figure M4 – Cartes des plasmides utilisés pour les constructions génétiques

Les constructions que nous souhaitons générer étaient de taille assez importante, c'est pour cela que nous avons privilégié la technique de clonage par Gibson plutôt qu'une technique de clonage classique par restriction et ligation. Les fragments de gènes d'intérêts sont synthétisés par PCR grâce à la Expand High Fidelity (*Sigma Aldrich*, 11732641001) avec les amorces spécifiques pour le clonage Gibson en privilégiant un grand volume de réaction. Ils

sont ensuite purifiés préalablement sur gel d'agarose 1%, puis sur colonne grâce au kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (*Macherey-Nagel*, 740609.50). La concentration des fragments est mesurée au Nanodrop (*Thermo Fisher*) et les fragments sont conservés à 4°C pour une utilisation rapide, ou à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' – 3')
Gib_hsp70_pcdh18a F1	CTGGAATTCGGTACCCTCGAGGATATCGCCACCATGGAGACTAGCAAGGGTACAGTGCTC
Gib_pcdh18a R1	CTTCATCTGGGTACAGTGGCGTTCAG
Gib_pcdh18a F2	CTGAACGCCACTGACCCAGATGAAG
Gib_pcdh18a R2	CATTAGCACCAGCATCATGGTCCATCG
Gib_pcdh18a F3	CGATGGACCATGATGCTGGTGCTAATG
Gib_pcdh18a R3	CAGACTGAACTTATCCATGTCTGGAGGG
Gib_pcdh18a F4	CCCTCCAGGACATGGATAAGTTCAGTCTG
Gib_hsp70_pcdh18a R4	GGCTGATTATGATCGCGGCCGGATCCTTAGCTCTGGCGTACGTCTGAAGC
Gib_UAS_WIRSmut F1	GACGCGTGGATCCACCGGTGCGCCACGCCACCATGGAGACTAGCAAGGGTACAGTG
Gib_WIRSmut R1	CGTAAGTGGAAATGGAGCTACCATGGACCATGCTTTCAAGTATAG
Gib_WIRSmut F2	CTACTCTATACTGAAAGCATGGTCCATGGTAGCTCCATTTC
Gib_WIRSmut (DM) R2	ACATTCCTCCTCGTTGTCCTTCCGGCCGACAGAAAAGCTCTTCTTAGCTGAGTC
Gib_WIRSmut (DM) F3	GGACTCAGCTAAGAAGAGCTTTTCTGCGGCCGAAAGGACAACGAGGAGGAATG
Gib_UAS_WIRSmut R3	GTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGCTGCTCCGCTCTGGCGTACGTCTGAAG
Gib_hsp70_mKate2 R	GTATGGCTGATTATGATCGCGGCCGCGTCATCTGTGCCCAAGTTTGCTAG
Gib_hsp70_mKate2 F	CTGGAATTCGGTACCCTCGAGGATATCGAATCCATGGTGGAGCGAGCTGATTAAGGAG
Gib_hsp70_pcdh10bECdn F1	AATTCGGTACCCTCGAGGATATCGAATCCATGTTGTGTTTTGCTCCTGCTG
Gib_hsp70_pcdh10bECdn R1	GATCTCCGGCGCGTGTGCTGTTACAGTCC
Gib_hsp70_pcdh10bECdn F2	ACGACAACGCGCCGGAGATCATCTTCAG
Gib_hsp70_pcdh10bECdn_GFP R2	CGCCCTTGCTCACGAGCGTCAGATCCAGAGAC
Gib_hsp70_pcdh10bECdn_GFP F3	GGATCTGACGCTCGTGAGCAAGGGCGAGGAG
Gib_hsp70_GFP RP	ATGGCTGATTATGATCGCGGCCGCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Gib_pcdh10bECdn_mKate2 R2	ATCAGCTCGCTCACGAGCGTCAGATCCAGAGACGC
Gib_pcdh10bECdn_mKate2 F3	CTGGATCTGACGCTCGTGAGCGAGCTGATTAAGGAG
Gib_hsp70_mKate2 R3	GGCTGATTATGATCGCGGCCGCGGATCCTCATCTGTGCCCAAGTTTGCTAG
Gib_pcdh10b F2	GGTCGTTTGATTACGAGCAACTTAAAGATTTACGCTTCATGG
Gib_pcdh10b R1	CTGAAATCTTTAAGTTGCTGTAATCAAACGACCTGAGGGCG
Gib_pcdh10b_mKate2 R2	ATCAGCTCGCTCACGCATATCCTTTCCGCGACAGAC
Gib_pcdh10b F3	GCGGAAAAGGATATGCGTGAGCGAGCTGATTAAGGAG
Gib_UAS_pcdh18a_AEAVmut F2	GGTGGTACTGTGATAGCCAGACTTGCAGAAGCTGTCGCTGATGTTTTGTCCAAACTTC
Gib_UAS_pcdh18a_AEAVmut R1	CTTGGAAGTTGGACAAAACATCAGCGACAGCTTCTGCAAGTCTGGCTATCACAGTAC
Gib_UAS_pcdh18a_REDV R2	GAGCCACGAATGTATCTACAGGAGCC
Gib_UAS_pcdh18a_REDV F3	GGCTCCTGTAGATACATTCGTGGCTC
Gib_UAS_pcdh18a_AEAVmut R3	CCTGGACAAAATGAAATCTGACTTACAGCTTACAGCATCAAAGTACGTAGTGC
Gib_UAS_pcdh18a_AEAVmut F4	CATTTATGCACTACGTACTTTTGTAGTCTGAAGCTGTAAGTACAGATTCATTTTGTGTC
Gib_UAS_pcdh18aEC_GFP R4	GTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTGAGCAGCGAAGGGCAAAGGCC
Gib_UAS_pcdh18aEC_GFP F5	GGTGGCCTTTGCCCTTCGCTGCTCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTT
Gib_hsp70_pcdh18aECdn_GFP FP	CCCTCTAGATGTCTCCGGAGCAGGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTT
Gib_hsp70_pcdh18aECdn_GFP RP	GTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGCTGCTCCGGAGACATCTAGAGGGCCGTCTC
Gib_hsp70_GFP RPnew	GTGGTATGGCTGATTATGATCGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
Gib_hsp70_SPpcdh18a_GFP RP1	TGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACAGCCGTGGTGTACCCTGCCAATG
Gib_hsp70_SPpcdh18a_GFP FP2	GACATTGGCAGGGTACACCACGGCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG

Tableau M5 – Amorces utilisées pour la technique de clonage Gibson

Les fragments ainsi produits sont assemblés grâce au principe de l'assemblage Gibson (*NEB*, E2611S), où l'homologie de séquence des parties terminales des fragments permet de joindre plusieurs brins d'ADN lors d'une même réaction (pour plus d'informations, visiter le site <https://international.neb.com/gibson-assembly>). Les amorces utilisées pour le Gibson font en général 25 nucléotides (nt) mais si le pourcentage en GC est faible (inférieur à 50%), ou si l'insertion d'un Tag est nécessaire, leur taille peut être allongée. Nous utilisons en général un rapport vecteur / insert de (1:3) avec environ 50 ng de vecteur pour nos réactions. La réaction est incubée au moins 1 heure à 50°C, plus il y a d'inserts et plus les temps longs sont à privilégier pour une meilleure efficacité. J'ai réalisé des clonages avec au maximum cinq inserts, correspondant aux quatre fragments de *pcdh18a* avec en plus, un fragment pour l'ajout de la séquence de mKate2. Les bactéries compétentes NEB 5-alpha (*NEB*, C2987) sont transformées avec 2,5 µl du mix de réaction, puis étalées sur boîte, en présence de l'antibiotique approprié et incubées à 37°C. Les colonies sont testées le lendemain par PCR pour la présence de l'insert et les positives sont incubées une deuxième nuit à 37°C dans du milieu Luria-Bertani (LB) en présence d'antibiotique. Les plasmides sont purifiés par Miniprep à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid® (*Macherey Nagel*, 740588.50) et envoyés à séquencer. Seules les séquences sans mutation sont conservées pour la suite.

Nom de la construction	Caractéristiques de l'élément cloné et de son expression
pG1_hsp70:pcdh18a-mKate2	Expression de Pcdh18a non mutée, fusionnée à la protéine fluorescente mKate2, lors de l'activation par choc thermique.
pG1_hsp70:pcdh18a_WIRSDM-mKate2	Expression de Pcdh18a, où le domaine WIRS est muté par deux mutations (T977A F978A), fusionnée à la protéine fluorescente mKate2, lors de l'activation par choc thermique.
4Xnr_UAS:pcdh18a-GFP	Expression de Pcdh18a fusionnée à la protéine fluorescente GFP, lors de l'activation par fixation de l'élément Gal4 sur le promoteur UAS.
4Xnr_UAS:pcdh18a_WIRSDM-GFP	Expression de Pcdh18a, où le domaine WIRS est muté par deux mutations (T977A F978A), fusionnée à la protéine fluorescente GFP, lors de l'activation par fixation de l'élément Gal4 sur le promoteur UAS.
4Xnr_UAS:pcdh18aACP-GFP	Expression de Pcdh18a, où la partie cytoplasmique a été déléetée, fusionnée à la protéine fluorescente GFP, lors de l'activation par fixation de l'élément Gal4 sur le promoteur UAS.
4Xnr_UAS:pcdh18aACPAEAV-GFP	Expression de Pcdh18a, où la partie cytoplasmique a été déléetée et les peptides REDV de la partie extracellulaire ont été remplacés par les peptides AEAV, fusionnée à la protéine fluorescente GFP, lors de l'activation par fixation de l'élément Gal4 sur le promoteur UAS.
pG1_hsp70:GFPs	Contrôle permettant l'expression de la protéine fluorescente eGFP, sécrétée car contenant la séquence d'adressage à la membrane de <i>pcdh18a</i> , lors de l'activation par choc thermique.
pG1_hsp70:pcdh18aACPT-GFP	Expression de la partie extracellulaire de Pcdh18a (forme Dominante Négative), fusionnée à la protéine fluorescente eGFP, lors de l'activation par choc thermique.
pG1_hsp70:mKate2	Contrôle permettant l'expression de la protéine fluorescente mKate2, lors de l'activation par choc thermique.
pG1_hsp70:pcdh10b-mKate2	Expression de Pcdh10b non mutée, fusionnée à la protéine fluorescente mKate2, lors de l'activation par choc thermique.
pG1_hsp70:pcdh10bACPT-mKate2	Expression de la partie extracellulaire de Pcdh10b (forme Dominante Négative), fusionnée à la protéine fluorescente mKate2, lors de l'activation par choc thermique.
pG1_hsp70:pcdh10bACPT-GFP	Expression de la partie extracellulaire de Pcdh10b (forme Dominante Négative), fusionnée à la protéine fluorescente eGFP, lors de l'activation par choc thermique.

Tableau M6 – Caractéristiques des vecteurs créés

Ces vecteurs d'expression sont destinés à être injectés dans le zygote et il est donc nécessaire de les purifier des endotoxines. Ces toxines sont présentes à la surface de la membrane des bactéries Gram- et sont libérées lors de leur lyse. Leur présence peut compromettre le développement de l'embryon car elles sont responsables de réactions inflammatoires. Pour cela, nous utilisons le kit NucleoBond® Xtra Midi EF (*Macherey Nagel*, 740420.10) pour traiter les plasmides avant toute utilisation *in vivo* chez le poisson.

3. Transgénèse et établissement de lignées stables

Le principe de la transgénèse a été décrit en introduction. C'est une technique qui permet l'insertion de constructions génétiques, flanquées de sites issus du transposon *Tol2* et reconnus par la transposase, dans le génome de l'embryon. Lorsque le plasmide, contenant la construction génétique d'intérêt, est injecté au stade zygote avec l'ARNm de la transposase, la probabilité d'insertion aléatoire de la cassette dans le génome est de 30% en moyenne. La transgénèse transitoire est relativement rapide mais l'insertion dans le génome est mosaïque, de sorte que le transgène peut ne pas être retrouvé dans les cellules germinales pour être transmis à la descendance. Dans certain cas, le mosaïcisme d'expression est un avantage mais dans d'autres, il sera nécessaire d'établir la lignée transgénique stable pour obtenir une expression homogène du transgène.

3.1. Synthèse de l'ARNm de la transposase

Pour la synthèse de l'ARNm de la transposase par rétro-transcription, nous utilisons le plasmide pCS-zT2TP, provenant du laboratoire de Koichi Kawakami (Kotani et al., 2006). Environ 2 µg de plasmide sont digérés par l'enzyme de restriction NotI (*NEB*, R3189S) pendant 3 heures à 37°C. Un gel d'électrophorèse est réalisé avec 1 µl du produit de digestion, pour contrôler sa qualité, et le reste est purifié sur colonne grâce au kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (*Macherey-Nagel*, 740609.50), puis élué dans le l'eau 'RNase-free'. Pour la synthèse de l'ARNm, nous utilisons le kit mMMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription (*Ambion*, AM1340) avec une incubation de 2 heure à 37°C, suivie d'une incubation de 15 minutes à 37°C en présence de DNase I. Afin d'éviter la dégradation de l'ARNm nouvellement synthétisé, une queue polyA est ajoutée en utilisant le kit Poly(A) Tailing Kit (*Ambion*, AM1350), nécessitant une incubation d'une heure à 37°C. Pour finir, il est nécessaire de purifier l'ARNm sur colonne NucAway™ Spin Columns d'Ambion™ (*Invitrogen*, AM10070), qui est élué dans de l'eau 'RNase-free' et conservé dans la glace pour éviter la dégradation de l'ARNm. La concentration

est mesurée par Nanodrop (*Thermo Fisher*) et la qualité de l'ARNm synthétisé est contrôlée par migration de 1 µl sur gel d'électrophorèse 1%, pendant de 20 minutes à 150mV. Une migration rapide et de temps court sont à privilégier pour réduire l'altération de l'intégrité de l'ARNm. Si la concentration et la qualité de la synthèse sont validées, des aliquots de 5 µl sont réalisés et placés à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

3.2. Etablissement d'une lignée transgénique stable

L'établissement d'une lignée transgénique est un processus assez long, puisqu'il nécessite 1) l'atteinte de la maturité sexuelle des individus préalablement injectés, 2) la sélection des individus porteurs du transgène et 3) la détermination, dans leur descendance, des embryons possédant une insertion dans le génome qui permet une bonne expression du transgène.

Nom de la lignée	Caractéristiques d'expression du transgène
Tg(<i>hsp70:pcdh10b-mKate2</i>)	Expression de la protéine Pcdh10b, fusionnée à la protéine fluorescente mKate2. Apparition de petits points dans les cellules du somite deux heures après le choc thermique, puis la fluorescence augmente au cours du temps.
Tg(<i>hsp70:pcdh10bACPT-mKate2</i>)	Expression de la partie extracellulaire de la protéine Pcdh10b, fusionnée à la protéine fluorescente mKate2. Apparition de petits points dans les cellules du somite deux heures après le choc thermique puis la fluorescence augmente au cours du temps. Cette forme est normalement sécrétée mais cela se voit davantage avec la forme fusionnée à la eGFP, car la fluorescence de la mKate2 ne semble pas perdurer en extracellulaire.

Tableau M7 – Lignées transgéniques stables créées au cours de ce travail de thèse

Les embryons de la génération F0 correspondent à ceux injectés avec le plasmide, contenant le transgène d'intérêt, et l'ARNm de la transposase. Ils sont triés à la loupe à fluorescence et seuls les embryons exprimant le transgène dans au moins une cellule sont sélectionnés et déposés à la nurserie. Aux alentours de 4 mois, les poissons F0 sont croisés un à un avec un individu sauvage, et la descendance F1 est triée afin de déterminer quels parents F0 sont porteurs du transgène dans les cellules germinales. A leur tour, les embryons F1, possédant une bonne fluorescence, sont élevés et ainsi de suite sur plusieurs générations, en général jusqu'à la génération F3 où les poissons possèdent un allèle unique du transgène. En fonction du site d'insertion du transgène dans le génome, l'expression pourra être plus ou moins forte, dû à des niveaux différents de compaction de la chromatine et des régulations. Les embryons ayant une expression ectopique de la construction sont éliminés. Il est aussi possible de croiser les individus porteurs du nouveau transgène d'intérêt avec des poissons de lignée transgénique déjà établie, de façon à passer sous un fond génétique intéressant pour l'étude.

Parfois, l'efficacité de la transgénèse est faible et il est donc possible de croiser les individus F0 entre eux pour maximiser les chances d'obtention d'embryons F1 porteurs du transgène.

4. Micro-injection dans le zygote

La micro-injection consiste à injecter quelques nanolitres de matériel génétique ou autre dans l'œuf fécondé, au stade une-cellule s'il s'agit d'ADN ou d'ARN, ou bien jusqu'au stade 8-cellules lorsqu'il s'agit d'un morpholino (jusqu'à ce stade, tous les blastomères communiquent par leur base, côté vitellus). Ceci permet une répartition assez homogène du composé dans l'ensemble des cellules au cours du développement de l'embryon.

4.1. Dispositif d'injection et préparation des capillaires

Nous utilisons des injecteurs à air comprimé de type Picopritzer III (*Parker Hannifin*) et des micro-manipulateurs manuels Narishige, modèle M-152. Il est possible de régler la puissance d'injection et la durée du pulse de manière à ajuster la taille de la goutte à 0,5 nl, pour qu'elle reste la même lors de chaque expérience. Les œufs, fraîchement pondus et potentiellement fécondés, sont placés contre une lame de verre Superfrost™ Plus (*Thermo Fischer*, 4951PLUS4), collée sur une boîte de pétri. A ce stade, il est en général assez difficile de voir si l'œuf a été fécondé ; le tri se fait à postériori.

Les capillaires sont de fins tubes en verre, de diamètre 1 mm, contenant un filament. Ils sont étirés à l'aide d'une étireuse verticale (*Harvard Apparatus*, 300020 GC100F-15) où la chaleur et les forces exercées sont réglables. Pour éviter la contamination par les RNases, le port de gants est obligatoire. Après étirement, les capillaires sont fermés et il est nécessaire de les couper en biseau, à la loupe binoculaire, à l'aide d'un cutter.

4.2. Injection des vecteurs d'expression

Les constructions génétiques réalisées par clonage Gibson et purifiées des endotoxines sont injectées dans le cytoplasme au stade une cellule avec l'ARNm de la transposase. En général, 1 nl est injecté, ce qui correspond à deux pulses au niveau de l'injecteur. L'ARNm de la transposase est dilué dans l'eau 'RNase-free' à une concentration finale de 25 ng/μl, de manière à injecter 25 pg de transposase dans le zygote. La concentration du plasmide à injecter est déterminée par gamme de concentrations, c'est-à-dire que plusieurs quantités sont injectées lors d'une expérience préalable. Ensuite, l'évaluation de la toxicité se fait par l'étude du

développement embryonnaire, où seules les concentrations permettant un développement normal de l'embryon sont conservées. Dans un deuxième temps, nous sélectionnons la concentration où l'efficacité d'expression du transgène est la meilleure. Néanmoins dans certains cas, nous avons finalement diminué la concentration des transgènes utilisés car une trop forte expression peut être délétère. En général la concentration finale d'injection des plasmides se situe entre 10 et 50 ng/μl, de manière à injecter entre 10 et 50 pg de plasmide dans le zygote.

J'injecte 25 pg de plasmide pour les constructions UAS:pcdh18a-GFP et UAS:pcdh18a_WIRSDM-GFP et 15 pg de plasmide pour les constructions UAS:pcdh18aΔCP-GFP et UAS:pcdh18aΔCP_{AEEAV}-GFP, hsp70:GFPs et hsp70:pcdh18aΔCPT-GFP, hsp70:pcdh10bΔCPT-mKate2.

4.3. Activation de l'expression des constructions *hsp70* par choc thermique

Après injection des plasmides contenant le promoteur *hsp70*, où l'expression est inductible par choc thermique, il a fallu déterminer le temps et la température d'incubation nécessaires à l'activation de l'expression du transgène. En effet, c'était la première fois que ce vecteur été utilisé au laboratoire et il fallait tester les conditions avec notre propre matériel plutôt que de se fier à des publications, utilisant probablement des équipements différents. Pour cela plusieurs températures allant de 35 à 43°C ont été testées à des temps variant entre 20 et 45 minutes. C'est finalement une température de 39°C, avec un temps d'incubation de 30 minutes qui a été sélectionné. En effet, une température trop élevée induit la mort des embryons et des temps trop longs peuvent provoquer des problèmes de développement. Les conditions sélectionnées permettent une bonne expression du transgène et ne sont pas délétères.

4.4. Injection des morpholinos

Les morpholinos (MO) sont de petites séquences de 25 nucléotides chimiquement modifiés pour être non dégradables par les cellules, antisens d'une séquence génique d'intérêt et qui se fixent ainsi sur l'ARN afin d'empêcher la production de protéines matures. Leur action peut perturber l'épissage de l'ARN lorsque le MO cible une jonction d'épissage sur l'ARN primaire, ou bien peut empêcher l'initiation de la traduction lorsque le morpholino cible la séquence Kozak. Le choix des morpholinos se fait en collaboration avec les ingénieurs de GeneTools ; il est nécessaire de s'assurer qu'ils ciblent uniquement le gène d'intérêt en réalisant un « BLAST » de sa séquence sur l'ensemble du génome du poisson zèbre.

Les solutions mères de morpholinos (*GeneTools*, LLC), 300 nmol, sont diluées dans de l'eau miliQ à une concentration finale de 2 mM (16 ng/μl) et maintenues à température ambiante. La dilution des solutions filles se fait dans de l'eau miliQ supplémentée de tampon, où la concentration finale est adaptée en fonction des besoins de l'expérience. Pour l'injection de 2 ng et 4 ng de morpholinos, les solutions d'injections sont respectivement de 0,25 mM (2 ng/μl) et 0,5 mM (4 ng/μl) et deux pulses sont alors nécessaires pour injecter la quantité désirée. Les injections de morpholinos peuvent se faire dans le sac vitellin, juste en dessous du blastomère, ou bien, dans le cytoplasme de la cellule. Il est possible d'injecter jusqu'aux stades deux ou quatre cellules (voir plus haut) mais, dans la mesure du possible, les injections sont réalisées au stade une-cellule. Lors des expériences, l'injection du morpholino testé est toujours comparée à l'injection d'un morpholino contrôle standard, dirigé contre une mutation de l'intron d'une chaîne de beta-globine humaine, qui est censé ne pas induire de phénotype.

Nom	Séquence (5' – 3')	Mode d'action	Concentration
Contrôle	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	Bloque l'épissage d'un gène humain	2 ou 4 ng
pcdh10b (ATG)	AAAAACACAAACATCTCCACTCCGG	Bloque l'initiation de la traduction	2 ng
pcdh10b (e1-i1)	AGTTTTATATCATACTCACTGGAG	Bloque l'épissage	Peu d'efficacité
pcdh18a (i1-e2)	TACTGACCCTGATGGAGTATTGAGA	Bloque l'épissage	4 ng

Tableau M8 – Morpholinos utilisés pour les expériences

Afin de déterminer les concentrations auxquelles les morpholinos sont injectés, des gammes de concentrations sont établies préalablement. La concentration la plus haute n'induisant pas de problème de développement est sélectionnée. De plus, pour les morpholinos dont le mode d'action bloque l'épissage, l'efficacité est testée par PCR en comparant le profil d'épissage des ARNm chez le morphant par rapport au morpholino contrôle, ainsi que par PCR quantitative avec des amorces de part et d'autre du site d'épissage où l'amplification n'est possible que si l'ADNc est issu de la forme épissée l'ARNm.

5. PCR quantitative

La PCR quantitative (PCRq) est une technique particulière de réaction en chaîne par polymérase qui mesure la quantité initiale d'ADN dans la réaction. Cette méthode permet d'évaluer l'expression d'un gène car l'échantillon utilisé correspond à des amplicons d'ADNc, synthétisés à partir des ARNm totaux des tissus d'intérêt. Plus il y a d'amplicons du gène testé et plus il est exprimé par les cellules. Dans notre cas, la quantification recherchée est relative, c'est-à-dire qu'une condition test est comparée à une condition contrôle, ce qui permet de savoir si le gène est sous-exprimé, ou bien surexprimé, chez les embryons mutants/morphants par rapport aux embryons contrôles.

5.1. Préparation des tissus provenant des embryons

Lors de l'injection des œufs avec des morpholinos ou des vecteurs d'expression, les contrôles sont séparés des tests dans des boîtes de pétri différentes, puis traités de la même manière. Les embryons sont anesthésiés avant le début du prélèvement tissulaire. Lors de l'émergence de nos cellules d'intérêt à 23 hpf ou bien, lors du remaniement du plexus caudal à 36 hpf, les queues des embryons sont coupées sous la loupe binoculaire, regroupées en lot de 10 queues par tube Eppendorf et congelées immédiatement dans de l'azote liquide. Cette manipulation est répétée pour l'ensemble des embryons, de manière à avoir trois répliques biologiques de minimum 30 queues par condition, c'est-à-dire trois lots de 30 à 60 queues pour la condition contrôle et trois lots de 30 à 60 queues pour la condition test. Les échantillons de tissus sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à extraction d'ARNm.

5.2. Extraction d'ARN

L'extraction de l'ARN est réalisée au TRIzol™ (*Invitrogen*, 15596026) qui permet de séparer les différents composés cellulaires, dont l'ARN dans la phase aqueuse du surnageant, l'ADN au milieu et les protéines dans la phase organique. Ce produit est à manipuler sous la hotte car cancérigène. Les tubes contenant les tissus sont conservés dans la glace. Le TRIzol™ est ajouté dans chaque tube, de manière à avoir un volume final de 500 µl par lot après regroupement des 30 à 60 queues. Les tissus sont lysés par action mécanique à la pipette et les tubes sont ensuite vortexés et incubés 3 minutes à température ambiante. Un volume de 100 µl de chloroforme est ajouté pour l'extraction des ARN totaux et les tubes sont vortexés et incubés 3 minutes à température ambiante. La séparation des phases est possible par centrifugation pendant 15 minutes à 14000 rotations par minute (rpm), à 4°C. La phase aqueuse, contenant

l'ARN, est transférée dans un nouveau tube et un volume équivalent de 260 µl d'isopropanol est ajouté pour la précipitation. Les tubes sont vortexés et incubés 30 minutes à -20°C, puis centrifugés pendant 20 minutes à 14000 rpm, à 4°C. Le surnageant est éliminé car l'ARN se situe dans le culot. Celui-ci est rincé avec de l'éthanol 75%, puis il est séché à l'air libre pendant 10 minutes. Cette étape est cruciale, il est nécessaire d'enlever le plus d'éthanol possible manuellement à la loupe binoculaire. Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µl d'eau 'RNase-free'. Afin de purifier l'ARN d'éventuelles traces d'ADN, un traitement par la DNase I est nécessaire à l'aide du kit DNase TURBO™ (*Invitrogen*, AM2239). Un dernier traitement au coprécipitant GlycoBlue™ (*Invitrogen*, AM9515) est réalisé pour la deuxième précipitation d'ARN. Après centrifugation pendant 30 minutes à 14000 rpm, à 4°C, le culot est rincé avec de l'éthanol 70%. Cette fois encore, il est nécessaire d'enlever le plus d'éthanol possible manuellement à la loupe pour réduire les contaminations et de sécher le culot à l'air libre pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans 20 µl d'eau 'RNase-free' et la concentration d'ARN est mesurée au Nanodrop (*Thermo Fisher*). Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation pour la synthèse des ADNc.

5.3. Synthèse d'ADN complémentaire

La réverse transcription des ARNm est réalisée grâce au kit Super Script IV (*Thermo Fisher*, 18091200) où nous suivons exactement le protocole fourni. La même quantité d'ARNm est utilisée pour l'ensemble des répliques biologiques, aussi bien pour le contrôle que pour la condition testée, avec un maximum de 2500 µg d'ARNm par réaction. Dans un premier temps, les amorces Oligo d(T)₂₀ sont alignées avec les ARNm, possible par la présence de leur queue PolyA, en présence de dNTPs. La réaction est incubée 5 minutes à 65°C, puis inactivée par immersion d'une minute dans la glace. La réaction de réverse transcription se fait par ajout de l'enzyme SuperSript IV®, en présence de RNaseOUT™ pour éviter la dégradation des ARNm. La réaction est incubée 20 à 30 minutes à 50°C, puis inactivée 10 minutes à 80°C. Enfin, afin d'enlever d'éventuelles traces d'ARNm restant dans la réaction, les tubes sont incubés 20 min à 37°C en ajoutant 1 µl de RNase H. Pour finir la préparation des ADNc, nous diluons 10 µl du mix final dans de l'eau 'RNase-free', de manière à obtenir une concentration finale de 15 ng/µl, qui est celle utilisée pour les PCRq. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

5.4. Amorces pour la PCR quantitative et mesure de leur efficacité

Les amorces de PCRq font en général 18 à 20 pb et sont spécifiques d'un gène d'intérêt. L'amplicon désiré est assez court, entre 120 et 150 pb. Les amorces sont choisies de préférence en 3' de l'ADNc et créées de la même manière que les amorces de PCR. L'éventuelle formation de structures secondaires est contrôlée avec le site Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>), nécessaire pour s'assurer que les amorces ne vont pas former des dimères entre elles, ce qui diminue l'efficacité.

Après réception des amorces, celles-ci sont testées avec des gammes de concentrations d'ADNc de référence, dilué 5x, 10x, 20x et 40x. La PCRq est réalisée et des courbes d'étalonnage sont créées à partir des Delta Ct (voir section 5.6) obtenues pour chaque concentration. Puis, la formule $(10^{(-1/\text{pente}-1)}) \times 100$ permet d'obtenir le pourcentage d'efficacité du couple d'amorce. Les amorces sont conservées si leur pourcentage d'efficacité est compris entre 90% et 110%. Aussi, le produit de PCRq est migré sur gel d'agarose 2% de manière à s'assurer qu'une seule bande est amplifiée, d'environ 120-150 pb, et que les amorces ne forment pas de dimères non utilisés pour la réaction. Si ces conditions sont respectées, le couple d'amorce est validé pour le gène, mais si cela n'est pas respecté, un nouveau design est réalisé.

Nom du gène	Séquence amorce sens	Séquence amorce antisens	Efficacité
Gène ménage <i>ef1a</i>	CAGCATTATCCAGTCCTTAAGTAGAGTGC	GCGTCATCAAGAGCGTTGAGAAG	95 %
<i>alcama</i> (F2/R2)	AGTGGAGTGTCAACGGAACC	CGAGTTTATTGGTCACGAGGC	90 %
<i>fn1a</i> (F1/R1)	CCCCAGGAATCTCAGACTCAG	TGTTGATGTACCAGGCAGACG	91 %
<i>fn1b</i> (F2/R2)	TGGGAGCGCATGTCTGATAC	CTCCCACTTTTCGCCAATGC	98 %
<i>pcdh10b</i> gene exp (F3/R3)	TCAGGAGGCAGATATCGTTAGC	CCTCTGTGCAGTTGGAGAAC	91 %
<i>pcdh10b</i> MO check (F1/R1)	CCAGTGAGACAAAACACCAG	GAATGTCCGCGATGCATG	-
<i>pcdh18a</i> gene exp (F6/R6)	TGTTGAATGTGAGCGTGAGTG	CGTTGAGAGTATTTTCGGTGTTC	97 %
<i>pcdh18a</i> MO check (F2/R2)	CCAACACAGTCGTCAATCC	GCTGATACTGACCCTCTACAG	-

Tableau M9 – Séquences et efficacité des couples d'amorces de PCRq

Afin de vérifier l'épissage des ARNm *pcdh18a*, lorsque les embryons sont injectés avec le MO contrôle ou le MO *pcdh18a*, par PCR sur ADNc, j'ai utilisé deux couples d'amorces (**Figure R4-C**). Pour la 1^{ère} PCR : FP 5' – CAGTCGTCAATCCCTGAACAG – 3' et RP 5' – GCTGCGAGAGTATTTGTTCCC – 3' et pour la 2^{ème} PCR : FP 5' – CAGTCGTCAATCCCTGAACAG – 3' et RP 5' – CGCCACGCCCACTATCTTTC – 3'.

5.5. Quantification par utilisation de SYBR green

La quantité d'ADN présent dans la réaction se fait grâce au SYBR Green qui est un composé aromatique ayant les propriétés de se fixer aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. Nous utilisons un mix qui contient déjà une ADN polymérase, Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (*Eurogenetec*, UF-RSMT-B0701) et le thermocycleur RT-PCR 7300 (*Life Technologie*).

Le volume final de réaction est de 10 µl avec 7,5 µl de MasterMix, 0,5 µl de chaque amorce diluée à 5 µM et 1,5 µl d'ADNc de concentration 15 ng/µl. Un total de 40 cycles est réalisé puis les courbes d'amplification obtenues sont analysées.

5.6. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt

L'expression des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *ef1a* (pour « elongation factor 1-alpha ») qui ne varie normalement pas sous les différentes conditions. La machine de PCRq mesure l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle de PCR. Au début, la quantité de fluorescence émise est trop faible pour être détectée puis, au bout d'un certain cycle, le nombre d'amplicons est suffisant pour que la courbe démarre. L'évolution est exponentielle, suivie d'une phase de plateau. La mesure du Ct (pour « cycle threshold ») se fait dans la phase exponentielle où la pente de la courbe est linéaire. Le seuil est défini à cet endroit et le Ct correspond au numéro du cycle en abscisse. Le logiciel calcule l'écart type des Ct entre les différents triplicatas techniques, de façon à évaluer leur qualité, qui est bonne si l'écart type est inférieur à 0,25. Grâce à une feuille de calcul Excel, nous calculons le Delta Ct (ΔCt) qui correspond au (Ct du gène testé – Ct du gène de ménage) pour chaque réplica, puis calculons la moyenne pour l'ensemble des réplicas, c'est-à-dire les 9 échantillons correspondant aux triplicatas biologiques multipliés par les triplicatas techniques. Puis, le Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) correspond au (ΔCt de la condition testée – ΔCt de la condition contrôle), ce qui permet d'évaluer une expression relative de gènes en se rapportant au calibrateur (condition contrôle). La quantification relative est calculée par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ qui permet d'obtenir un niveau de changement d'expression, où celle du calibrateur est fixée à 1. L'expression des gènes de la condition testée est définie en fonction de celle du calibrateur.

Cette section a été rédigée à l'aide du site de la plateforme de génomique de l'Université de Montréal (<https://genomique.irc.ca/>).

6. Marquages histologiques

Les marquages histologiques permettent de révéler l'expression spatio-temporelle d'un gène d'intérêt par la technique d'hybridation in situ, ou bien la localisation d'une protéine d'intérêt grâce à l'immunohistochimie, qui nécessite l'utilisation d'anticorps spécifiques. La transparence et la petite taille de l'embryon de poisson zèbre nous permettent de réaliser ces méthodes sur embryons entiers.

6.1. Synthèse des sondes pour hybridation in situ

Afin de détecter l'expression d'un gène par hybridation in situ (HIS), il est nécessaire de synthétiser des sondes ARN, antisens de la séquence d'intérêt, qui vont venir s'hybrider dessus. La synthèse se fait soit par PCR à partir d'un échantillon d'ADNc, ou soit à partir d'un plasmide linéarisé, par exemple de type TOPO (*Thermo Fischer Scientific*, 452640), lorsque le produit d'amplification y est inséré. Les sondes font en général une taille comprise entre 200 et 1000 pb et chevauchent plusieurs exons, elles peuvent être également placées au niveau des UTR 5' ou 3' de la séquence cible si la spécificité y est meilleure. Pour la synthèse par PCR avec la polymérase LA Taq (*Takara*, RR002A), une ou deux réactions sont réalisées en fonction de l'efficacité de l'amplification, c'est-à-dire que la deuxième réaction correspond à une PCR sur le produit de la première PCR. Le produit est purifié sur colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (*Macherey-Nagel*, 740609.50) et élué dans 20 µl d'eau 'RNase-free'. Pour la synthèse à partir d'un plasmide, une digestion avec l'enzyme de restriction appropriée de 3 heures est requise pour linéariser le plasmide préalablement. Le produit est ensuite purifié sur colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (*Macherey-Nagel*, 740609.50) et la digestion est contrôlée par électrophorèse sur gel 1%. La concentration est déterminée à l'aide d'un Nanodrop (*Thermo Fisher*).

Afin de permettre la transcription, il est nécessaire d'ajouter un promoteur spécifique SP6, T3 ou T7, provenant de bactéries infectées par des phages, qui permet une reconnaissance par l'ARN polymérase. Ce promoteur est déjà présent dans le vecteur de transcription, mais il faut l'ajouter en 5' de l'amorce antisens si la synthèse de fait par PCR. Néanmoins, la polymérase SP6 est moins efficace puisqu'elle incorpore moins bien les bases possédant l'épitope DIG par rapport aux autres polymérases. Au laboratoire, nous privilégions le promoteur T7 (aagcttTAATACGACTCACTATAGGG). La transcription se fait sur 1 µg d'ADN, provenant de la digestion ou des PCR. Le mélange est composé de l'ARN polymérase

T7 ou SP6 (*Promega*, P4074 ou P4084), de la RNaseOut™ (*ThermoFischer*, 10777019) pour empêcher la dégradation de l'ARN, d'un mélange de nucléotides contenant des UTP liés à l'épitope DIG, de 0,1M DL-Dithiothreitol (DTT) (*Promega*, P117B), d'un tampon 5x (*Promega*, P1181). La réaction est incubée 3 heures à 37°C, puis 20 minutes à 37°C après ajout de 1 µl de DNase I, afin de dégrader la matrice d'ADNc. L'ensemble est purifié sur colonne avec le kit NucAway™ Spin Columns d'Ambion™ (*Invitrogen*, AM10070), élué dans 20 µl d'eau 'RNase-free' et conservé dans la glace. La concentration est déterminée au Nanodrop (*Thermo Fisher*) et la pureté de la sonde est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, où la révélation d'une bande unique bien définie est recherchée. Pour une bonne conservation des sondes, il est nécessaire d'ajouter 80 µl de tampon d'hybridation (HB+), contenant de l'héparine et de l'ARN de torula. Celles-ci sont conservées à -20°C pour une utilisation ultérieure lors du troisième jour de l'HIS.

PCR	Séquence amorce sens	(+T7) Séquence amorce antisens (5' – 3')
<i>fn1a</i>	AACTCTGTCCTGCTGCTTCC	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGCTTTGGTGAGTTTGCTGGCC
<i>fn1b</i>	GTTGGCGATGTGAGAAGTGC	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGCGGCAGTAAAACAAGGACGG
<i>pcdh10b</i>	CAAGTTTGTGCCACCGAG	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGAACGGCGAAAATGAAGACC
<i>pcdh18a</i>	TGGAAGAAATGGAGACGGCC	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGCGCCAGGGTTTTGAAAGTGG
<i>pdgfra</i>	ACCGAATGACCAAACCTGAG	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGTTGTGAAACAACCCAGGTCA
Plasmides		
<i>myb</i>	A partir d'un plasmide obtenu auprès de Len Zon (Children Hospital Boston) _ enzyme restriction EcoRI _ promoteur T7 Code Genbank : NM_001309822.1	
<i>cspg4</i>	A partir d'un plasmide obtenu auprès de Bruce Appel (University of Colorado) _ plasmide (pJC-53.2) Code Genbank : XM_001923422	
<i>etsrp</i>	A partir d'un plasmide obtenu auprès de Shuo Lin (UCLA) _ enzyme restriction Sall _ promoteur SP6 Code Genbank : NM_001037375.1	

Tableau M10 – Amorces et références pour la synthèse des sondes d'hybridation in situ

6.2. Hybridation in situ sur embryon entier

Le protocole d'HIS que nous suivons est basé sur celui décrit dans (Thisse and Thisse, 2014). Après fixation des embryons sur la nuit à 4°C dans du formaldéhyde 4% (*Polysciences*, 04018-1), ils sont rincés et incubés dans du méthanol 100% à -20°C durant au moins un jour, ce qui permet leur déshydratation. La première étape du jour 1, est la réhydratation progressive des embryons, en diminuant les concentrations de méthanol et en augmentant les concentrations de PBT (PBS 1x, Tween 0.1%, *Sigma* P1379), toutes les 5 minutes, pour finalement réaliser trois rinçages dans du PBT 100%. Les embryons sont ensuite perméabilisés dans une solution de Protéinase K (*Ambion*, AM2546), d'une concentration finale de 10 µg/ml, qui nécessite des

temps d'incubation différents selon les stades de développement des embryons. Cette étape n'est pas réalisée si les embryons sont plus jeunes que 36 hpf, puis une incubation de 5 minutes est réalisée pour des stades de 36 à 60 hpf et 8 minutes lorsque les embryons sont âgés de plus de 60 hpf. Les échantillons sont fixés une nouvelle fois dans du formaldéhyde 4% (*Polysciences*, 04018-1) pendant 20 minutes à température ambiante, puis incubés dans du tampon de pré-hybridation (HB+) pendant au moins 4 heures à la température d'hybridation de la sonde (en général entre 60 et 65°C, qui dépend des conditions de stringence). L'hybridation de la sonde se fait sur la nuit, à la même température que précédemment, en remplaçant le tampon de pré-hybridation par 100 µl de tampon HB+ supplémenté de 200 ng de la sonde. Il est préférable de changer les tampons au niveau du bain sec pour éviter les changements de température trop fréquents.

Le lendemain au jour 2 du protocole, les embryons sont rincés, à la température d'hybridation, dans du tampon (HB-), supplémenté de citrate de sodium (SSC, *Sigma*, S6639), où les concentrations en SSC augmentent progressivement toutes les 10 minutes, pour finalement être rincés dans du tampon 2x SSC, suivit de deux rinçages dans du tampon 0,2x SSC. Puis, des incubations successives à température ambiante permettent de passer les embryons dans du PBT en augmentant sa concentration de manière progressive. Il est ensuite nécessaire de saturer les sites de fixation des anticorps pendant 4 heures à température ambiante et avec agitation, grâce une solution de 1x WBR (*Roche*, 11921673001). Enfin, les embryons sont incubés la nuit à 4°C avec des anticorps polyclonaux anti-DIG-AP, phosphatase alcaline (*Roche*, 11093274910), dilués au 1/4000 dans la solution de saturation 1x WBR.

La révélation de l'HIS se fait au jour 3 grâce à une réaction colorimétrique, catalysée par la phosphatase alcaline. Les embryons sont rincés toute la matinée dans du PBT, en changeant régulièrement le milieu, puis sont passés en plaque 12 puits lors du dernier rinçage. Ils sont ensuite incubés 5 minutes à température ambiante dans le tampon de coloration alcalin NTMT puis les composés permettant la coloration, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP) et Nitroblue Tetrazolium (NBT), sont supplémentés au tampon NTMT. Pour 1 ml de réaction par puits, nous ajoutons 4,5 µl de NBT (*Sigma*, N6639) et 3,5 µl de BCIP (*Sigma*, B-8503). La réaction peut durer quelques minutes à plusieurs heures, il est donc nécessaire de vérifier régulièrement sous la loupe qu'elle ne s'emballe pas. En effet, si la coloration est trop forte, il est ensuite difficile de distinguer les détails car le bruit de fond peut devenir trop important. Les embryons sont conservés dans du glycérol 80% (*Sigma*, G6279) dans le noir et

sous agitation jusqu'à imagerie. Le marquage est durable dans le temps, les embryons sont alors stockés dans le noir à 4°C jusqu'à nouvelle utilisation.

Composition des tampons :

Tampon (HB-)	Concentration	Fournisseur	Référence
Formamide	50%	Sigma	F9037
20x SSC	5x	Sigma	S6639
Tween 20	0,1%	Sigma	P1379
Acide citrique (1M pH 6)	0,1%	Sigma	C0759
Eau DEPC	-	Sigma	1609-47-8

Tampon (HB+)	Concentration	Fournisseur	Référence
Héparine (100 mg/ml)	50 µg/ml	Sigma	H3393
ARN de torula	500 µg/ml	Sigma	R7876
Tampon (HB-)	Tampon de dilution	-	-

Tampon (NTMT)	Concentration	Fournisseur	Référence
NaCl	100 mM	Sigma	S3014
MgCl ₂	50 mM	Sigma	63068
Tris HCl (pH 9,5)	100 mM	Sigma	T1503
Tween 20	0,1%	Sigma	P1379
Eau DEPC	-	Sigma	1609-47-8

6.3. Immunohistochimie

Les embryons sont anesthésiés puis fixés pendant deux heures à température ambiante en 4% formaldéhyde "methanol-free". Ils sont ensuite rincés plusieurs fois dans du PBSDT (PBS 1x, 0,01% DMSO, 0,1% Triton x100 (*Sigma*, T9284)) et sont stockés à 4°C.

Le premier jour, les embryons sont traités 30 minutes à température ambiante avec du Tween 0,1%. Ils sont ensuite incubés 20 minutes à -20°C dans le l'acétone et rincés dans du Hank's Balanced Salt Solution, HBSS 1x (*Invitrogen*, Gibco 14025), supplémenté de 0,1% Tween. Afin de perméabiliser les embryons, ils sont traités à la Collagénase (*Sigma*, C9891) de concentration finale 1 µg/ml pendant 15 minutes si les embryons ont des stades de développement compris entre 24 et 36 hpf, 30 minutes si les embryons sont plus âgés que 36 hpf et non traités si les embryons ont moins de 24 hpf. Ils sont ensuite rincés dans du PBSDT et incubés pendant au moins 4 heures dans du tampon de blocage à température ambiante

(PBSDT, 1x WBR (*Roche*, 11921673001)). Les échantillons sont ensuite incubés toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires, dilués selon besoin dans le tampon de blocage.

Le deuxième jour, les embryons sont rincés plusieurs fois dans du PBSDT pour éliminer les anticorps primaires. Si la révélation finale est indirecte, par utilisation de tyramide pour révéler la peroxydase, il est nécessaire d'inactiver préalablement l'enzyme endogène par incubation des échantillons 30 minutes dans de l'eau oxygénée (*Sigma*, H1009), diluée à 6%. Les embryons sont ensuite incubés dans du tampon de blocage (PBSDT, (PBSDT, 1x WBR (*Roche*, 11921673001)) pendant 4 heures à température ambiante, puis toute la nuit à 4°C en présence des anticorps secondaires, dilués selon besoin dans le tampon de blocage.

Spécificité anticorps	Dilution	Révélation	Fournisseur (Référence)
Anticorps primaires			
α -eGFP (Poulet)	1/1000	Ac secondaire	Abcam (ab13970)
α -DsRED (Lapin)	1/200 ou 1/300	Ac secondaire	Takara (632496)
α -mCherry (Souris)	1/100	Ac secondaire	Abcam (ab125096)
α -PCDH18 (Lapin)	1/100	Ac secondaire	Sigma-Aldrich (HPA017976)
α -Fibronectine (Lapin)	1/100	Ac secondaire	Sigma-Aldrich (F3648)
α -itga5 (Lapin)	1/100	Ac secondaire	St John's Laboratory (STJ97284)
α -pERK (Lapin)	1/100	Ac secondaire	Cell Signaling Technology (mAb #4370)
α -PH3 (Mouse)	1/200	Ac secondaire	Abcam (Ab7031)
α -PCNA (Mouse)	1/25	Ac secondaire	Oncogene research products (D22141)
Anticorps secondaires			
α -Poulet-AF488	1/800 ou 1/1000	Directe	Invitrogen (A11039)
α -Lapin-Cy3	1/300	Directe	Jackson Immuno Research (111-166-003)
α -Lapin-HRP	1/200 ou 1/300	Indirecte tyramide	ThermoFisher Scientific (G-21234)
α -Souris-HRP	1/200 ou 1/300	Indirecte tyramide	ThermoFisher Scientific (G-21040)

Tableau M11 – Anticorps utilisés pour les immunohistochimies

Le troisième jour, les embryons sont rincés dans du PBT durant l'ensemble de la matinée, en changeant régulièrement le milieu. Si la révélation est indirecte, il est nécessaire d'ajouter une étape intermédiaire de révélation de la peroxydase. Pour cela, de l'imidazole 1M (*Sigma*, I5513) est préparé extemporanément (dilution de 0,034g d'imidazole dans 5 ml de PBT + 5 μ l H₂O₂ 1%) afin de diluer la tyramide couplée à un fluorophore pour révéler soit dans le

vert avec Alexa Fluor™ 488 Tyramide Reagent (*Invitrogen*, B40953), soit dans le rouge avec Alexa Fluor™ 546 Tyramide Reagent (*Invitrogen*, B40954) ou soit dans le rouge lointain avec Alexa Fluor™ 647 Tyramide Reagent (*Invitrogen*, B40958). Cette amplification indirecte permet d'amplifier le signal et les embryons sont incubés pendant une heure à température ambiante. Ces immunohistochimies sont associées à une coloration DAPI Pierce (*Thermo Scientific*, 62248) qui permet de marquer la chromatine des noyaux des cellules. Les embryons sont incubés 30 minutes à température ambiante dans la solution diluée au 1/10000 dans du PBT. Afin de conserver les embryons, ceux-ci sont progressivement incubés dans des concentrations croissantes de glycérol pour atteindre les 80% (15% glycérol dans PBT, 30% glycérol dans BPT, 60% glycérol dans eau et 80% glycérol dans eau). Les embryons sont stockés dans le noir à 4°C pour une observation ultérieure.

6.4. Révélation de l'apoptose par la méthode TUNEL

La méthode TUNEL, ou Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling, est une technique qui permet de marquer les cellules en apoptose. Les nucléases fragmentent l'ADN, ce qui génère des extrémités 3' OH libres. Elles sont reconnues par la transférase qui va ajouter des dUTP, étiquetés DIG dans notre cas, qui peuvent être révélés grâce au couplage à un anticorps.

Le kit utilisé pour cette expérience est le ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (*Sigma-Aldrich*, S7100). Au début, le protocole est le même que pour les HIS. Après la deuxième fixation dans le formaldéhyde 4%, les échantillons sont incubés 20 minutes à température ambiante dans le tampon d'équilibration. La réaction se fait par ajout de 16 µl d'enzyme TdT, diluée dans 38 µl du tampon de réaction et incubée 2 heures à 37°C. Puis, elle est arrêtée en remplaçant le réactif par du tampon de lavage (100 µl de tampon, 3,4 ml d'eau miliQ) et incubé 20 minutes à température ambiante. Les échantillons sont rincés dans du PBT puis incubés 2 heures à température ambiante dans la solution de blocage (500 µl 10x DIG wash, 4,5 ml de PBT). L'anticorps α-DIG-HRP (30 µl d'anticorps, 35 µl de solution de blocage par tube) est ensuite ajouté et incubé toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont rincés dans du PBT et la peroxydase est révélée comme décrit dans la section précédente. La suite du protocole est celui d'une immunohistochimie classique avec la possibilité de marquer d'autres éléments cellulaires.

7. Microscopie

Les lignées transgéniques disponibles au laboratoire et la technique de transgénèse permettent de visualiser l'évolution dynamique de cellules et de protéines d'intérêt au cours du temps. Pour cela, les dispositifs d'imagerie doivent être adaptés au phénomène étudié, que ce soit au niveau de la profondeur de champs, de la vitesse d'acquisition et de la résolution atteignable.

7.1. Caractéristiques des microscopes utilisés

Le laboratoire dispose de deux salles de microscopie, équipées de deux microscopes confocaux inversés à balayage laser, un modèle SPE, que j'utilise plutôt pour imager les immunohistochimies, et un SP8 plus récent et performant, ainsi que d'un système confocal à disque tournant ('spinning disk') inversé, utilisés pour la microscopie *in vivo*.

Microscope	Confocal SPE inversé	Confocal SP8 inversé	Spinning disk
Statif	Leica DMI4000B	Leica DMI6000CS	Leica DMi8
Marque	Leica	Leica	Andor
Tête	CTR 6000	CTR 6500	Yokogawa CSUW1
Détecteurs / caméras	1 PMT Détecteur spectral AOBs	2 PMT 1 détecteur hybride Détecteur spectral AOBs	2 caméras CMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V2+) 2048 x 2048 pixel QE max >80%
Objectifs	ACS APO : 10x dry : NA 0.3, DT : 3 mm 40x oil : NA 1.15, DT : 270 µm 63x oil : NA 1.3, DT : 160 µm PL Fluostar : 16x IMM : NA 0.5, DT : 150 µm	HC PL APO CS2 : 20x IMM : NA 0.75, DT : 670 µm 40x water : NA 1.1, DT : 650 µm 63x water : NA 1.2, DT : 300 µm PL Fluostar : 10x dry : NA 0.30	HC PL APO CS2 40x water NA 1.10, DT : 650 µm HC PL APO CS2 63x water NA 1.20, DT : 300 µm
Lasers/Diodes	405 nm, 488 nm, 532 nm et 635 nm	448 nm, 488 nm, 552 nm et 638 nm	445 nm, 488 nm, 561 nm, 642 nm
Platine	Motorisée XYZ ; Super-Z Galvo	Motorisée XYZ	Motorisée XYZ, surplatine piezo
Logiciel d'acquisition	LasX	LasX	MetaMorph®
Autre	Prismes Nomarski	Prismes Nomarski Scanner résonant Micro-cuve chauffante et chauffe objectif	Prismes Nomarski Incubateur thermostaté Okolab Borealis upgraded CSU

Tableau M12 – Propriétés des systèmes de microscopie confocale utilisés

7.2. Montage des échantillons

Les embryons sont anesthésiés et sélectionnés à la loupe à fluorescence. De l'agarose 2% est mis à chauffer au bain sec à 80°C et de la Tricaine 2x est préparée extemporanément. Nous utilisons des boîtes d'imagerie à fond de verre Ibidi μ -Dish35 mm, (#81158 μ -Dish 35 mm, high, Glass Bottom: \varnothing 35 mm, high wall). L'agarose et la Tricaine sont déposés au fond de la boîte et mélangés, de manière à obtenir une concentration finale de 1% d'agarose et 1x de Tricaine. Les embryons sont déposés dans la boîte, lorsque l'agarose est encore liquide, et placés latéralement avec la queue la plus proche possible de la lame de verre. L'agarose sèche en environ 10 minutes et 1 ml de Tricaine 1x est déposé au-dessus de manière à éviter la sécheresse et maintenir les embryons anesthésiés. Pour empêcher l'évaporation, un couvercle est placé sur le dessus de la boîte.

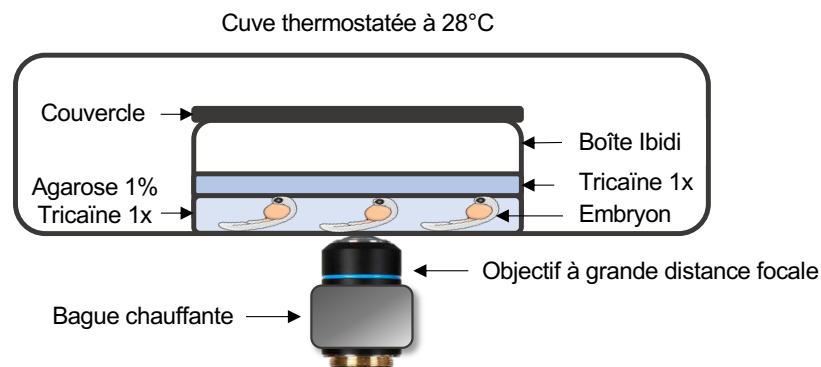


Figure M13 – Technique de montage des échantillons pour la microscopie inversée

Cette configuration permet d'acquérir des images durant des temps assez longs, allant jusqu'à des time-lapses de 20 heures. Néanmoins, des problèmes majeurs se posent, notamment dû aux changements des conditions environnementales et à la qualité du montage. La goutte entre l'objectif et la boîte d'imagerie est susceptible de s'évaporer au cours du temps. Pour cela, nous utilisons préférentiellement l'objectif à huile 20x du SP8 ou bien l'objectif 40x su SP8 où l'eau est remplacée par de l'huile Immersol W (Zeiss, 444969-0000-000), qui possède un indice de réfraction proche et ne s'évapore pas. Il est également possible d'avoir une dérive sur le plan Z au cours du temps. Cela est dû à des changements au niveau paramètres extérieurs, comme la variation de température dans la pièce ou la génération inconstante de flux d'air. Il est alors préférable d'allumer le microscope et d'activer la climatisation quelques heures avant le début de l'acquisition et de poser la cuve thermostatée au préalable. Un montage imparfait est aussi susceptible d'induire cette dérive lorsqu'il y a une infiltration d'eau sous l'agarose qui induit un décalage de focus pendant le time-lapse. L'imagerie *in vivo* à long terme est très sensible à

toutes variations des conditions environnementales. Il est indispensable d'isoler au maximum le matériel, de le maintenir à une température constante et de limiter les flux de personnes entrant et sortant de la pièce.

7.3. Acquisitions au microscope confocal

Les paramètres d'acquisition varient selon les échantillons imagés et selon les besoins de l'expérience. Le détecteur hybride du SP8 est plus sensible, il est de préférence utilisé de manière à réduire la puissance du laser et diminuer la phototoxicité. Lorsque deux canaux sont imagés, le détecteur hybride permet de détecter les longueurs d'ondes les plus élevées et le PMT permet de détecter les plus faibles. Cette configuration est optimisée pour détecter des fluorescences rouges d'intensité plus faible que les fluorescences vertes. Le gain du détecteur hybride est en général laissé à 100 tandis que le gain du PMT peut être poussé au-delà de 800 si cela est nécessaire. Lorsque les échantillons imagés sont plus grands que le champ de l'objectif, la fonction Tile Scan est utilisée et permet de reconstituer automatiquement l'ensemble de l'échantillon sans interruption en XYZ par acquisition de plusieurs piles d'images. En général, les conditions d'acquisition sont optimales, mais lorsqu'il s'agit d'imager de nombreux échantillons sur un temps réduit, la résolution peut être diminuée et le pas en Z peuvent être légèrement augmenté pour gagner en vitesse, tant que l'information désirée n'est pas altérée. Pour les time-lapses, en général un embryon contrôle et un embryon test, sont imagés l'un après l'autre à intervalles de temps réguliers de 6 minutes. Il est possible d'augmenter les intervalles de temps à 10 minutes pour imager deux embryons par condition au sein d'une même expérience, et ainsi multiplier par deux la capacité d'échantillonnage. L'acquisition est lancée dans l'après-midi, dure jusqu'à 20 heures et elle est arrêtée le lendemain matin. L'objectif utilisé est en général le 20x du SP8 avec un zoom de 2,5 à 3x et les pas en Z se situent entre 1 et 1,5 μm . Pour diminuer le bruit de fond, une moyenne de deux acquisitions est réalisée par image, ce qui permet de ne pas trop photoblanchir la fluorescence de l'échantillon. Au sein d'une même expérience, les conditions d'acquisition sont les mêmes pour tous les embryons. Ceci est aussi vrai pour les expériences indépendantes, de manière à pouvoir utiliser les résultats pour la même analyse.

7.4. Acquisitions au microscope confocal à disque tournant ou spinning disk

Les caméras du confocal à disque tournant, plus communément appelé spinning disk, permettent d'acquérir sur un grand champ et il est possible d'ajuster cette fenêtre pour diminuer la taille des fichiers. Les temps d'exposition varient entre 50 et 300 ms, selon la lignée

transgénique utilisée, avec des puissances de lasers qui ne dépassent pas 10%. Le temps d'exposition et la puissance des lasers sont adaptés pour chaque acquisition afin d'avoir un signal correct qui ne sature pas, avec un niveau acceptable de bruit de fond et un photoblanchiment qui n'est pas trop important. Au sein d'une même expérience, les conditions d'acquisition sont les mêmes pour tous les embryons. Ceci est aussi vrai pour les expériences indépendantes, de manière à pouvoir utiliser les résultats pour la même analyse.

7.5. Acquisitions d'images de microscopie VE-DIC/Nomarski

Les acquisitions VE-DIC (pour « video-enhanced differential interference contrast microscopy ») des hybridations in situ ont été réalisées à l'aide d'un microscope Polyvar 2 (Reichert-Jung) et d'une caméra analogique tri-CCD HV-D25 (Hitachi), réglée de façon à maximiser le contraste (Herbomel and Levraud, 2005). Les embryons ont été imagés soit avec un objectif 10x (Reichert), PlanFI Apo, NA 0.30, soit avec un objectif 40x à eau (Olympus), LUMPlanFi, NA : 0.80. Les séquences ont été enregistrées sur des cassettes numériques Mini DV (Sony), à l'aide d'un enregistreur GV-D1000E PAL (Sony), puis les images choisies ont été extraites grâce au logiciel SwiftCapture (Ben Software).

7.6. Analyse d'images

7.6.1. Traitement des acquisitions

L'analyse d'images est réalisée grâce au logiciel Fiji (PMID 22743772) pour les manipulations de routine, les projections maximales, le comptage des cellules et les annotations. Le suivi des trajectoires cellulaires au cours du temps a été réalisé grâce à la fonction « Manual tracking » du plugin TrackMate v6.0.3 de Fiji. Le logiciel Imaris (*Bitplane*, v8.1) est utilisé pour la visualisation 3D des données, essentielle pour certaines des analyses. L'exportation des séquences time-lapses en fichiers vidéo (.mov) est réalisé grâce au logiciel LasX du microscope confocal et ils sont ensuite traités avec Fiji.

7.6.2. Détection des filopodes avec Filopodyan

La détection des filopodes est réalisée grâce au plugin Filopodyan, v1.2.6. Les cellules uniques sont extraites des time-lapses et, grâce à des projections de plusieurs plans, il est possible d'avoir sur un même plan tous les éléments de la cellule. Les paramètres du plugin sont adaptés manuellement à chaque cellule et à chaque temps, selon la morphologie cellulaire au temps t. J'utilise le « threshold » triangle, « ED Iterations » allant de 2 à 3 généralement et

« LoG sigma » compris entre 1 et 3. Des paramètres corrects permettent de détecter le corps cellulaire et l'ensemble des filopodes de la cellule, même si parfois quelques-uns ne sont pas détectés car de trop faibles intensités. Un script Python est utilisé pour la normalisation et donne accès aux angles des filopodes par rapport à la direction de la migration (angle relatifs) et à leur taille en μm . Il permet aussi de contrôler visuellement que les coordonnées des filopodes correspondent à l'image et regroupe l'ensemble des résultats dans un fichier .csv, utilisé pour l'analyse statistique.

Le script Python permettant la normalisation des angles et l'extraction des données a été créé par Dmitry Ershov du Hub d'analyse d'images de l'Institut Pasteur.

8. Analyses statistiques

8.1. Graphiques et tests statistiques

Le logiciel utilisé pour l'analyse statistique et pour la génération des graphiques de type histogramme est GraphPad Prism (v.9). Les graphiques représentent les moyennes des jeux de données \pm SD. Lorsqu'il s'agit de comparer un seul paramètre entre la condition testée et le groupe contrôle, je vérifie dans un premier temps que les données suivent une loi normale grâce au test de Shapiro-Wilk. Si les données sont normalement distribuées, il est alors possible d'appliquer le test paramétrique de Student qui compare les moyennes des deux groupes. Cependant, si les données ne suivent pas une loi normale, il n'est pas possible d'appliquer un test paramétrique et j'applique alors le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney, qui compare les médianes des deux groupes. Par rapport au test de Student, le test de Wilcoxon-Mann-Whitney prend davantage en compte la distribution des échantillons. Pour les deux tests, plus la p-value est faible et plus la différence entre les deux groupes est significative. Par convention on écrit : non significatif (ns) lorsque $p > 0,05$ – significatif * lorsque $p < 0,05$ – significatif ** lorsque $p < 0,01$ – significatif *** lorsque $p < 0,001$ – significatif **** lorsque $p < 0,0001$.

8.2. Histogramme circulaire et modèle linéaire à effets mixtes

Pour la réalisation de l'histogramme circulaire, ou diagramme en rose, les données générées par l'analyse avec le plugin Filopodyan ont été utilisées, après exportation en fichier .csv. Nous avons accès aux angles relatifs (0° à 180°) pour l'ensemble des filopodes détectés, pour chaque cellule et à chaque temps des time-lapses. L'axe des abscisses représente les angles

relatifs, regroupés par dizaines, et l'axe des ordonnées représente la fréquence d'apparition (0, 25, 50, 75 et 100). Cette représentation permet d'évaluer visuellement la distribution moyenne des filopodes au cours de la phase précoce de migration pour les contrôles et pour les morphants.

Néanmoins, pour cette représentation, tous les filopodes sont analysés au même moment alors que les données proviennent de suivis cellulaires au cours du temps. Une cellule est analysée pendant dix temps et il est alors fort probable que l'angle moyen de la première cellule à t_1 soit lié à l'angle moyen de cette même cellule à t_2 . Les données générées ne sont alors pas indépendantes pour une même cellule. Le modèle linéaire à effets mixtes permet d'ajouter une variable aléatoire à chaque cellule, ce qui permet de modéliser l'effet de répétition des mesures pour chaque cellule. En appliquant ce modèle à nos échantillons, il est possible de comparer l'angle moyen de l'ensemble des cellules mutantes aux cellules contrôles. Sur R, la fonction « nlme » a été utilisée.

La génération de l'histogramme et la construction du modèle ont été possibles grâce à l'aide de Hanna Julienne du Hub de bio-informatique de l'Institut Pasteur.

Références

- Aamar, E., and Dawid, I.B. (2008). Protocadherin-18a has a role in cell adhesion, behavior and migration in zebrafish development. *Developmental Biology* 318, 335–346.
- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications* 9, 1911.
- Aman, A., and Piotrowski, T. (2010). Cell migration during morphogenesis. *Developmental Biology* 341, 20–33.
- Ando, K., Fukuhara, S., Izumi, N., Nakajima, H., Fukui, H., Kelsh, R.N., and Mochizuki, N. (2016). Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* 143, 1328–1339.
- Arai, F., and Suda, T. (2007). Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells in the Osteoblastic Niche. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106, 41–53.
- Aroeira, L.S., Aguilera, A., Sánchez-Tomero, J.A., Bajo, M.A., del Peso, G., Jiménez-Heffernan, J.A., Selgas, R., and López-Cabrera, M. (2007). Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients: Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions. *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 2004–2013.
- Asada, N., Kunisaki, Y., Pierce, H., Wang, Z., Fernandez, N.F., Birbrair, A., Ma'ayan, A., and Frenette, P.S. (2017). Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nature Cell Biology* 19, 214–223.
- Asakawa, K., and Kawakami, K. (2018). Protocadherin-Mediated Cell Repulsion Controls the Central Topography and Efferent Projections of the Abducens Nucleus. *Cell Reports* 24, 1562–1572.
- Astrof, S., Crowley, D., George, E.L., Fukuda, T., Sekiguchi, K., Hanahan, D., and Hynes, R.O. (2004). Direct Test of Potential Roles of EIIIA and EIIIB Alternatively Spliced Segments of Fibronectin in Physiological and Tumor Angiogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 8662–8670.
- Aulehla, A., and Herrmann, B. (2004). Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. *Genes & Development* 18, 2060–2067.
- Aulehla, A., and Pourquié, O. (2010). Signaling Gradients during Paraxial Mesoderm Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000869.
- Bahm, I., Barriga, E.H., Frolov, A., Theveneau, E., Frankel, P., and Mayor, R. (2017). PDGF controls contact inhibition of locomotion by regulating N-cadherin during neural crest migration. *Development* 144, 2456–2468.
- Becker, S.F.S., Mayor, R., and Kashef, J. (2013). Cadherin-11 Mediates Contact Inhibition of Locomotion during Xenopus Neural Crest Cell Migration. *PLoS ONE* 8, e85717.
- Ben-Yair, R., Kahane, N., and Kalcheim, C. (2011). LGN-dependent orientation of cell divisions in the dermomyotome controls lineage segregation into muscle and dermis. *Development* 138, 4155–4166.
- Berghmans, S., Murphey, R.D., Wienholds, E., Neuberg, D., Kutok, J.L., Fletcher, C.D.M., Morris, J.P., Liu, T.X., Schulte-Merker, S., Kanki, J.P., et al. (2005). tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 407–412.
- Berthod, F., Germain, L., Tremblay, N., and Auger, F.A. (2006). Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J. Cell. Physiol.* 207, 491–498.
- Bertrand, J.Y., Chi, N.C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D.Y.R., and Traver, D. (2010). Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* 464, 108–111.

- Bing, Y., Tian, M., Li, G., Jiang, B., Ma, Z., Li, L., Wang, L., Wang, H., and Xiu, D. (2018). Down-regulated of PCDH10 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Medicine* 97, e12055.
- Bisogni, A.J., Ghazanfar, S., Williams, E.O., Marsh, H.M., Yang, J.Y., and Lin, D.M. (2018). Tuning of delta-protocadherin adhesion through combinatorial diversity. *ELife* 7, e41050.
- Biswas, S., Emond, M.R., Duy, P.Q., Hao, L.T., Beattie, C.E., and Jontes, J.D. (2014). Protocadherin-18b interacts with Nap1 to control motor axon growth and arborization in zebrafish. *Molecular Biology of the Cell* 25, 633–642.
- Blake, J.A., and Ziman, M.R. (2014). Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* 141, 737–751.
- Blanco, M.J., Moreno-Bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J., and Nieto, M.A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241–3246.
- Blaser, B.W., Moore, J.L., Hagedorn, E.J., Li, B., Riquelme, R., Lichtig, A., Yang, S., Zhou, Y., Tamplin, O.J., Binder, V., et al. (2017). CXCR1 remodels the vascular niche to promote hematopoietic stem and progenitor cell engraftment. *Journal of Experimental Medicine* 214, 1011–1027.
- Bodor, D.L., Pönisch, W., Endres, R.G., and Paluch, E.K. (2020). Of Cell Shapes and Motion: The Physical Basis of Animal Cell Migration. *Developmental Cell* 52, 550–562.
- Bosze, B., Ono, Y., Mattes, B., Sinner, C., Gourain, V., Thumberger, T., Tlili, S., Wittbrodt, J., E.Saunders, T., Strähle, U., et al. (2020). Pcdh18a regulates endocytosis of E-cadherin during axial mesoderm development in zebrafish. *Histochemistry and Cell Biology* 154, 463–480.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszódi, A., Bengtsson, T., Berna, A., and Fässler, R. (2001). Functional Consequences of Integrin Gene Mutations in Mice. *Circulation Research* 89, 211–223.
- Brasch, J., Goodman, K.M., Noble, A.J., Rapp, M., Mannepalli, S., Bahna, F., Dandey, V.P., Bepler, T., Berger, B., Maniatis, T., et al. (2019). Visualization of clustered protocadherin neuronal self-recognition complexes. *Nature* 569, 280–283.
- Bronner-Fraser, M., Wolf, J.J., and Murray, B.A. (1992). Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Developmental Biology* 153, 291–301.
- Buckley, C.D., Rainger, G.E., Bradfield, P.F., Nash, G.B., and Simmons, D.L. (1998). Cell adhesion: More than just glue. *Molecular Membrane Biology* 15, 167–176.
- Butko, E., Distel, M., Pouget, C., Weijts, B., Kobayashi, I., Ng, K., Mosimann, C., Poulain, F.E., McPherson, A., Ni, C.-W., et al. (2015). Gata2b is a restricted early regulator of hemogenic endothelium in the zebrafish embryo. *Development* 142, 1050–1061.
- Calvi, L.M., and Link, D.C. (2015). The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood* 126, 2443–2451.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.
- Čapek, D., Smutny, M., Tichy, A.-M., Morri, M., Janovjak, H., and Heisenberg, C.-P. (2019). Light-activated Frizzled7 reveals a permissive role of non-canonical wnt signaling in mesendoderm cell migration. *ELife* 8, e42093.
- Carter, S.B. (1967). Haptotaxis and the Mechanism of Cell Motility. *Nature* 213, 256–260.
- Case, L.B., and Waterman, C.M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology* 17, 955–963.
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J.L., Gamse, J.T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R.T., Van Cruchten, S., and Zon, L.I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 33, 95–118.
- Chal, J., Guillot, C., and Pourquié, O. (2017). PAPC couples the segmentation clock to somite morphogenesis by regulating N-cadherin-dependent adhesion. *Development* 144, 664–676.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., and Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* *263*, 802–805.
- Chang, H., Hoshina, N., Zhang, C., Ma, Y., Cao, H., Wang, Y., Wu, D., Bergen, S.E., Landén, M., Hultman, C.M., et al. (2018). The protocadherin 17 gene affects cognition, personality, amygdala structure and function, synapse development and risk of major mood disorders. *Molecular Psychiatry* *23*, 400–412.
- Chen, B., Brinkmann, K., Chen, Z., Pak, C.W., Liao, Y., Shi, S., Henry, L., Grishin, N.V., Bogdan, S., and Rosen, M.K. (2014a). The WAVE Regulatory Complex Links Diverse Receptors to the Actin Cytoskeleton. *Cell* *156*, 195–207.
- Chen, X.J., Squarr, A.J., Stephan, R., Chen, B., Higgins, T.E., Barry, D.J., Martin, M.C., Rosen, M.K., Bogdan, S., and Way, M. (2014b). Ena/VASP Proteins Cooperate with the WAVE Complex to Regulate the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell* *30*, 569–584.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B., Gomez, T.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M., Umetani, J., Billadeau, D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* *468*, 533–538.
- Cheng, H., Zheng, Z., and Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & Cell* *11*, 34–44.
- Chi, N.C., Shaw, R.M., De Val, S., Kang, G., Jan, L.Y., Black, B.L., and Stainier, D.Y.R. (2008). Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation. *Genes & Development* *22*, 734–739.
- Chou, S., and Lodish, H.F. (2010). Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 7799–7804.
- Chou, S., Flygare, J., and Lodish, H.F. (2013). Fetal hepatic progenitors support long-term expansion of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* *41*, 479–490.
- Cizelsky, W., Tata, A., Kuhl, M., and Kuhl, S.J. (2014). The Wnt/JNK signaling target gene *alcam* is required for embryonic kidney development. *Development* *141*, 2064–2074.
- Cooper, S.R., Jontes, J.D., and Sotomayor, M. (2016). Structural determinants of adhesion by Protocadherin-19 and implications for its role in epilepsy. *Elife* *5*, e18529.
- Couchman, J.R. (2010). Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *26*, 89–114.
- Coyer, S.R., Singh, A., Dumbauld, D.W., Calderwood, D.A., Craig, S.W., Delamarche, E., and García, A.J. (2012). Nanopatterning Reveals an ECM Area Threshold for Focal Adhesion Assembly and Force Transmission that is regulated by Integrin Activation and Cytoskeleton Tension. *Journal of Cell Science* *125*, 5110–5123.
- Curia, M.C., Fantini, F., Lattanzio, R., Tavano, F., Di Mola, F., Piantelli, M., Battista, P., Di Sebastiano, P., and Cama, A. (2019). High methylation levels of PCDH10 predict poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* *19*, 452.
- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S., and Pal, M. (2019). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *Journal of Cellular Physiology* *234*, 14535–14555.
- Davidson, A.J., and Zon, L.I. (2004). The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* *23*, 7233–7246.
- Davis-Dusenbery, B.N., Williams, L.A., Klim, J.R., and Eggan, K. (2014). How to make spinal motor neurons. *Development* *141*, 491–501.
- Dean, B., Keriakous, D., Scarr, E., and Thomas, E.A. (2007). Gene Expression Profiling in Brodmann’s Area 46 from Subjects with Schizophrenia. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* *41*, 308–320.

- Diaz-Cuadros, M., Wagner, D.E., Budjan, C., Hubaud, A., Tarazona, O.A., Donnelly, S., Michaut, A., Al Tanoury, Z., Yoshioka-Kobayashi, K., Niino, Y., et al. (2020). In vitro characterization of the human segmentation clock. *Nature* *580*, 113–118.
- Dibbens, L.M., Tarpey, P.S., Hynes, K., Bayly, M.A., Scheffer, I.E., Smith, R., Bomar, J., Sutton, E., Vandeleur, L., Shoubridge, C., et al. (2008). X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature Genetics* *40*, 776–781.
- Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* *495*, 231–235.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457–462.
- Drake, J., Davis, L., Hungerford, E., and Little, D. (1991). Perturbation of $\beta 1$ Integrin-Mediated Adhesions Results in Altered Somite Cell Shape and Behavior. *Developmental Biology* *149*, 327–338.
- Dray, N., Bedu, S., Vuillemin, N., Alunni, A., Coolen, M., Krecsmarik, M., Supatto, W., Beaurepaire, E., and Bally-Cuif, L. (2015). Large-scale live imaging of adult neural stem cells in their endogenous niche. *Development* *142*, 3592–3600.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhaus, S.C.F., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y.R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., et al. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* *123*, 37–46.
- Dunn, G.A., and Heath, J.P. (1976). A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Experimental Cell Research* *101*, 1–14.
- Duwé, S., and Dedecker, P. (2019). Optimizing the fluorescent protein toolbox and its use. *Current Opinion in Biotechnology* *58*, 183–191.
- Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunology* *9*, 129–136.
- Edelman, G.M., and Gallin, W.J. (1987). Cell Adhesion as a Basis of Pattern in Embryonic Development. *American Zoologist* *27*, 645–656.
- Ema, H., and Nakauchi, H. (2000). Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Hematopoiesis* *95*, 2284–2288.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* *123*, 4195–4200.
- Fujiwara, I., Takeda, S., Oda, T., Honda, H., Narita, A., and Maéda, Y. (2018). Polymerization and depolymerization of actin with nucleotide states at filament ends. *Biophysical Reviews* *10*, 1513–1519.
- Fukuhara, S., Zhang, J., Yuge, S., Ando, K., Wakayama, Y., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., and Mochizuki, N. (2014). Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish. *Developmental Biology* *393*, 10–23.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.-C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., et al. (1998). Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells. *Cell* *94*, 715–725.
- Gao, X., Xu, C., Asada, N., and Frenette, P.S. (2018). The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development* *145*, dev139691.
- Genuth, M.A., Allen, C.D.C., Mikawa, T., and Weiner, O.D. (2018). Chick cranial neural crest cells use progressive polarity refinement, not contact inhibition of locomotion, to guide their migration. *Developmental Biology* *444*, 252–261.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* *119*, 1079–1091.

- Giladi, A., Paul, F., Herzog, Y., Lubling, Y., Weiner, A., Yofe, I., Jaitin, D., Cabezas-Wallscheid, N., Dress, R., Ginhoux, F., et al. (2018). Single-cell characterization of haematopoietic progenitors and their trajectories in homeostasis and perturbed haematopoiesis. *Nature Cell Biology* *20*, 836–846.
- Gjorevski, N., S. Piotrowski, A., Varner, V.D., and Nelson, C.M. (2015). Dynamic tensile forces drive collective cell migration through three-dimensional extracellular matrices. *Scientific Reports* *5*, 11458.
- Glasauer, S.M.K., and Neuhauss, S.C.F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics* *289*, 1045–1060.
- Godin, I., and Cumano, A. (2002). The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nature Reviews Immunology* *2*, 593–604.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J.A., Dieterlen-Lièvre, F., and Cumano, A. (1999). Stem Cell Emergence and Hemopoietic Activity Are Incompatible in Mouse Intraembryonic Sites. *Journal of Experimental Medicine* *190*, 43–52.
- Gong, J. (1978). Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science* *199*, 1443–1445.
- Gottardi, C.J., Wong, E., and Gumbiner, B.M. (2001). E-Cadherin Suppresses Cellular Transformation by Inhibiting. *The Journal of Cell Biology* *153*, 11.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263–266.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* *495*, 227–230.
- Haas, P., and Gilmour, D. (2006). Chemokine Signaling Mediates Self-Organizing Tissue Migration in the Zebrafish Lateral Line. *Developmental Cell* *10*, 673–680.
- Habuchi, S., Tsutsui, H., Kochaniak, A.B., Miyawaki, A., and van Oijen, A.M. (2008). mKikGR, a Monomeric Photoswitchable Fluorescent Protein. *PLoS ONE* *3*, e3944.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., et al. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* *123*, 1–36.
- Halbleib, J.M., and Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & Development* *20*, 3199–3214.
- Haldi, M., Ton, C., Seng, W.L., and McGrath, P. (2006). Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis* *9*, 139–151.
- Hamilton, L., Astell, K.R., Velikova, G., and Sieger, D. (2016). A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells *In Vivo*. *Zebrafish* *13*, 523–534.
- Hammond, C.L., Hinits, Y., Osborn, D.P.S., Minchin, J.E.N., Tettamanti, G., and Hughes, S.M. (2007). Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Developmental Biology* *302*, 504–521.
- Harrison, O.J., Brasch, J., Katsamba, P.S., Ahlsen, G., Noble, A.J., Dan, H., Sampogna, R.V., Potter, C.S., Carragher, B., Honig, B., et al. (2020). Family-wide Structural and Biophysical Analysis of Binding Interactions among Non-clustered δ -Protocadherins. *Cell Reports* *30*, 2655–2671.
- Hatta, K., and Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* *320*, 447–449.
- Hayashi, S., and Takeichi, M. (2015). Emerging roles of protocadherins: from self-avoidance to enhancement of motility. *Journal of Cell Science* *128*, 1455–1464.

- Hayashi, S., Inoue, Y., Kiyonari, H., Abe, T., Misaki, K., Moriguchi, H., Tanaka, Y., and Takeichi, M. (2014). Protocadherin-17 Mediates Collective Axon Extension by Recruiting Actin Regulator Complexes to Interaxonal Contacts. *Developmental Cell* 30, 673–687.
- Helker, C.S.M., Schuermann, A., Karpanen, T., Zeuschner, D., Belting, H.-G., Affolter, M., Schulte-Merker, S., and Herzog, W. (2013). The zebrafish common cardinal veins develop by a novel mechanism: lumen ensheathment. *Development* 140, 2776–2786.
- Herbomel, P., and Levraud, J.-P. (2005). Imaging Early Macrophage Differentiation, Migration, and Behaviors in Live Zebrafish Embryos. *Methods Mol. Med.* 105, 199–214.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735–3745.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (2001). Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process. *Developmental Biology* 238, 274–288.
- Himburg, H.A., Termini, C.M., Schlusser, L., Kan, J., Li, M., Zhao, L., Fang, T., Sasine, J.P., Chang, V.Y., and Chute, J.P. (2018). Distinct Bone Marrow Sources of Pleiotrophin Control Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Regeneration. *Cell Stem Cell* 23, 370–381.
- Horstkorte, R., and Fuss, B. (2012). Cell Adhesion Molecules. In *Basic Neurochemistry*, (Elsevier), pp. 165–179.
- Horwitz, A.R. (2012). The origins of the molecular era of adhesion research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 805–811.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
- Hubaud, A., and Pourquié, O. (2014). Signalling dynamics in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 709–721.
- Hubbell, J.A., and Massia, S.P. (1992). Vascular Endothelial Cell Adhesion and Spreading Promoted by the Peptide REDV of the IIIICS Region of Plasma Fibronectin Is Mediated by Integrin $\alpha 4\beta 1$. *Biological Chemistry* 267, 14019–14026.
- Hubbell, J.A., Massia, S.P., Desai, N.P., and Drumheller, P.D. (1991). Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Biotechnology Journal* 9, 568–572.
- Hynes, K., Tarpey, P., Dibbens, L.M., Bayly, M.A., Berkovic, S.F., Smith, R., Raisi, Z.A., Turner, S.J., Brown, N.J., Desai, T.D., et al. (2010). Epilepsy and mental retardation limited to females with PCDH19 mutations can present de novo or in single generation families. *Journal of Medical Genetics* 47, 211–216.
- Innocenti, M. (2018). New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration. *Cell Adhesion & Migration* 12, 401–416.
- Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., et al. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 532, 323–328.
- Jamora, C., and Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 4, 101–108.
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S.K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., et al. (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology* 35, 244–275.
- Jin, H., Sood, R., Xu, J., Zhen, F., English, M.A., Liu, P.P., and Wen, Z. (2009). Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. *Development* 136, 1397–1397.

- Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D., and Pourquié, O. (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* *127*, 1421–1429.
- Julich, D., Cobb, G., Melo, A.M., McMillen, P., Lawton, A.K., Mochrie, S.G.J., Rhoades, E., and Holley, S.A. (2015). Cross-Scale Integrin Regulation Organizes ECM and Tissue Topology. *Developmental Cell* *34*, 33–44.
- Kane, D.A., and Kimmel, C.B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* *119*, 447–456.
- Kane, D.A., Warga, R.M., and Kimmel, C.B. (1992). Mitotic domains in the early embryo of the zebrafish. *Nature* *360*, 735–737.
- Kawakami, K., Koga, A., Hori, H., and Shima, A. (1998). Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* *225*, 17–22.
- Kawauchi, T. (2012). Cell Adhesion and Its Endocytic Regulation in Cell Migration during Neural Development and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* *13*, 4564–4590.
- Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends in Genetics* *9*, 317–321.
- Khan, J.A., Mendelson, A., Kunisaki, Y., Birbrair, A., Kou, Y., Arnal-Estape, A., Pinho, S., Ciero, P., Nakahara, F., Maayan, A., et al. (2016). Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* *351*, 176–180.
- Kiassov, A.P., Van Eyken, P., van Pelt, J.F., Depla, E., Fevery, J., Desmet, V.J., and Yap, P.S.H. (1995). Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: An immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation* *59*, 253–258.
- Kimmel, C.B., and Law, R.D. (1985). Cell Lineage of Zebrafish Blastomeres. *Developmental Biology* *108*, 78–85.
- Kimmel, C.B., Warga, R.M., and Kane, D.A. (1994). Cell cycles and clonal strings during formation of the zebrafish central nervous system. *Development* *120*, 265–276.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* *203*, 253–310.
- Kissa, K., and Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* *464*, 112–115.
- Kissa, K., Murayama, E., Zapata, A., Cortés, A., Perret, E., Machu, C., and Herbomel, P. (2008). Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization. *Blood* *111*, 1147–1156.
- Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y., and Hori, H. (1996). Transposable element in fish. *Nature* *383*, 30–30.
- Kojima, Y., Tam, O.H., and Tam, P.P.L. (2014). Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *34*, 65–75.
- Konantz, M., Balci, T.B., Hartwig, U.F., Delleire, G., André, M.C., Berman, J.N., and Lengerke, C. (2012). Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer: Human xenografts in zebrafish. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1266*, 124–137.
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., and Häussinger, D. (2013). Hepatic Stellate Cells Support Hematopoiesis and are Liver-Resident Mesenchymal Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* *31*, 290–304.
- Kotani, T., Nagayoshi, S., Urasaki, A., and Kawakami, K. (2006). Transposon-mediated gene trapping in zebrafish. *Methods* *39*, 199–206.
- Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D., and Yap, A.S. (2002). Cadherin-Directed Actin Assembly: E-Cadherin Physically Associates with the Arp2/3 Complex to Direct Actin Assembly in Nascent Adhesive Contacts. *Current Biology* *12*, 379–382.

- Krol, A.J., Roellig, D., Dequeant, M.-L., Tassy, O., Glynn, E., Hattem, G., Mushegian, A., Oates, A.C., and Pourquié, O. (2011). Evolutionary plasticity of segmentation clock networks. *Development* *138*, 2783–2792.
- Kubota, H., Yao, H., and Reid, L.M. (2007). Identification and Characterization of Vitamin A-Storing Cells in Fetal Liver: Implications for Functional Importance of Hepatic Stellate Cells in Liver Development and Hematopoiesis. *Stem Cells* *25*, 2339–2349.
- Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* *502*, 637–643.
- Kurusu, S., and Takenawa, T. (2009). The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biology* *10*, 226.
- Kyu Park, O., Kwak, J., Jung Jung, Y., Ho Kim, Y., Hong, H.-S., Joon Hwang, B., Kwon, S.-H., and Kee, Y. (2015). 3D Light-Sheet Fluorescence Microscopy of Cranial Neurons and Vasculature during Zebrafish Embryogenesis. *Molecules and Cells* *38*, 975–981.
- Lancino, M., Majello, S., Herbert, S., Chaumont, F.D., Tinevez, J.-Y., Olivo-Marin, J.-C., Herbomel, P., and Schmidt, A. (2018). Anisotropic organization of circumferential actomyosin characterizes hematopoietic stem cells emergence in the zebrafish. *Elife* *7*, e37355.
- Langenau, D.M. (2003). Myc-Induced T Cell Leukemia in Transgenic Zebrafish. *Science* *299*, 887–890.
- Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M., and Kemler, R. (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development* *122*, 3185–3194.
- Lawson, N.D., and Weinstein, B.M. (2002). In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology* *248*, 307–318.
- Le Guyader, D., Redd, M.J., Colucci-Guyon, E., Murayama, E., Kissa, K., Briolat, V., Mordelet, E., Zapata, A., Shinomiya, H., and Herbomel, P. (2008). Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood* *111*, 132–141.
- Lee, R.T.H., Knapik, E.W., Thiery, J.P., and Carney, T.J. (2013). An exclusively mesodermal origin of fin mesenchyme demonstrates that zebrafish trunk neural crest does not generate ectomesenchyme. *Development* *140*, 2923–2932.
- Li, D., Xue, W., Li, M., Dong, M., Wang, J., Wang, X., Li, X., Chen, K., Zhang, W., Wu, S., et al. (2018). VCAM-1+ macrophages guide the homing of HSPCs to a vascular niche. *Nature* *564*, 119–124.
- Li, L., Yang, M., Wang, C., Zhao, Q., Liu, J., Zhan, C., Liu, Z., Li, X., Wang, W., and Yang, X. (2012a). Effects of cytokines and chemokines on migration of mesenchymal stem cells following spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*. *7*, 1106–1112.
- Li, Z., Xie, J., Li, W., Tang, A., Li, X., Jiang, Z., Han, Y., Ye, J., Jing, J., Gui, Y., et al. (2011). Identification and characterization of human PCDH10 gene promoter. *Gene* *475*, 49–56.
- Li, Z., Chim, J.C.S., Yang, M., Ye, J., Wong, B.C.Y., and Qiao, L. (2012b). Role of PCDH10 and its hypermethylation in human gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1823*, 298–305.
- Liem Jr, K.F.L., Jessell, T.M., and Briscoe, J. (2000). Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* *127*, 4855–4866.
- Lin, H.-F., Traver, D., Zhu, H., Dooley, K., Paw, B.H., Zon, L.I., and Handin, R.I. (2005). Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* *106*, 3803–3810.
- Lin, T.-C., Yang, C.-H., Cheng, L.-H., Chang, W.-T., Lin, Y.-R., and Cheng, H.-C. (2019). Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells* *9*, 27.
- Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M., and Wang, Y. (2000). Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophysical Journal* *79*, 144–152.
- Lukyanov, K.A., Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Verkhusha, V.V. (2005). Photoactivatable fluorescent proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*, 885–890.

- Ma, J.-G., He, Z.-K., Ma, J.-H., Li, W.-P., and Sun, G. (2013). Downregulation of protocadherin-10 expression correlates with malignant behaviour and poor prognosis in human bladder cancer. *Journal of International Medical Research* *41*, 38–47.
- Ma, R.C., Jacobs, C.T., Sharma, P., Kocha, K.M., and Huang, P. (2018). Stereotypic generation of axial tenocytes from bipartite sclerotome domains in zebrafish. *PLoS Genet* *14*, e1007775.
- Mah, K.M., and Weiner, J.A. (2017). Regulation of Wnt signaling by protocadherins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *69*, 158–171.
- Mahony, C.B., Fish, R.J., Pasche, C., and Bertrand, J.Y. (2016). *tfec* controls the hematopoietic stem cell vascular niche during zebrafish embryogenesis. *Blood* *128*, 1336–1345.
- Matthews, H.K., Marchant, L., Carmona-Fontaine, C., Kuriyama, S., Larrain, J., Holt, M.R., Parsons, M., and Mayor, R. (2008). Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* *135*, 1771–1780.
- McMillen, P., Chatti, V., Jülich, D., and Holley, S.A. (2016). A Sawtooth Pattern of Cadherin 2 Stability Mechanically Regulates Somite Morphogenesis. *Current Biology* *26*, 542–549.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. *Cell* *86*, 897–906.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., MacArthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* *466*, 829–834.
- Modak, D., and Sotomayor, M. (2019). Identification of an adhesive interface for the non-clustered $\delta 1$ protocadherin-1 involved in respiratory diseases. *Communications Biology* *2*, 354.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., et al. (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 2483–2496.
- Moro, E., Ozhan-Kizil, G., Mongera, A., Beis, D., Wierzbicki, C., Young, R.M., Bournele, D., Domenichini, A., Valdivia, L.E., Lum, L., et al. (2012). In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains. *Developmental Biology* *366*, 327–340.
- Morrison, S.J., Hemmati, H.D., Wandycz, A.M., and Weissman, I.L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 10302–10306.
- Morrow, E.M., Yoo, S.-Y., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Lin, Y., Hill, R.S., Mukaddes, N.M., Balkhy, S., Gascon, G., Hashmi, A., et al. (2008). Identifying Autism Loci and Genes by Tracing Recent Shared Ancestry. *Science* *321*, 218–223.
- Moscona, A., and Moscona, H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy* *86*, 287–301.
- Müller, F., and O'Rahilly, R. (1986). Somitic-vertebral correlation and vertebral levels in the human embryo. *American Journal of Anatomy* *177*, 3–19.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50–56.
- Müller, A.M., Medvinsky, A., strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of Hematopoietic in the Mouse Embryo. *Immunity* *1*, 291–301.
- Murakami, T., Hijikata, T., Matsukawa, M., Ishikawa, H., and Yorifuji, H. (2006). Zebrafish protocadherin 10 is involved in paraxial mesoderm development and somitogenesis. *Developmental Dynamics* *235*, 506–514.
- Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H.-F., Handin, R.I., and Herbomel, P. (2006). Tracing Hematopoietic Precursor Migration to Successive Hematopoietic Organs during Zebrafish Development. *Immunity* *25*, 963–975.

- Murayama, E., Sarris, M., Redd, M., Le Guyader, D., Vivier, C., Horsley, W., Trede, N., and Herbomel, P. (2015). NACA deficiency reveals the crucial role of somite-derived stromal cells in haematopoietic niche formation. *Nature Communications* 6, 8375.
- Nakao, S., Platek, A., Hirano, S., and Takeichi, M. (2008). Contact-dependent promotion of cell migration by the OL-protocadherin–Nap1 interaction. *The Journal of Cell Biology* 182, 395–410.
- Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertocello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106, 1232–1239.
- Norden, C., and Lecaudey, V. (2019). Collective cell migration: general themes and new paradigms. *Current Opinion in Genetics & Development* 57, 54–60.
- Nürnberg, A., Kitzing, T., and Grosse, R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nature Reviews Cancer* 11, 177–187.
- Oda, H., and Takeichi, M. (2011). Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *The Journal of Cell Biology* 193, 1137–1146.
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity* 33, 387–399.
- Osmani, N., and Goetz, J.G. (2019). Multiscale Imaging of Metastasis in Zebrafish. *Trends in Cancer* 5, 766–778.
- Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z., and Qin, G. (2016). Research advances on structure and biological functions of integrins. *SpringerPlus* 5, 1094.
- Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., and Emelyanov, A. (2004). Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev. Dyn.* 231, 449–459.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 538–549.
- Pietras, E.M., Warr, M.R., and Passegué, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Journal of Cell Biology* 195, 709–720.
- Pinho, S., and Frenette, P.S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 303–320.
- Pittenger, M.F., Discher, D.E., Péault, B.M., Phinney, D.G., Hare, J.M., and Caplan, A.I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regenerative Medicine* 4, 22.
- Plamont, M.-A., Billon-Denis, E., Maurin, S., Gauron, C., Pimenta, F.M., Specht, C.G., Shi, J., Quérard, J., Pan, B., Rossignol, J., et al. (2016). Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 497–502.
- Poulos, M.G., Guo, P., Kofler, N.M., Pinho, S., Gutkin, M.C., Tikhonova, A., Aifantis, I., Frenette, P.S., Kitajewski, J., Rafii, S., et al. (2013). Endothelial Jagged-1 Is Necessary for Homeostatic and Regenerative Hematopoiesis. *Cell Reports* 4, 1022–1034.
- Pourquié, O. (1999). Notch around the clock. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 559–565.
- Pourquié, O. (2011). Vertebrate Segmentation: From Cyclic Gene Networks to Scoliosis. *Cell* 145, 650–663.
- Power, R.M., and Huisken, J. (2017). A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nature Methods* 14, 360–373.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229–233.
- Rashidi, N.M., and Lo Celso, C. (2014). Flying back to the nest: Intravital microscopy reveals how the niche can induce stemness. *IntraVital* 3, e29653.

- Radies, C., Vanhalst, K., and Roy, F. van (2005). δ -Protocadherins: unique structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2840–2852.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* 5, 605–607.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dölz, R., Jähnig, F., Epplen, J., and Mayer, S. (1987). The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *The EMBO Journal* 6, 3647–3653.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.-B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D. (2001). Crystal Structure of Arp2/3 Complex. *Science* 294, 1679–1684.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., and Harker, L. (1974). A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 1207–1210.
- Rotty, J.D., and Bear, J.E. (2015). Competition and collaboration between different actin assembly pathways allows for homeostatic control of the actin cytoskeleton. *BioArchitecture* 5, 27–34.
- Rozario, T., and DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology* 341, 126–140.
- Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R.L., Obata, S., Davidson, M., St John, T., Taketani, S., and Suzuki, S. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *The EMBO Journal* 12, 2249–2256.
- Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 557–568.
- Scarpa, E., and Mayor, R. (2016). Collective cell migration in development. *Journal of Cell Biology* 212, 143–155.
- Schaaf, M.J.M., Koopmans, W.J.A., Meckel, T., van Noort, J., Snaar-Jagalska, B.E., Schmidt, T.S., and Spaink, H.P. (2009). Single-Molecule Microscopy Reveals Membrane Microdomain Organization of Cells in a Living Vertebrate. *Biophysical Journal* 97, 1206–1214.
- Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O., and Drummen, G.P.C. (2019). Super-resolution microscopy demystified. *Nature Cell Biology* 21, 72–84.
- Schoenwolf, G.C. (1984). Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *American Journal of Anatomy* 169, 361–376.
- Seger, C., Hargrave, M., Wang, X., Chai, R.J., Elworthy, S., and Ingham, P.W. (2011). Analysis of Pax7 expressing myogenic cells in zebrafish muscle development, injury, and models of disease. *Dev. Dyn.* 240, 2440–2451.
- Seigfried, F.A., Cizelsky, W., Pfister, A.S., Dietmann, P., Walther, P., Kühl, M., and Kühl, S.J. (2017). Frizzled 3 acts upstream of Alcam during embryonic eye development. *Developmental Biology* 426, 69–83.
- Shan, W.-S., Koch, A., Murray, J., Colman, D.R., and Shapiro, L. (1999). The adhesive binding site of cadherins revisited. *Biophysical Chemistry* 82, 157–163.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59, 223–239.
- Shoval, I., Ludwig, A., and Kalcheim, C. (2006). Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development* 134, 491–501.
- Smith, L., Singhal, N., El Achkar, C.M., Truglio, G., Rosen Sheidley, B., Sullivan, J., and Poduri, A. (2018). PCDH19-related epilepsy is associated with a broad neurodevelopmental spectrum. *Epilepsia* 59, 679–689.

- Soga, N., Namba, N., McAllister, S., Cornelius, L., Teitelbaum, S.L., Dowdy, S.F., Kawamura, J., and Hruska, K.A. (2001). Rho Family GTPases Regulate VEGF-Stimulated Endothelial Cell Motility. *Experimental Cell Research* 269, 73–87.
- Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z., and Bergers, G. (2005). PDGFR β ⁺ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature Cell Biology* 7, 870–879.
- Stapor, P.C., Sweat, R.S., Dashti, D.C., Betancourt, A.M., and Murfee, W.L. (2014). Pericyte Dynamics during Angiogenesis: New Insights from New Identities. *Journal of Vascular Research* 51, 163–174.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E.B. (2006). Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes. *Molecular Biology of the Cell* 17, 2581–2591.
- Stickney, H.L., Barresi, M.J., and Devoto, S.H. (2000). Somite development in zebrafish. *Developmental Dynamics* 219, 287–303.
- Stockinger, A., Eger, A., Wolf, J., Beug, H., and Foisner, R. (2001). E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent β -catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 154, 1185–1196.
- Stoletov, K., and Klemke, R. (2008). Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene* 27, 4509–4520.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293–296.
- Tai, K., Kubota, M., Shiono, K., Tokutsu, H., and Suzuki, S.T. (2010). Adhesion properties and retinofugal expression of chicken protocadherin-19. *Brain Research* 1344, 13–24.
- Taichman, R.S., Reilly, M.J., and Emerson, S.G. (1996). Human Osteoblasts Support Human Hematopoietic Progenitor Cells in In Vitro Bone Marrow Cultures. *Blood* 87, 518–524.
- Takahashi, S., Leiss, M., Moser, M., Ohashi, T., Kitao, T., Heckmann, D., Pfeifer, A., Kessler, H., Takagi, J., Erickson, H.P., et al. (2007). The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *Journal of Cell Biology* 178, 167–178.
- Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *The Journal of Cell Biology* 75, 464–474.
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102, 639–655.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: A Molecular Family Important in Selective Cell-Cell Adhesion. *Annual Review of Biochemistry* 59, 237–252.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 619–627.
- Takeichi, M., and Abe, K. (2005). Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends in Cell Biology* 15, 216–221.
- Tam, P.P.L., and Behringer, R.R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of Development* 68, 3–25.
- Tamplin, O.J., Durand, E.M., Carr, L.A., Childs, S.J., Hagedorn, E.J., Li, P., Yzaguirre, A.D., Speck, N.A., and Zon, L.I. (2015). Hematopoietic Stem Cell Arrival Triggers Dynamic Remodeling of the Perivascular Niche. *Cell* 160, 241–252.
- Tan, K.S., Kulkeaw, K., Nakanishi, Y., and Sugiyama, D. (2017). Expression of cytokine and extracellular matrix mRNAs in fetal hepatic stellate cells. *Genes to Cells* 22, 836–844.
- Taneyhill, L.A., and Padmanabhan, R. (2014). The Cell Biology of Neural Crest Cell Delamination and EMT. In *Neural Crest Cells*, (Elsevier), pp. 51–72.
- Taneyhill, L.A., Coles, E.G., and Bronner-Fraser, M. (2007). Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest. *Development* 134, 1481–1490.

- Teddy, J.M. (2004). In vivo evidence for short- and long-range cell communication in cranial neural crest cells. *Development* *131*, 6141–6151.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *7*, 131–142.
- Thisse, B., and Thisse, C. (2014). In Situ Hybridization on Whole-Mount Zebrafish Embryos and Young Larvae. In *In Situ Hybridization Protocols*, B.S. Nielsen, ed. (New York, NY: Springer), pp. 53–67.
- Thu, C.A., Chen, W.V., Rubinstein, R., Chevee, M., Wolcott, H.N., Felsovalyi, K.O., Tapia, J.C., Shapiro, L., Honig, B., and Maniatis, T. (2014). Single-Cell Identity Generated by Combinatorial Homophilic Interactions between α , β , and γ Protocadherins. *Cell* *158*, 1045–1059.
- Tobia, C., Gariano, G., De Sena, G., and Presta, M. (2013). Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1832*, 1371–1377.
- Townes, P.L., and Holtfreter, J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *Journal of Experimental Zoology* *128*, 53–120.
- Travnickova, J., Tran Chau, V., Julien, E., Mateos-Langerak, J., Gonzalez, C., Lelièvre, E., Lutfalla, G., Tavian, M., and Kissa, K. (2015). Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. *Nature Communications* *6*, 6227.
- Tremblay, P., Dietrich, S., Mericskay, M., Schubert, F.R., Li, Z., and Paulin, D. (1998). A Crucial Role for Pax3 in the Development of the Hypaxial Musculature and the Long-Range Migration of Muscle Precursors. *Developmental Biology* *203*, 49–61.
- Turcotte, R., Liang, Y., Tanimoto, M., Zhang, Q., Li, Z., Koyama, M., Betzig, E., and Ji, N. (2019). Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *116*, 9586–9591.
- Ullah, M., Liu, D.D., and Thakor, A.S. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *IScience* *15*, 421–438.
- Varga, M. (2018). The Doctor of Delayed Publications: The Remarkable Life of George Streisinger (1927–1984). *Zebrafish* *15*, 314–319.
- Veevers-Lowe, J., Ball, S.G., Shuttleworth, A., and Kielty, C.M. (2011). Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through $\alpha 5$ 1-integrin-mediated activation of PDGFR- and potentiation of growth factor signals. *Journal of Cell Science* *124*, 1288–1300.
- Vincent, L.G., Choi, Y.S., Alonso-Latorre, B., del Álamo, J.C., and Engler, A.J. (2013). Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biotechnology Journal* *8*, 472–484.
- Vishwakarma, M., Di Russo, J., Probst, D., Schwarz, U.S., Das, T., and Spatz, J.P. (2018). Mechanical interactions among followers determine the emergence of leaders in migrating epithelial cell collectives. *Nature Communications* *9*, 3469.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* *103*, 3258–3264.
- Vittori, M., Breznik, B., Gredar, T., Hrovat, K., Bizjak Mali, L., and Lah, T.T. (2016). Imaging of human glioblastoma cells and their interactions with mesenchymal stem cells in the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic brain. *Radiology and Oncology* *50*, 159–167.
- Wakayama, Y., Fukuhara, S., Ando, K., Matsuda, M., and Mochizuki, N. (2015). Cdc42 Mediates Bmp-Induced Sprouting Angiogenesis through Fmnl3-Driven Assembly of Endothelial Filopodia in Zebrafish. *Developmental Cell* *32*, 109–122.
- Wang, J.P., and Hielscher, A. (2017). Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting. *J. Cancer* *8*, 674–682.
- Warga, R.M., and Kimmel, C.B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* *108*, 569–580.

- Weber, M., and Huisken, J. (2015). In vivo imaging of cardiac development and function in zebrafish using light sheet microscopy. *Swiss Medical Weekly* 145, w14227.
- Wen, J.H., Choi, O., Taylor-Weiner, H., Fuhrmann, A., Karpiak, J.V., Almutairi, A., and Engler, A.J. (2015). Haptotaxis is Cell Type Specific and Limited by Substrate Adhesiveness. *Cellular and Molecular Bioengineering* 8, 530–542.
- Werner, R., and Vance, L. (1988). Changes in the Vascular Extracellular Matrix during Embryonic Vasculogenesis and Angiogenesis. *Developmental Biology* 125, 441–450.
- Westerfield, M. (2000). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory use of Zebrafish (Danio Renio)* (The Institute of Neuroscience, University of Oregon).
- White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., et al. (2008). Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell* 2, 183–189.
- Wierzbicka P, I., and Schwarzbauer, J.E. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Science* 116, 3269–3276.
- Williams, J.S., Hsu, J.Y., Rossi, C.C., and Artinger, K.B. (2018). Requirement of zebrafish *pcdh10a* and *pcdh10b* in melanocyte precursor migration. *Developmental Biology* 444, 274–286.
- Willrodt, A.-H., Beffinger, M., Vranova, M., Protsyuk, D., Schuler, K., Jadhav, M., Heikenwalder, M., van den Broek, M., Borsig, L., and Halin, C. (2017). Stromal Expression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Promotes Lung Tumor Growth and Metastasis. *The American Journal of Pathology* 187, 2558–2569.
- Wineman, J., Moore, K., Lemischka, I., and Müller-Sieburg, C. (1996). Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood* 87, 4082–4090.
- Wolf, A., Aggio, J., Campbell, C., Wright, F., Marquez, G., Traver, D., and Stachura, D.L. (2017). Zebrafish Caudal Haematopoietic Embryonic Stromal Tissue (CHEST) Cells Support Haematopoiesis. *Scientific Reports* 7, 44644.
- Wolverton, T., and Lalande, M. (2001). Identification and Characterization of Three Members of a Novel Subclass of Protocadherins. *Genomics* 76, 66–72.
- Xian, X., Gopal, S., and Couchman, J.R. (2010). Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 339, 31–46.
- Xu, C., Gao, X., Wei, Q., Nakahara, F., Zimmerman, S.E., Mar, J., and Frenette, P.S. (2018). Stem cell factor is selectively secreted by arterial endothelial cells in bone marrow. *Nature Communications* 9, 2449.
- Xu, Y., Yang, Z., Yuan, H., Li, Z., Li, Y., Liu, Q., and Chen, J. (2015). PCDH10 inhibits cell proliferation of multiple myeloma via the negative regulation of the Wnt/ β -catenin/BCL-9 signaling pathway. *Oncology Reports* 34, 747–754.
- Xue, Y., Gao, S., and Liu, F. (2015). Genome-wide analysis of the zebrafish Klf family identifies two genes important for erythroid maturation. *Developmental Biology* 403, 115–127.
- Xue, Y., Lv, J., Zhang, C., Wang, L., Ma, D., and Liu, F. (2017). The Vascular Niche Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Lodgment and Expansion via *klf6a-ccl25b*. *Developmental Cell* 42, 349–362.
- Xue, Y., Liu, D., Cui, G., Ding, Y., Ai, D., Gao, S., Zhang, Y., Suo, S., Wang, X., Lv, P., et al. (2019). A 3D Atlas of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion by Multi-dimensional RNA-Seq Analysis. *Cell Reports* 27, 1567–1578.
- Yabe, T., and Takada, S. (2016). Molecular mechanism for cyclic generation of somites: Lessons from mice and zebrafish. *Development, Growth & Differentiation* 58, 31–42.
- Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14, 1169–1180.

- Yamaguchi, N., Mizutani, T., Kawabata, K., and Haga, H. (2015). Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin $\beta 1$ and PI3K. *Scientific Reports* 5, 7656.
- Yang, Y., Sun, M., Wang, L., and Jiao, B. (2013). HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 114, 967–974.
- Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T., et al. (2007). Activity-Induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TAO2 β and p38 MAP Kinases. *Neuron* 56, 456–471.
- Yu, J.S., Koujak, S., Nagase, S., Li, C.-M., Su, T., Wang, X., Keniry, M., Memeo, L., Rojzman, A., Mansukhani, M., et al. (2008). PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene* 27, 4657–4665.
- Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2004). Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood* 103, 2513–2521.
- Zhang, C., Peng, Y., Yang, F., Qin, R., Liu, W., and Zhang, C. (2016). PCDH8 is Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Liver Cancer: Diagnostic and Clinical Significance. *Journal of Cancer* 7, 446–452.
- Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S.R. (1996). An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227, 707–711.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., and Tsien, R.Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 906–918.
- Zhang, T., Guan, G., Chen, T., Jin, J., Zhang, L., Yao, M., Qi, X., Zou, J., Chen, J., Lu, F., et al. (2018). Methylation of PCDH19 predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 14, 352–358.
- Zhao, Y., Yang, Y., Trovik, J., Sun, K., Zhou, L., Jiang, P., Lau, T.-S., Hoivik, E.A., Salvesen, H.B., Sun, H., et al. (2014). A Novel Wnt Regulatory Axis in Endometrioid Endometrial Cancer. *Cancer Research* 74, 5103–5117.
- Zhao, Y., Zhou, J., Liu, D., Dong, F., Cheng, H., Wang, W., Pang, Y., Wang, Y., Mu, X., Ni, Y., et al. (2015). ATF4 plays a pivotal role in the development of functional hematopoietic stem cells in mouse fetal liver. *Blood* 126, 2383–2391.
- Zhou, D., Tang, W., Su, G., Cai, M., An, H.-X., and Zhang, Y. (2017). PCDH18 is frequently inactivated by promoter methylation in colorectal cancer. *Scientific Reports* 7, 2819.
- Zhou, Z., Li, Y., Wang, X., Hu, J., Kuang, M., Wang, Z., Li, S., Xu, W., and Xiao, J. (2018). ALCAM+ stromal cells: role in giant cell tumor of bone progression. *Cell Death & Disease* 9, 299.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nature Reviews Immunology* 11, 597–606.
- Zuazo-Gaztelu, I., and Casanovas, O. (2018). Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Frontiers in Oncology* 8, 248.

Annexe - Article en préparation

Title 1: A dual involvement of protocadherin-18a in the semi-collective migration of stromal cells and the formation of a functional hematopoietic niche.

or

Title 2: Protocadherin-18a expression in stromal cell progenitors is essential for the formation of a functional hematopoietic niche.

Authors: Anne-Lou Touret^{1,2,3}, Catherine Vivier^{1,2}, Anne Schmidt^{1,2}, Philippe Herbomel^{*,1,2} and Emi Murayama^{*,1,2,4}

¹ Institut Pasteur, Department of Developmental & Stem Cell Biology, Paris 75015, France.

² CNRS, UMR3738, Paris 75015, France.

³ Sorbonne Université, Ecole doctorale Complexité du Vivant, Paris 75005, France

⁴ INSERM, Paris 75013, France.

* Author for correspondence (philippe.herbomel@pasteur.fr, emur@pasteur.fr)

Keywords: Hematopoietic niche, stromal cells, cell migration, protocadherin, somite, cell adhesion molecule, extracellular matrix

Abstract

Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) emerge from the dorsal aorta and migrate to the caudal hematopoietic tissue (CHT) of zebrafish larvae, the hematopoietic equivalent of the mammalian fetal liver, for their proliferation and differentiation. We previously reported that somite-derived stromal cells were a key component of a functional CHT niche. Here we identified the cell adhesion protein protocadherin-18a (Pcdh18a) as a key molecular player that regulates stromal cell progenitor (SCP) emigration from the caudal somites toward the future CHT. Deletion of a major part of the intracellular domain of Pcdh18a caused an alteration in the distribution of filopodia in migrating SCPs, and the cell-contact mediated repulsion was also compromised when leader cells separated from their followers during the early stage of SCP migration. These defects in SCP migration / repulsion were followed by a decreased proliferation of SCPs in the developing CHT, and an abnormal morphology of the venous plexus that forms the CHT framework. The resulting CHT was no longer able to function as a niche for HSPCs. Expression analysis and immunostaining revealed that fibronectin was highly upregulated in the caudal vasculature. Finally, we found that the REDV motif, present in two copies in the extracellular domain of Pcdh18a, mediates the adhesion of stromal cells to vascular endothelial cells *in vivo* and consequently determines the reticular vs. perivascular fate of SCPs. Our study demonstrates that Pcdh18 expression in SCPs is essential for the proper development of the hematopoietic niche.

Introduction

In vertebrates, hematopoiesis occurs throughout life from hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in dedicated niches, such as the bone marrow in adult tetrapods. Such niches are typically structured by two kind of cells, vascular endothelial cells and mesenchymal stromal cells, among which several sub-types have been discerned (reviewed in Gao et al.,¹). Developmentally, the definitive HSCs arise from the embryo's aorta, and then migrate to their first niche, the fetal liver in mammals, in which they undergo expansion and differentiation into all hematopoietic cell types. Then past mid-gestation, they migrate to the bone marrow to establish lifelong hematopoiesis. While adult-type hematopoiesis in fish takes place in the kidney marrow, we found that in fish larvae, the aorta-derived definitive HSPCs first home to a dedicated niche in the tail, which we named the caudal hematopoietic tissue (CHT), that acts as the hematopoietic homologue of the fetal liver of mammals². We found that, as in tetrapods, the CHT niche mainly consists in a vascular component, the caudal venous plexus (CVP), and stromal cells that interconnect the vascular segments of the CVP. More recently, we found that these stromal arise from cell clusters formed within the ventral side of the caudal somites³. When the development of these stromal cell progenitors (SCPs) is impaired, the formation of CHT niche is affected, resulting in failure to maintain HSPCs and the absence of definitive hematopoiesis³. In zebrafish, somites are formed in rostro-caudal direction every 30 minutes at 28°C. The newly formed somite has an epithelial structure with a mesenchymal core inside, and as each somite matures, gradual differentiation of somitic epithelial cells occurs. The SCP clusters showed mesenchymal cell characteristics among surrounding epithelial somite cells and initiated ventral delamination from the somite. This suggested that SCPs migrate and differentiate following an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), but there is still a mystery as to why EMT occurs in a limited part of the somite. A well-studied example of EMT is the neural crest cells of xenopus, and it is known that the switch from E-cadherin to N-cadherin leads to contact inhibition of locomotion (CIL) during EMT⁴. In our case, 2-3 SCPs per somite are connected in a string during the initial stage of migration. We call this a 'semi-collective migration' because the number of SCPs in the group is fewer than that of neural crest cells or epithelial cells that are typical examples of collective

cell migration. At the same time and in the same area, vascular endothelial cells also migrate ventralwards from the primordial caudal vein to form the caudal venous plexus through sprouting angiogenesis⁵. Previously, we reported that the migration of SCPs and vascular endothelial cells during CVP formation appeared to be synchronized, but the molecular mechanisms remained unclear³.

Protocadherins (Pcdhs) are cell adhesion molecules that comprise the largest family of proteins within the cadherin superfamily and are subdivided into clustered and non-clustered Pcdhs. The non-clustered Pcdhs are evolutionarily conserved and vary in their regional pattern of expression, prominently within the nervous system⁶. They further divide into $\delta 0$, $\delta 1$ and $\delta 2$ subfamilies based on differences in the number of extracellular domains (ECD) as well as in the intracellular domain (ICD)⁷. $\delta 2$ -Pcdhs comprise Pcdh8, Pcdh10, Pcdh17, Pcdh18 and Pcdh19, and have six extracellular cadherin repeats and their cytoplasmic domain bearing two conserved motifs (CM1 and CM2)⁶. δ -Pcdhs preferentially mediate homophilic cell-cell interactions, although binding appears to be generally weaker than that of classical cadherins^{8,9}. In addition, $\delta 2$ -Pcdhs have been shown to mediate heterophilic *cis* interactions with classical cadherins^{10, 11, 12}. It still not established whether they can engage heterophilic *trans* interactions. Both Pcdh17 and Pcdh19 have been shown to carry a conserved RGD motif present in their extracellular domain (EC2), suggesting that they may interact with integrins¹³, but an actual molecular interaction has yet to be demonstrated.

The ICD of Pcdhs is known to play crucial roles in the activation of downstream signaling cascades (reviewed in Pancho et al.,¹⁴). Some Pcdhs have been reported to be involved in fine tuning of adhesion versus repulsion. For example, deletion of the ICD of Pcdh17 leads to a defect in cellular repulsion, resulting in axonal clumping of abducens motor neurons¹⁵. In addition, several Pcdhs are involved in the regulation of actin cytoskeletal dynamics through the WAVE regulatory complex (WRC) and the WRC interacting receptor sequence (WIRS) is highly conserved in all Pcdhs belonging to the $\delta 2$ -Pcdh subfamily¹⁶. Furthermore, Pcdh18 was identified as a binding partner for Disabled-1 (Dab1), which is a component of the Reelin signaling pathway that mediates neuronal migration during cortical lamination¹⁷. Several studies reported so far indicate that the downstream effectors of the non-clustered Pcdhs are involved in cell movements and motility.

Here, we report the identification of Pcdh18a as a molecule that is continuously expressed in the SCPs during the process of their appearance / emergence and migration in zebrafish embryos and is essential for the formation of a functional hematopoietic niche. Pcdh18a affects the migration of SCPs, notably the repulsion among leader cells, the number of SCPs, and their interactions with endothelial cells, the other main component of the CHT niche. It mediates stromal cell interaction with the endothelium, and thereby conditions the later differentiation fate of SCPs.

Results

Somite-derived stromal cell progenitors migrate alongside vascular endothelial cells

We previously reported that cell clusters containing stromal cell progenitors (SCPs) which give rise to stromal reticular cells (SRCs) appeared at the ventral side of caudal somites from 21-22 hpf³. Somites are formed one by one every 30 minutes in rostral-caudal direction, and then progressively mature¹⁸. They initially display an epithelial structure on their entire surface; then cell clusters consisting of about 15 to 20 SCPs per somite become apparent on the ventral side, and these cells soon emigrate as strings in ventral direction³. At about the same time, vascular endothelial cells sprout from the primordial caudal vein (PV) and migrate ventralwards together with the SCPs. To analyze the spatiotemporal migration path of SCPs in the caudal region relative to endothelial cells, we firstly performed live imaging using *Tg(pax3a:GFP; kdrl:ras-mCherry)* or *Tg(ET37:GFP; kdrl:ras-mCherry)* double transgenic embryos. The *pax3a:GFP* and *ET37:GFP* transgenes are initially expressed weakly throughout the somites, then *pax3a:GFP* becomes more strongly expressed in the lateral and ventral cell layers¹⁹ which comprise the SCP clusters, then both transgenes are expressed in the emigrating SCPs. The *kdrl:mCherry* transgene specifically labels endothelial cells. Confocal time-lapse imaging of the caudal region of double transgenic embryos in lateral view followed by digital reconstruction of transverse sections revealed that by 23-25 hpf, SCPs that delaminated from the somites then migrating ventralwards on the outer surface of the PV (in which blood flows from 25 hpf onwards) (Fig. 1A, a, b and Suppl. Movie 1). By 27 hpf, they co-migrated further ventrally together with endothelial cells extending from the ventral wall of the PV (Fig. 1B, a and Suppl. Movie 1), which by 36 hpf had fully organized into a functional caudal venous plexus (CVP) including the PV (Fig. 1A, c, d). Meanwhile, SCPs/SCs had settled in between the vascular segments of the CVP; some of them had migrated further ventrally, into the caudal fin to become fin mesenchymal cells (FMCs)¹⁹ (Fig. 1A, c, d). *In vivo* imaging at higher magnification revealed that during CVP morphogenesis, migrating SCPs and vascular endothelial cells dynamically stretched out filopodia through which they interacted (Fig. 1B, b-d), then the endothelial

cells appeared to join and form new lumenized vascular segments around the neighboring SCPs (Fig. 1B, b-d).

To further investigate the morphodynamics of migrating SCPs in the same time window, we switched to a new transgenic driver line created by us (Murayama *et al.* manuscript in preparation), TgBAC(*cspg4:GAL4*), which drives specific expression of Gal4 in SCPs and stromal cells (SCs) (in addition to the notochord), and combined it with a Tg(*UAS:Lifeact-GFP*) reporter line, allowing to highlight F-actin dynamics *in vivo* (Fig. 1C and Suppl. Movie 2). SCPs migrating on the outer surface of the PV and further ventrally extended filopodia toward their leading edge and in many other directions, and formed an extensive interconnected network (Fig. 1C, b, c and Suppl. Movie 2).

The cytoplasmic domain of Pcdh18a is involved in SCP migration

To understand the molecular mechanism of SCP emigration from the somites, we performed WISH analysis for genes encoding cell adhesion molecules, generally involved in cell migration. We first investigated the expression pattern of genes encoding cadherin family of proteins such as E- and N-cadherins during SCP specification in the caudal somites and the ensuing migration period. Since we found no cadherin expression specifically in SCPs, we moved to the protocadherin family. We found that *pcdh18a*, encoding Protocadherin-18a, was expressed in the developing SCPs (Fig. 2A). *pcdh18a* expression was first observed in the SCP clusters at the ventral side of caudal somites (Suppl. Fig. 1, a and a'). By 26-27 hpf, *pcdh18a* was expressed not only in SCP clusters but also in migrating SCPs derived from them (Suppl. Fig. 1, b and b'), in which expression persisted at least by 36 hpf (Suppl. Fig. 1, c and c').

To investigate the functional involvement of Pcdh18a in SCP migration, we firstly used an antisense morpholino oligonucleotide (MO). A splice-blocking MO targeting the intron1-exon2 boundary of nascent *pcdh18a* RNA led to retention of intron1 in the mRNA (Fig. 2B, a), resulting in a frameshift past codon 734, and a premature termination codon 13 codons downstream, with the consequent predicted loss of most of the cytoplasmic domain of the protein (704 out of 810 amino acids; Fig. 2B, b; Suppl. Fig. 2A and B). The cytoplasmic domain depleted by the *pcdh18a* MO notably contains the WIRS peptide¹⁶ involved in the regulation of F-actin and the Dab1 interacting domain¹⁷ that may regulate a tyrosine kinase pathway (Fig. 2B, b), both of

which are highly similar to human orthologs (Fig. 2B, c). We then performed the MO injection in the *Tg(pax3a:GFP; TCF:nls-mCherry)* line, which labels somite-derived SCPs with GFP^{high} signals in addition to the GFP^{dim} signal of bulk somite cells, and Wnt signaling-responding somitic cells with nuclear mCherry. By 24-30 hpf, we observed delamination and emigration of SCPs from the ventral side of caudal somites in both control and *pcdh18a* MO-injected embryos (Fig. 2C).

We next examined how the cytoplasmic domain of Pcdh18a affected SCP migration. We focused our analysis on the leader cells of the strings of SCPs that emigrated from each caudal somite. We found that the SCP leader cells in *pcdh18a* morphants showed a zigzag-like migration pattern (Fig. 2D, a-c), and as a result, the straightness of the cell trajectories was affected in the morphants (Fig. 2D, d). Then, we analyzed possible differences in the speed of SCP leader cells migration between controls and *pcdh18a* morphants. Firstly, we found that their migration process in wild-type embryos can be divided into two phases: a first phase of fast movement lasting about 90 min, followed by a short rest and then a relatively slow second phase (Fig. 2E, a). This velocity change probably corresponds to the transition from migration on the primordial vein surface to a movement in the three-dimensional extracellular matrix further ventrally, synchronized with the migration and interconnection of endothelial cells in the process of forming the venous plexus. In contrast, the SCP leader cells of morphant embryos migrated at a slower, relatively uniform speed without going through the phases (Fig. 2E, a, b). In addition, in the *pcdh18a* morphants, migrating SCPs frequently showed a more elongated cell body and thick cellular projections in several directions (Suppl. Fig. 3).

Pcdh18a regulates cell dynamics by modulating cell protrusions

To further analyze possibly abnormal traits in the migration behaviour of SCP leader cells in *pcdh18a* morphants, we crossed the *TgBAC(cspg4:GAL4)* line with *Tg(UAS:lifeact-eGFP)*, in which lifeact-eGFP allows to highlight F-actin *in vivo*, so as to visualize actin dynamics and cellular projections during SCP migration (Fig. 3A and Suppl. Movie 3). In the control group, a high intensity GFP signal was observed in leader cells mainly in the direction of cell migration (dashed arrows). In contrast, in *pcdh18a* morphants, cellular projections were more frequently detected towards the opposite direction (corresponding to 140°-180° angles; Fig. 3B). A quantitative analysis (using the Filopodyan plugin for FIJI²⁰) confirmed that compared to control embryos,

leader cells in *pcdh18a* morphants displayed a similar total number of filopodia (mean = 11 / cell), as well as towards the direction of migration, but more filopodia than controls towards the opposite direction (Fig. 3C).

Next, we focused on the features of cell-cell junctions between leader cells and their followers in the SCP strings emigrating from the somites. At the beginning of their migration in control embryos, the leader cells sometimes contact each other via their filopodia, but these interactions are transient, and they don't affect the direction of migration of the involved cells (Fig. 3D, a-c). In contrast, in *pcdh18a* morphants, when such contacts occur, they last longer, and seem to rather foster more contacts, with a resulting change of migration direction of at least one of the two cells (Fig. 3D, d-f) - a behaviour that may contribute to the lesser straightness of leader cell trajectories in morphants that we observed above (Fig. 2D). The wild-type SCPs perform semi-collective migration in which 2-3 cells are connected immediately after delamination from the somite, but after a while, the leader cells separate from the follower cells. In *pcdh18a* morphants, a strong phenotype was found in which leader cells did not easily separate from follower cells during their migration (arrows, Fig. 3E). Among 12 embryos analyzed, we found 18 leader cells with a long (>10 μm) connection to the follower cells, and only 4 leader cells with such a long connection in the controls. In addition, these long connections had an almost 2-fold longer mean duration in the morphants (4h50 vs. 2h40, Fig. 3F). Finally, when the connection eventually broke up, it took much more time to retract back to the cell in the morphants (Suppl. Movie 4).

Effects of Pcdh18a on SCP development

Our WISH analysis had shown that *pcdh18a* is continuously expressed from the early appearance of SCP clusters to the end of SCP/SC migration (Suppl. Fig. 1). Therefore, we looked at the effect of the lack of most of the cytoplasmic domain of Pcdh18a on the number of SCPs and their progeny during their development. Cell counting was performed (using the ET37:GFP line which labels somite-derived mesenchymal cells) at 26 and 36 hpf, corresponding to the early and latest stages of SCP migration, and at 50 hpf, i.e. once SCs have settled in the venous plexus. We found no difference at 26 hpf, but a nearly 2-fold lower stromal cell number in *pcdh18a* morphants by 36 hpf and 50 hpf, compared with control embryos (Fig. 4A). We therefore aimed to quantify the frequency of cell divisions of SCPs/SCs during the migration (24-36 hpf) and settlement / maturation (36-46 hpf) phases, using time-lapse

confocal imaging over these two developmental time windows. [To monitor the cell division of SCPs during the migration period, we used *Tg(pax3a:GFP)* combined with *Tg(TCF:nls-mCherry)* (Fig. 4B, a-c), as *in vivo* labeling of SCPs in the ET37:GFP line is not strong enough yet at 24-25hpf.] We found no difference in the observed SCP division number between control and *pcdh18a* morphants in the 24-30 hpf and 30-36 hpf intervals (Fig. 4B, d, e), and a 2-fold reduction in SCP/SC divisions number in the morphants in the 36-46 hpf interval (Fig. 4C, d), which matched the nearly 2-fold difference in average cell number at the beginning and end of the studied time window (Fig. 4A), indicating an actually similar proliferation rate.

By 50 hpf, we identified at least two subtypes of ET37:GFP⁺ stromal cells settled in the CHT niche (Fig. 4D). The first is the previously reported stromal reticular cells (SRCs), which extend cellular projections that interconnect the vascular segments of the venous plexus (Fig. 4D, a, b, e, f). The second is stromal perivascular cells (SPvCs), that adhere to endothelial cells of the plexus over their entire surface (Fig. 4D, a, b, g, h). To investigate the involvement of *Pcdh18* in the development of these two stromal cell subtypes and of the venous plexus, we performed *pcdh18a* MO injection in *Tg(ET37:GFP; kdrl:ras-mCherry)* embryos. In *pcdh18a* morphants, we observed again a decrease in ET37:GFP⁺ stromal cell numbers, and also morphological changes in the venous plexus (Fig. 4D, a-d). We next compared the numbers of SRCs, SPvCs and FMCs between *pcdh18a* morphants and controls. All three cell types showed a substantial decrease in *pcdh18a* morphants (45% for SRCs, 36% for SPvCs, and 33% for FMCs; Fig. 4D, i).

The cytoplasmic domain of *Pcdh18a* in stromal cells is indirectly involved in vascular morphogenesis

We next investigated how SCPs behave during the process of plexus formation using *Tg(pax3a:GFP; kdrl:ras-mCherry)* around 29 hpf in control and *pcdh18a* morphants (Fig. 5A and Suppl. Movie 5). In the control group, SCPs were always located at the forefront of vascular endothelial cells that actively branched and migrated to the ventral side, and they physically interacted with vascular endothelial cells via cellular projections / filopodia (Fig. 5A, a-d). In contrast, both vascular endothelial cells and SCPs migrated to the ventral side in *pcdh18a* morphants, but their active interactions were not observed as seen in the control embryos. In addition, the endothelial cells extended projections even in the absence of SCPs, and their

interaction with nearby SCPs was rarely observed (Fig. 5A, e-h). Another phenotype observed in *pcdh18a* morphants was the presence of multiple SCPs at the forefront of migrating endothelial cells (Fig. 5A, e-h). This phenomenon may be linked to the retention of interactions among leader SCPs in *pcdh18a* morphants shown above (Fig. 3D-F).

In the early stages of plexus formation, vascular endothelial cells migrate while extending a large number of filopodia and projections in control embryos (Fig. 5B, a-d, and Suppl. Movie 6A), whereas the number of filopodia / cellular projections is clearly reduced in *pcdh18a* morphants (Fig. 5B, e-h and Suppl. Movie 6B). In the controls, the most ventral endothelial cells, that will form the definitive caudal vein, interact with appropriate neighbor cells by elongation of cellular projections. The resulting newly formed tube (future caudal vein) is approximately parallel to the body axis (Fig. 5B, d). In contrast, this vascular remodeling was heavily affected in the *pcdh18a* morphants; the plexus had fewer branching points compared with controls and tended to show a simpler / flatter structure (Fig. 5B, h). Large inter-vascular loops (IVLs) were observed as one of the main phenotypes frequently occurring among *pcdh18a* morphants (Fig. 5B, e-h and Fig. 5C, a and b). A statistical analysis revealed that the number of IVLs was decreased by one third relative to controls, whereas their mean 2D surface area was increased 2-fold (Fig. 5B, c, d).

Depletion of the cytoplasmic domain of Pcdh18a leads to excess deposition of fibronectin in the future hematopoietic niche

Depletion of the cytoplasmic domain of Pcdh18a resulted in the reduction of stromal cell numbers and altered interactions among SCPs. These phenotypes were accompanied by a decrease in projections / filopodia of vascular endothelial cells and morphological changes in the resulting venous plexus. We speculated that in addition to the direct involvement of Pcdh18a, there may be other factors affected by Pcdh18a malfunction that may act on both SCPs and vascular endothelial cells in terms of their interactions during vascular remodeling. Therefore, we looked for genes encoding extracellular matrix molecules expressed in the caudal plexus area during the time window of its formation (24-36 hpf; data not shown). qPCR analysis of *syndecan2*, *cspg4* (chondroitin sulfate proteoglycan 4), *hspg2* (heparan sulfate proteoglycan 2), *fn1a* and *fn1b* (fibronectin 1a and 1b) expression using cDNA prepared from the tails of control and *pcdh18a* morphants revealed that *fn1a* and *fn1b* were specifically

upregulated in the morphants at 36 hpf (Fig. 6A). Next, immunostaining using an anti-Fibronectin antibody revealed that fibronectin was highly deposited at the caudal plexus and somite boundaries in *pcdh18a* morphants at 36 hpf (Fig. 6B). Optical transverse sections of *pcdh18a* morphant (Fig. B-ii) showed the labeling of mCherry+ endothelial cells by the anti-Fibronectin antibody. Then, we performed WISH analysis to identify the cells that produce fibronectin. We detected *fn1a* expression rather ubiquitously throughout the embryo in control and *pcdh18a* morphants at 23 hpf (Fig. 6C, a and b). At 26 and 36 hpf, in addition to the ubiquitous expression, expression of *fn1a* in the caudal region was enhanced in *pcdh18a* morphants compared to control embryos (Fig. 6C, c-f). *fn1b* expression was more specific of caudal somites by 23 hpf, and strongly up-regulated there in *pcdh18a* morphants (Fig. 6C, g and h). At 26 hpf, specific expression of *fn1b* was observed in the forming caudal plexus of *pcdh18a* morphants but not in control embryos (Fig. 6C, i-j'). *fn1b* expression was no longer detected at 36 hpf in the tail of control embryos, but still strongly present in the *pcdh18a* morphants (Fig. 6, k and l).

Cell adhesion via the extracellular domain of Pcdh18a contributes to determining stromal cell subtypes

In addition to cell-cell adhesion through homophilic binding via their extracellular domain (ECD)²¹, protocadherins may also engage in heterophilic interactions¹³. We therefore wondered if the ECD of Pcdh18a might be involved in the adhesion of SCPs to vascular endothelial cells. We first searched for cell adhesion motifs such as RGD in the ECD of Pcdh18a. Instead of the RGD motif, we found there two REDV motifs, that were originally identified in human plasma fibronectin as a peptide that binds to vascular endothelial cells (Fig. 7A, a). Therefore, we decided to investigate how SCPs behave when a mutation is introduced into the REDV motifs in Pcdh18a. Firstly, to choose the substitution patterns of the four amino acid residues of REDV, we used the SWISS-MODEL server for protein structure prediction to see how various mutations may affect the conformation of the ECD of Pcdh18a. We performed structural predictions for four different substitution patterns - AAAA, AEA, AEDA and RAAV - and found that the substitution from REDV to AEA best retained the three-dimensional structure of Pcdh18a, at least under the condition of homophilic interaction (Fig. 7A, a and b).

Next, we analyzed the effect of these amino-acid changes *in vivo* by expressing the ECD and transmembrane domain of Pcdh18a carrying wild-type (REDV) or mutant (AEAV) sequences, fused to GFP instead of the intracellular domain of Pcdh18a. To overexpress either form specifically in SCPs, we inserted these constructs downstream of a UAS promoter (UAS:pcdh18a-ECD^{REDV}-GFP and UAS:pcdh18a-ECD^{AEAV}-GFP), and injected the resulting plasmids into Tg(*cspg4:Gal4; kdrl:ras-mCherry*) embryos, so as to also visualize vascular endothelial cells. We then analyzed the resulting embryos by live confocal imaging at 50 hpf, i.e. when the SCPs have differentiated into stromal cell subtypes. We first observed that in GFP+ cells, the GFP signal was not homogeneous throughout the cytoplasmic and membrane regions, but was localized in patches (Fig. 7B, a, c, e, g). In embryos overexpressing the WT (REDV) Pcdh18a ECD, GFP+ stromal cells were mainly (80%) of the perivascular subtype, i.e. closely adherent to vascular endothelial cells of the venous plexus (Fig. 7B, c and d). In contrast, GFP+ stromal cells overexpressing the ECD of Pcdh18a into which the AEA mutation was introduced were mainly of the reticular type (Fig. 7B, e and f), and those that were more perivascular displayed a characteristic defect in attachment to the vascular endothelium. They were generally smaller in 2D size than those of control embryos, and only part of the cell adhered to the endothelium (Fig. 7B, g and h).

We then counted the proportions of stromal cells of the two subtypes – reticular and perivascular - among GFP+ cells overexpressing either the wt or the mutant Pcdh18a ECD form (Fig. 7C). While in normal uninjected embryos, the ratio of stromal reticular to perivascular cell number is 80:20 (Fig. 4D, i), overexpression in stromal cells of the wt Pcdh18a ECD form led to a sheer inversion of this ratio, to 20:80, indicating that this condition strongly favored the perivascular fate. In striking contrast, overexpression in stromal cells of the mutated (AEAV) Pcdh18a ECD form led to a reticular versus perivascular ratio, similar to that found in uninjected embryos, i.e. 80:20. Altogether these qualitative and quantitative results demonstrate that the ECD of Pcdh18a is required for the extensive adhesion of stromal cells to endothelial cells that characterizes the perivascular subtype, and that this effect is strictly dependent on the REDV peptides of the Pcdh18a ECD.

Pcdh18a impairment leads to a non-functional hematopoietic niche

We have thus shown that Pcdh18a affects the migration pattern of SCPs and their interaction with endothelial cells, and thereby conditions the final structure of the venous plexus, and the differentiation of SCPs into reticular vs. perivascular stromal cells. We finally examined to what extent Pcdh18a impairment affected the resulting niche function of the CHT for HSPCs. We found that in *pcdh18a* morphants, definitive aorta-derived HSPCs expressing *myb* were present in the sub-aortic space of the trunk by 36 hpf in numbers similar to control embryos. Yet by 2.5 and 3 dpf, only few of them had homed to the CHT in the morphants (as evidenced by CD41-GFP^{low} HSPCs and CD41-GFP^{high} pro-thrombocytes, Suppl. Fig. 4B, and by *myb* expression, Suppl. Fig. 4A c, d). The incapacity of the morphant CHT to support hematopoiesis became even more evident by 5 dpf, when hematopoietic cell numbers in this niche reach their maximum in wild-type larvae² (Suppl. Fig. 4A e, f).

Discussion

Stromal cell progenitors (SCPs) differentiate from zebrafish caudal somites via an epithelial to mesenchymal transition (EMT). The timing of EMT in SCPs during somite development is still uncertain, but probably SCPs remain in the cluster for a while after the EMT, then delaminate ventrally around 23-24 hpf. Mesenchymal cell migration is characterized by cell polarization, forming a leading edge that extends actin-rich protrusions, and subsequent migration by retraction of the contractile rear. Cell migration and cell adhesions are interdependent processes that influence diverse cellular fates. Neural crest cells (NCCs), a highly motile mesenchymal cell population, undergo collective cell migration, and the involvement of cadherins in this process is widely known. Like NCCs, SCPs undergo collective migration, but we call this a 'semi-collective migration' because the number of cells in a group is fewer (2-3 cells) than for NCCs. Semi-collective migration of SCPs is observed immediately after delamination from the SCP cluster located at the ventral side of somites, and shortly thereafter, the leader cell releases itself from the follower. This characteristic indicates that binding through cell adhesion molecules (CAMs) among SCPs may be less tight (or more flexible) than that of NCCs or epithelial cells which are well-documented examples of collective migration. We observed no expression of cadherin genes in the SCPs during the time window of EMT (data not shown) suggesting that protocadherins (Pcdhs) such as Pcdh18a may act as a substitute for cadherins in SCPs.

To date, several studies on Pcdhs functions in developing neurons have been reported. Asakawa and Kawakami reported a Pcdh-mediated repulsive force in abducens motor neurons in zebrafish¹⁵. They found neuron clumping in a mutant lacking the intracellular domain (ICD) of Pcdh17, suggesting that a region in the ICD of Pcdh17 was involved in the molecular pathway controlling the machinery of cellular repulsion. Defects in the separation between leader and follower cells in the early stage of SCP migration, which we revealed using pcdh18a morphants in this study, may also be due to a dysfunction of repulsion caused by the lack of most of the ICD. Cell repulsion requires the downregulation of cell adhesions and extensive changes in cytoskeletal dynamics²². Of particular note is the presence of the WAVE regulatory complex interacting receptor sequence (WIRS), which is involved in the regulation of actin, and is found in ICDs of Pcdh 10, 17, 18 and 19¹⁶. It is also possible that a

mechanism such as contact inhibition of locomotion (CIL), a process found in the developmental process of NCCs in xenopus⁴, is involved in the separation of leader cells among SCPs. The 'E- to N-cadherin switch' controls CIL by leading to cell repolarization, and this process is supposed to be regulated by N-cadherin signaling. Given the potential for this cascade to result in cell repulsion, the ICD of Pcdh18a may indeed somehow be involved in signaling pathways leading to repulsion in SCPs. The ICD of mouse Pcdh18 has been reported to bind to Disabled-1 (Dab1), a molecule that associates with Src tyrosine kinase during the development of the central nervous system¹⁷. The ICD of zebrafish Pcdh18a has a conserved Dab1 binding domain at the C-terminus; in addition, the juxtamembrane region carries a Src homology 3 (SH3) binding domain. Therefore, in the ICD of zebrafish Pcdh18a, the signaling pathway located downstream of Src kinase may act similarly to the above-mentioned N-cadherin signaling, eventually leading to cell repulsion. The pcdh18a morphants retain the SH3 binding domain but lack the Dab1 binding domain. That is, in SCPs, Dab1 may first be phosphorylated by Src kinase, and phosphorylated Dab1 may activate the signal transduction pathway that regulates cell repolarization by binding to the C-terminus of Pcdh18a.

SCPs appear as clusters at the ventral side of caudal somites and then egress and migrate ventralwards, during which the expression of pcdh18a in SCPs is constant. During this time, Pcdh18a is thought to be involved in cell-cell interactions via its ECD. It is generally known that Pcdhs engage in homophilic interactions, so that SCPs also interact with each other through the ECD of Pcdh18a during their development in the cluster and the following semi-collective migration. In the process of cell migration, cell adhesion molecules influence the mode of cell-cell interaction. Pcdhs, rather than cadherins, play a role in the process of SCP migration, probably due to the weaker homophilic interactions than those of cadherin. The reason seems to be to ensure the flexibility to switch from collective migration among SCPs to the interaction with vascular endothelial cells in a short time after delaminating from somite clusters. Although there are few studies showing direct evidence of heterophilic interaction in Pcdhs, it has been reported that the conserved RGD motif that is essential for integrin-dependent cell adhesion is present in the ECD of Pcdh 17 and 19 in several species²³. The vascular endothelial cells forming the caudal plexus have been reported to express a variety of integrins²⁴, but no RGD motif was found in the ECD of Pcdh18a. Therefore, we investigated whether there is another motif that may

recognize vascular endothelial cells in the ECD of Pcdh18a. The REDV motif is a peptide sequence originally found in human plasma fibronectin, and has been reported to selectively bind to vascular endothelial cells through integrins^{25,26}. We found two such REDV motifs in the ECD of Pcdh18a. By mutating the REDV motif in SCPs/SCs specifically, we demonstrated that the ECD of Pcdh18a is important for the interaction of these cells with vascular endothelial cells during the formation of the CHT niche. This result raises additional questions about the mechanism of SCP differentiation; when SCP adheres to vascular endothelial cells, do physical factors such as a difference in the size of surface area influence the differentiation of SCPs into stromal perivascular vs. stromal reticular cells? SCPs and vascular endothelial cells interact with each other via filopodia and/or cellular projections in the initial process of SCP migration. SCPs stop migrating after 32-34 hpf then settle in the vascular plexus. During this time window, no morphological difference among settled SCPs was observed between control and pcdh18a morphants. Do SCPs trapped in the inter-vascular loop of plexus during the migration preferentially differentiate into stromal reticular cells? On the contrary, do SCPs settled in the plexus stabilize themselves by increasing the adhesive surface area and differentiate into stromal perivascular cells?

One of the prominent phenotypes in pcdh18a morphant is the morphological defects of the vascular plexus that constitutes CHT. *In vivo* imaging of pcdh18a morphants revealed that vascular endothelial cells autonomously migrate toward the ventral side even if the interaction with SCPs is compromised. This suggests that the presence of molecules such as cytokines or morphogens that attract the vascular endothelial cells ventrally in the caudal region is the main driving force for their migration. In addition, SCPs may play a role in orchestrating the migration pattern of vascular endothelial cells. It is then quite possible that the action of SRCs and SPvCs may affect the remodeling of vascular endothelial cells. In addition, we also took into account the possibility that the ECM is indirectly involved in the remodeling of vascular endothelial cells. Surprisingly, immunostaining revealed that fibronectin was excessively accumulated in the CHT of pcdh18a morphants. WISH analysis demonstrated that *fn1b* expression was markedly elevated in the caudal somites of pcdh18a morphants at 24 hpf. In addition, *fn1b* was expressed in caudal vasculature, which was not observed in control embryos at 36 hpf. These results suggest that fibronectin produced in the caudal somites at 24hpf may be released into the caudal cavity, then newly produced and secreted from caudal endothelial cells in the pcdh18a

mophants at 36hpf. In any case, excess accumulation of fibronectin in the caudal region may contribute to the observed defects in plexus / CHT formation. The surface of vascular endothelial cells might be masked by fibronectin, which would interfere with the interaction between stromal cells and vascular endothelial cells. Stromal cells may recognize and interact with integrins expressed on vascular endothelial cells through the REDV sequences located in the ECD of Pcdh18a. No REDV sequence was found in zebrafish Fibronectins, but one and two RGD sequences were found in Fn1a and Fn1b, respectively. Furthermore, a LDV motif recognized by integrin $\alpha4\beta5$ ²⁷ was also identified in one and two loci in Fn1a and Fn1b, respectively. However, it remains unclear why the deficiency of the Pcdh18a-ICD increases the expression level of the fibronectin genes in somites and vascular endothelial cells. The timing and approximate locus of fibronectin overexpression coincides with those of Pcdh18a in the developing SCPs; Pcdh18a⁺ SCPs reside primarily in somites clusters at 24 hpf, then they settle around the caudal plexus at 36 hpf. Therefore, we speculate that unusual cell-cell interactions caused by Pcdh18a defects in SCPs may induce a microenvironmental stress and promote the secretion of extracellular matrix, notably fibronectin, by nearby cells.

This study adds new insights into the functions of Pcdh18a, an adhesion molecule that plays an essential role in the migration of SCPs, a newly recognized cell model that undergoes EMT. After the EMT, 1) SCPs remain in the clusters at the ventral side of somites for a while, 2) followed by semi-collective cell migration in which 2-3 cells are in line, but shortly after, 3) switch the binding partner from SCPs to vascular endothelial cells. Pcdh18a is continuously expressed in SCPs during the time window of the above-mentioned steps 1-3. Thus, in a different state of cell dynamics in SCPs, Pcdh18a may flexibly regulate the functions of the extracellular and intracellular domains in response to the microenvironment. Substrate selectivity or affinity for mesenchymal cell migration is also a crucial point in the field of cancer research. Cancer cells are known to disseminate in amoeboid, mesenchymal, and collective cell migration modes, which are affected by tumor microenvironment and treatment²⁸. Recent discussions have raised the possibility that such a plasticity of cancer cell migration is a hindrance to certain treatments (reviewed in Wu et al.²⁹, Clark and Vignjevic³⁰). Our research contributes to the understanding of cell behavior *in vivo* by analyzing the function of a protein that could be a molecular switch of 'migration modes' affecting the cell plasticity during cancer metastasis and tumorigenesis.

Materials and Methods

Zebrafish husbandry

Fish maintenance at the Institute follows the regulation of the 2010/63 UE European directives. We used several zebrafish transgenic lines, including Tg(*pax3a:eGFP*)³¹, Tg(*ET37:eGFP*)³², Tg(*kdr1:ras-mCherry*)³³, Tg(*UAS;Lifeact-eGFP*)³⁴, Tg(*cspg4:Gal;UAS:RFP*) created in the lab. Embryos were collected and raised at 28°C, or at 24°C, taking in account the 25% delay in development relative to 28°C, as described³⁵. In order to prevent pigmentation, embryos develop in N-Phenylthiourea (PTU, *Sigma Aldrich*, P7629)/Volvic source water (0.003% final), supplemented with 280 mg/L methylene blue (*Sigma Aldrich*, M4159). For experiments, embryos were anesthetized in tricaine 1x (*Sigma Aldrich*, A5040), equivalent to a final concentration of 160 µg/ml.

Plasmid constructs

First, we cloned the *pcdh18a* whole sequence in a pG1_Tol2_hsp70 vector, from a pool of 25 to 36 hpf cDNA embryo tails (see section mRNA extraction and cDNA synthesis). We separate the gene in 4 fragments (around 1000 bp each) and amplified them by using the Expand High Fidelity Polymerase (*Sigma-Aldrich*, 11732641001) and the primers 1 to 8 (see Table 1). We used the TA cloning kit (*Thermo Fisher*, K202020) to clone the DNA fragments. Then, we used the Gibson Assembly strategy (*NEB*, E2611S) to obtain the whole gene sequence, by using the primers 9 to 16 (see Table 1). To generate the UAS:*pcdh18a*ECD^{REDV/AEAV}-GFP constructs, we used the pG1_Tol2_hsp70:*pcdh18a* as a template and the Gibson Assembly strategy with the vector Tol2_4xnr_UAS_eGFP and the primers 17 to 20 for REDV non mutated form and the intermediate primers 21 to 24 for AEAV mutated form by using a PCR-directed-mutagenesis approach (see Table 1, mutated sites in bold). We sent the constructs for sequencing and checked any mutation compared to the *pcdh18a* sequence of reference.

#	Primers	Sequences (5' – 3')
1	Int cloning _ <i>pcdh18a</i> FP1	GATACGCGCAACAGATTTCTCC
2	Int cloning _ <i>pcdh18a</i> RP1	TTCCCATTGGCCCCCTTCATC
3	Int cloning _ <i>pcdh18a</i> FP2	CTGACTCGAACGACAACAATCC
4	Int cloning _ <i>pcdh18a</i> RP2	AACAACAGAGCAGGAGAGGTC
5	Int cloning _ <i>pcdh18a</i> FP3	ACGTGACTGTTGTGTGACTG

6	Int cloning _ pcdh18a RP3	ACTCCTCCGTACACAATCTCATG
7	Int cloning _ pcdh18a FP4	CGAGGCCAGCTTCAGAG
8	Int cloning _ pcdh18a RP4	CGTTCTCACGTGCGACTCAATC
9	Gib_hsp70_pcdh18a FP1	CTGGAATTCGGTACCCCTCGAGGATATCGCCACCATGGAGACTAGCAAGGGTACAGTGCTC
10	Gib_hsp70_pcdh18a RP1	CTTCATCTGGGTCAGTGGCGTTCCAG
11	Gib_hsp70_pcdh18a FP2	CTGAACGCCACTGACCCAGATGAAG
12	Gib_hsp70_pcdh18a RP2	CATTAGCACCAGCATCATGGTCCATCG
13	Gib_hsp70_pcdh18a FP3	CGATGGACCATGATGCTGGTGCTAATG
14	Gib_hsp70_pcdh18a RP3	CAGACTGAACTTATCCATGTCCTGGAGGG
15	Gib_hsp70_pcdh18a FP4	CCCTCCAGGACATGGATAAGTTCACTCTG
16	Gib_hsp70_pcdh18a RP4	GGCTGATTATGATCGCGGCCGCGGATCCTTAGCTCTGGCGTACGTCCTGAAGC
17	Gib_UAS_pcdh18aDCD_FP1	GACGCGTGGATCCACCGGTGCCACGCCACCATGGAGACTAGCAAGGGTACAGTG
18	Gib_UAS_pcdh18aDCD_RP2	GAGCCACGAATGTATCTACAGGAGCC
19	Gib_UAS_pcdh18aDCD_FP3	GGCTCCTGTAGATACATTCGTGGCTC
20	Gib_UAS_pcdh18aDCD_RP4	GTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTGAGCAGCGAAGGGCAAAGGCC
21	Gib_UAS_pcdh18aDCD ^{AEAV} _RP1	CTTGGAAGTTTGGACAAAACATCAGCGACA G CTTCT GC AAGTCTGGCTATCACAGTAC
22	Gib_UAS_pcdh18aDCD ^{AEAV} _FP2	GGTGGTACTGTGATAGCCAGACTT GC AGAAG C TGTCGCTGATGTTTTGTCCAAACTTC
23	Gib_UAS_pcdh18aDCD ^{AEAV} _RP3	CCTGGACCAAAAATGAAATCTGACTTACA G CTTCA GC ATCAAAAGTACGTAGTGC
24	Gib_UAS_pcdh18aDCD ^{AEAV} _FP4	CATTTATGCACTACGTACTTTTGTAT GC TGAAG C TGTAAGTCAGATTTTCATTTTTGGTC

Table 1. Primer used for intermediate and Gibson cloning of *pcdh18a*

Plasmid and morpholino injections

Plasmids containing the constructs were purified using the NucleoBond Xtra Midi endotoxin free kit (*Macherey Nagel*, 740420.10). Into one cell-stage zebrafish embryos, we co-injected 15 pg of UAS:*pcdh18aDCD*^{REDV/AEAV}-GFP construct with 25 pg of *tol2* transposase mRNA, transcribed from linearized pCS-zT2TP plasmid³⁶, using the mMESSAGE mMACHINE SP6 kit (*Ambion*, AM1340). Embryos expressing the transgenic marker and GFP from the construct were taken and imaged at the desired stages.

Splice blocking morpholino, targeting the exon1-intron1 splicing site of *pcdh18a* (5' – TACTGACCCTGATGGAGTATTGAGA – 3'), was injected at an amount of 4 ng into one cell-stage zebrafish embryos. We used a standard control from GeneTools (5' – CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA – 3'), which target a mutated form of the human beta-globin pre-mRNA, at an amount of 4 ng. Controls and morphants were taken randomly, on a base of expressing the transgenic marker if needed for fluorescent microscopy.

Immunohistochemistry

Dechorionated and anesthetized embryos were fixed at desired stages in 4% FA (*Polysciences*, 040181) during 2 hours at RT and then rinse in PBSDT (PBS 1x, 0.01% DMSO, 0.1% Triton x100 (*Sigma*, T9284)) for a use in the week. The first day, embryos are treated with Tween 0.1% during 30 min at RT, then with acetone during 20 min at -20°C and rinsed in Hank's Balanced Salt Solution, HBSS 1x (*Invitrogen*, Gibco 14025), supplemented with 0.1% Tween. To permeabilize, embryos are treated with collagenase (*Sigma*, C9891) at a final concentration of 1 µg/ml, then rinse in PBSDT and incubate in blocking solution 1x WBR (*Roche*, 11921673001) for at least 4 hours. Samples are incubating overnight at 4°C with primary antibodies anti-GFP-Chricken (*Abcam*, ab13970, used at 1/800), anti-mCherry-Mouse (*Abcam*, ab125096, used at 1/100), anti-fibronectin-Rabbit (*Sigma-Aldrich*, F3648, used at 1/100), anti-PCDH18-Rabbit (*ThermoFisher Scientific*, PA5-53686, used at 1/100). The second day, embryos are rinsed several times in PBSDT and the endogenous peroxidase is inactivated by a treatment with H₂O₂ 6% (*Sigma*, H1009) during 30 min. Then embryos are incubated in the blocking solution for at least 4 hours and incubate overnight at 4°C with secondary antibodies anti-Chicken-AF488 (*Invitrogen*, A11039, used at 1/800), anti-Rabbit-HRP (*ThermoFisher Scientific*, G-21234, used at 1/300), anti-Mouse-HRP (*ThermoFisher Scientific*, G-21040, used at 1/300). The last day, samples are rinsed several times in PBT and the indirect revelation is done with imidazole 1M (*Sigma*, I5513)/PBT supplemented with H₂O₂, in the red: Alexa Fluor™ 546 Tyramide Reagent (*Invitrogen*, B40954, used at 1/200) or in the far red: Alexa Fluor™ 647 Tyramide Reagent (*Invitrogen*, B40958, used at 1/25). Finally, embryos are treated with DAPI (*Thermo Scientific*, 62248) and gradually passed in glycerol 80%.

Whole mount in situ hybridization

Dechorionated and anesthetized embryos were fixed at desired stages in 4% FA (*Polysciences*, 040181) overnight at 4°C and stored in 100% methanol at -20°C. The protocol used is based on³⁷. The first day, embryos are rehydrated progressively in PBT and permeabilized using 10 mg/ml Proteinase K (*Ambion*, AM2546) for 5 min, then refixed in 4% FA for 20 min. Embryos are incubated for at least 4 hours at 60°C in pre-hybridization buffer (HB+) and then with 200 ng of Digoxigenin-labeled probe. Probes are synthesized from a PCR product or a linearized plasmid (see Table 2) with the T7 or SP6 RNA polymerase (*Promega*, P4074 or P4084) in presence of DIG-UTP

nucleotides. The second day, embryos are rinsed in HB- buffer (HB+ without torula RNA and heparin) supplemented with saline-sodium citrate buffer (SSC, *Sigma*, S6639) and then passed gradually in PBT. They are incubated for at least 4 hours in blocking solution 1x WBR (*Roche*, 11921673001) and incubated overnight at 4°C with anti-Digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (*Roche*, 11207733910, used at 1/4000). The last day, embryos are rinsed several times in PBT and the staining reaction is performed. Samples are incubated in NTMT buffer (100 mM Tris HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween) for at least 5 min and then with NBT/BCIP (*Sigma*, N6639, B-8503) diluted in the NTMT buffer. The reaction is stopped by replacing the solution with PBT and embryos are stored in 80% glycerol. Bright field images are captured using a ZEISS Axio Zoom.V16 with a 160x zoom.

From PCR	sens primer (5' – 3')	(+T7) antisens primer (5' – 3')
<i>fn1a</i>	AACTCTGTCCTGCTGCTTCC	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGCTTTGGTGAGTTTGCTGGCC
<i>fn1b</i>	GTTGGCGATGTGAGAACTGC	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGCGGCAGTAAAACAAGGACGG
<i>pcdh18a</i>	TGGAAGAAATGGAGACGGCC	aagcttTAATACGACTCACTATAGGGCGCCAGGGTTTTGAAAGTGG
From plasmid		
<i>myb</i>	Plasmid obtained from Len Zon (Children Hospital Boston) _ T7 promotor _ GenbankID: NM_001309822.1	

Table 2. Primers and plasmids used to synthesize WISH probes

RNA extraction and cDNA synthesis

We anesthetized embryos and cut their tails just after the yolk sac at desired stages. Batch of 10 tails are immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For experiments batch of 30 to 60 tails are pooled per biological replicates and 3 biological replicates are used per condition.

For mRNA extraction we used TRIzol™ (*Invitrogen*, 15596026) and lysed tissues by mechanic pipetting. A volume of 1:5 chloroform is added, samples are vortexed and centrifuged. The aqueous phase is transferred to a new tube and a volume of 1:1 isopropanol is added to precipitate, samples are incubated 30 min at -20°C and centrifuged. Pellet is rinse in 75% ethanol and resuspended in RNase free water. Samples are treated with DNase I (*Invitrogen*, AM2239), precipitated a second time with GlycoBlue™ (*Invitrogen*, AM9515) and centrifuged. Pellet is rinsed in 70% ethanol, resuspended in RNase free water and samples are stored at -80°C.

For cDNA synthesis, we used the Super Script IV kit (*Thermo Fisher*, 18091200) and followed exactly the protocol provided. We adjusted the amount of RNA used to have

the same for each replicate with a maximum amount of 2500 µg RNA. Samples are treated with RNase H to remove any trace of RNA for 20 min at 37°C and stored at -20°C.

Quantitative real-time PCR

As describe previously, total RNAs were extracted at 36 hpf from tails of control or *pcdh18a* MO injected embryos. cDNAs were synthesized and diluted at a final concentration of 15 µg/µl for each biological replicate. qPCR was performed using 7.5 µl of Takyon Rox SYBR Master mix blue dTTP kit (*Eurogentec*, UF-RSMT-B0701), 1.5 µl of cDNA and 0.5 µl of each 5µM primers (see Table 3). Real time qPCR was carried out for three biological replicates with measurements taken from three technical replicates on an Applied Biosystems 7300 Real Time PCR system (Thermofisher). After normalization with zebrafish elongation factor 1a (*ef1a*), the relative expression of *fn1a* and *fn1b* was determined by using the delta-delta-Ct method.

Primer efficiency measurement is done by diluted a reference batch of cDNA at 5x, 10x, 20x, 40x and performed a qPCR as describe previously. Calibration curves are obtained with the delta-delta-Ct method and the formula $(10^{(-1/\text{slope})-1}) \times 100$ to obtain the efficiency. Only primer with an efficiency comprised between 90 and 110%, with no amplification in H2O negative control, are selected.

gene	Sens primer (5' – 3')	Antisens primer (5' – 3')	Efficiency
<i>ef1a</i>	CAGCATTATCCAGTCCTTAAGTAGAGTGC	GCGTCATCAAGAGCGTTGAGAAG	95 %
<i>fn1a</i>	CCCCAGGAATCTCAGACTCAG	TGTTGATGTACCAGGCAGACG	91 %
<i>fn1b</i>	TGGGAGCGCATGTCTGATAC	CTCCCACTTTTCGCCAATGC	98 %

Table 3. qPCR primers and efficiency measurement

Assessment of *pcdh18a* morpholino specificity and efficiency

To verify that *pcdh18a* MO prevent splicing of the first intron of *pcdh18a* gene, we performed PCR on cDNA from control or *pcdh18a* MO injected embryos. We used one primer into exon1 and one into exon2: FP 5' – CAGTCGTCAATCCCTGAACAG – 3' and RP 5' – GCTGCGAGAGTATTTGTTCCC – 3', or one primer into exon1 and one into exon3: FP 5' – CAGTCGTCAATCCCTGAACAG – 3' and RP 5' – CGCCACGCCCACTATCTTTC – 3' and see that the size of DNA fragments of

morphants correspond to the insertion of intron1 compared to controls. Sequencing *pcdh18a* morphants confirmed the intron1 retention and the apparition of an early STOP codon in reading frame, which predict the production of a truncated protein in the cytoplasmic part.

Embryo mounting for confocal imaging

Dechorionated and anesthetized embryos were mounted in lateral position with their tails in close contact with the bottom of a μ -Dish 35 mm glass-bottom (*Ibidi*, 81158). They were surrounded of 1x low melting agarose (*Promega*, V2111), incorporated of 1x tricaine /1x PTU Volvic water, which was also added on top of it after agarose solidification.

In vivo confocal imaging

Setup and experimental procedure were exactly the same between independent experiments from series of replicates.

For *in vivo* lived imaging we used an inverted spinning disk confocal microscope (Andor, Resolution WD, Yokagawa CSUW1), equipped with 488 nm and 561 nm diode for excitation, 2 cameras Hamamatsu (ORCA-Flash4.0 LT digital CMOS, 2048x2048 pixel), HC PL APO CS2 63x water objective (NA 1.20, WD 300 μ m) and the MetaMorph[®] acquisition software. Optical planes were spaced by 0.3 μ m and diode powers were put at 10% with exposure time between 100 and 300 ms, depending on the transgenic line used.

For *in vivo* time lapse imaging, we used an inverted laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP8, CTR 6500), equipped with 488 nm and 552 nm laser for excitation, 2 PMT and a Hybrid Detectors, Leica HC PL APO CS2 40x water objective or 20x immersion objective (NA 1.1, WD 650 μ m or NA 0.75, WD 670 μ m respectively) and the LAS X acquisition software. Usually, 2 controls and 2 morphants are acquired in the same experiment every 10 min with optical planes spaced by 1.5 μ m.

For immunohistochemistry imaging, we used an inverted scanning confocal microscope, allowing to acquire DAPI coloration (Leica TCS SPE, CTR 6000), equipped with 405 nm, 488 nm, 532 nm and 635 nm laser for excitation, 3 PMT detectors, a Leica ACS APO 40x oil objective (NA 1.15, WD 270 μ m) and the LAS X acquisition software. Optical planes are spaced by 0.8 μ m.

Image analysis

For basic image treatment, we used the Fiji software (PMID 22743772) and for 3D visualization we used the Imaris software (*Bitplane*, v8.1). Cell tracking was made by using the manual tracking function of TrackMate plugin (v.6.0.3) of Fiji and plotted with a Python script, provided by a collaboration with the image hub analysis of Institut Pasteur in Paris.

For filopodia analysis, we used Filopodyan plugin (v1.2.6) available on Fiji. For each condition, 10 isolated cells were extracted during 10 time points, corresponding to 90 min of cell migration, from time lapses of Tg(*cspg4:Gal4* ; *UAS:Lifeact-GFP*) embryos injected with control or *pcdh18a* MO. For Filopodyan setup, we used the triangle threshold, 2 or 3 ID iterations and from 1 to 3 LoG sigma, allowing to detected brut angles of filopodia, compared to image orientation, and filopodia length for each cell. Thanks to the time lapse files, we have access to the direction of cell migration between time window analyzed. Through a Python script, provided by a collaboration with the image hub analysis of Institut Pasteur in Paris, we have access to the relative angle of filopodia compared to the direction of cell migration from 0° to 180° (without distinguishing left and right) and the length for each filopodia.

Statistical analysis

Basic statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 software. Graph represent mean \pm SD. To compare control to morphant groups, we first verified if the data followed a normal distribution by using the Shapiro-Wilk test. If it was the case, we used a Student t-test assuming that both populations have the same SD, if not we used the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. For the homogeneity of the analyzes, if one data set followed a normal distribution and the other not, in the same experiment series, we applied the non-parametric test for both.

Filopodyan analysis was performed using a R-script provided by a collaboration with the bioinformatic hub of Institut Pasteur in Paris. Because the same cell is followed during 10 time points to get an average of the relative angle for each cell, results are not independent. The linear mixed effect model was performed to add a random variable effect, allowing to model the effect of repeated measurements for each cell. From that, we detected that morphant cells have relative angles on average 14.9° greater compared to control cells, which is significant ($p = 0,0041$). The rose diagram

represents for x axis the value of the relative angles (from 0° to 180°) and for y axis their frequency (0, 25, 50, 75, 10), with relative angles grouped every 10 degrees.

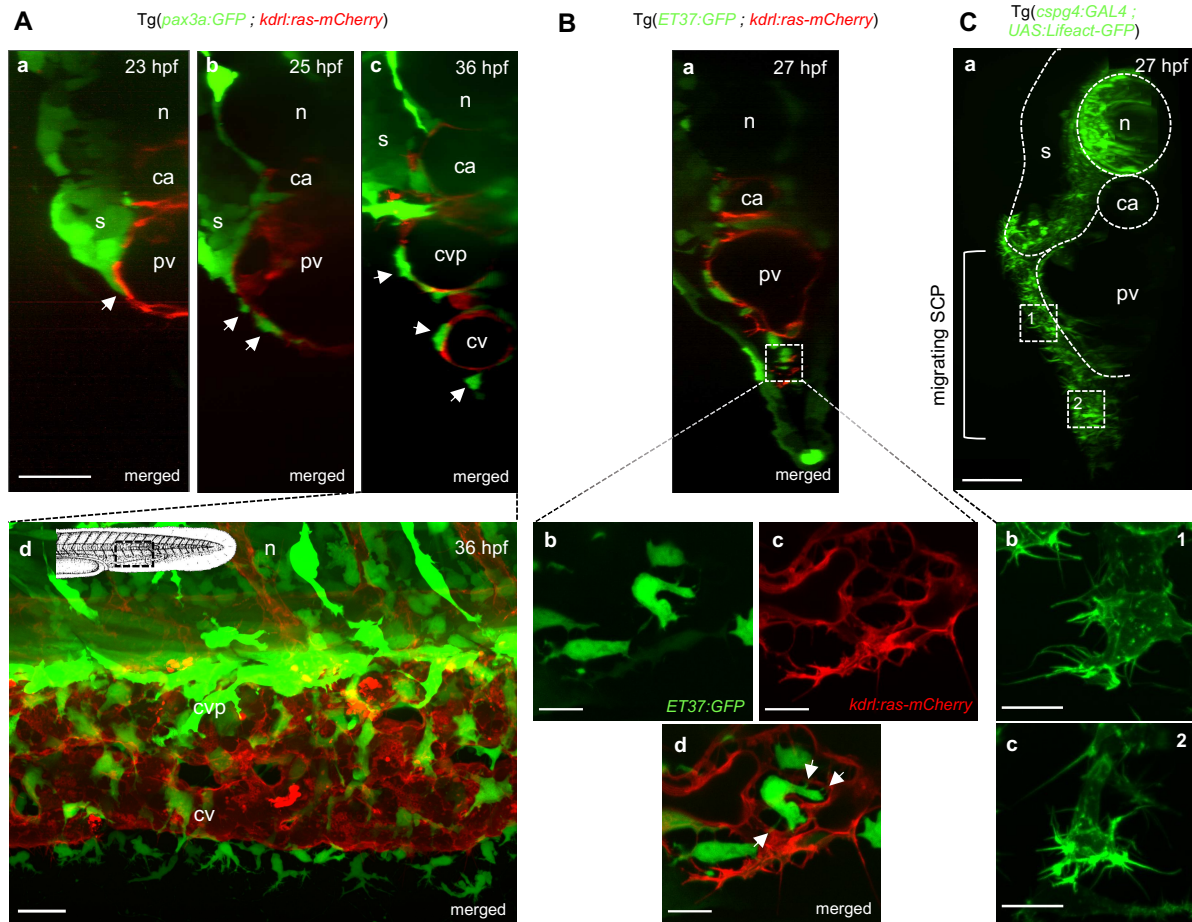


Figure 1. Stromal-endothelial cell interactions during SCP migration and caudal vein plexus formation

(A) Confocal spinning disk acquisitions of live transgenic *Tg(pax3a:GFP; kdr:ras-mCherry)* embryos. **(a, b, c)** Optical transverse sections reconstituted by Imaris software for the wild-type embryos at 23, 25 and 36 hpf. n, notochord; ca, caudal artery; pv, primordial vein; cvp, caudal vein plexus; cv, caudal vein. White arrows indicate SCPs migrating on the primordial vein or stromal cells located in the caudal vein plexus. Scale bar, 30 μm . **(d)** Projection of the caudal region of a wild-type embryo at 36 hpf. GFP^{high} and GFP^{dim} cells correspond to pigment cells and SCP derivatives, respectively. Scale bar, 20 μm . **(B)** Confocal spinning disk images of live transgenic *Tg(ET37:GFP; kdr:ras-mCherry)* embryos at 27 hpf. **(a)** Optical transverse section. **(b, c, d)** Magnified projections from 3 confocal planes spaced by 0.6 μm at the region indicated by a dotted square in (a), ventral to the primordial vein where the sprouting angiogenesis is active to form the future caudal vein plexus. Active protrusions and filopodia are observed in migrating endothelial cells (**c**) and a stromal cell interacts with an endothelial cell through some filopodia (**d**, white arrows). Scale bars, 10 μm . **(C)** Confocal spinning disk acquisition of live transgenic *Tg(cspg4:GAL4; UAS:Lifeact-GFP)* embryo at 27 hpf. **(a)** Optical transverse section. S, somites. SCPs migrate in a 2D mode during their early migration in close contact with the primordial vein (dotted square indicated by 1) and in a more 3D mode when they co-migrate with developing endothelial cells (dotted square indicated by 2). Scale bar, 20 μm . **(b, c)** Magnified images of SCPs in 2D (**b**) and 3D (**c**) migration modes. Note that the cell in a 3D migration mode (**c**) has more cellular projections / filopodia toward the direction of migration compared with the cell in a 2D migration mode (**b**). Scale bars, 10 μm .

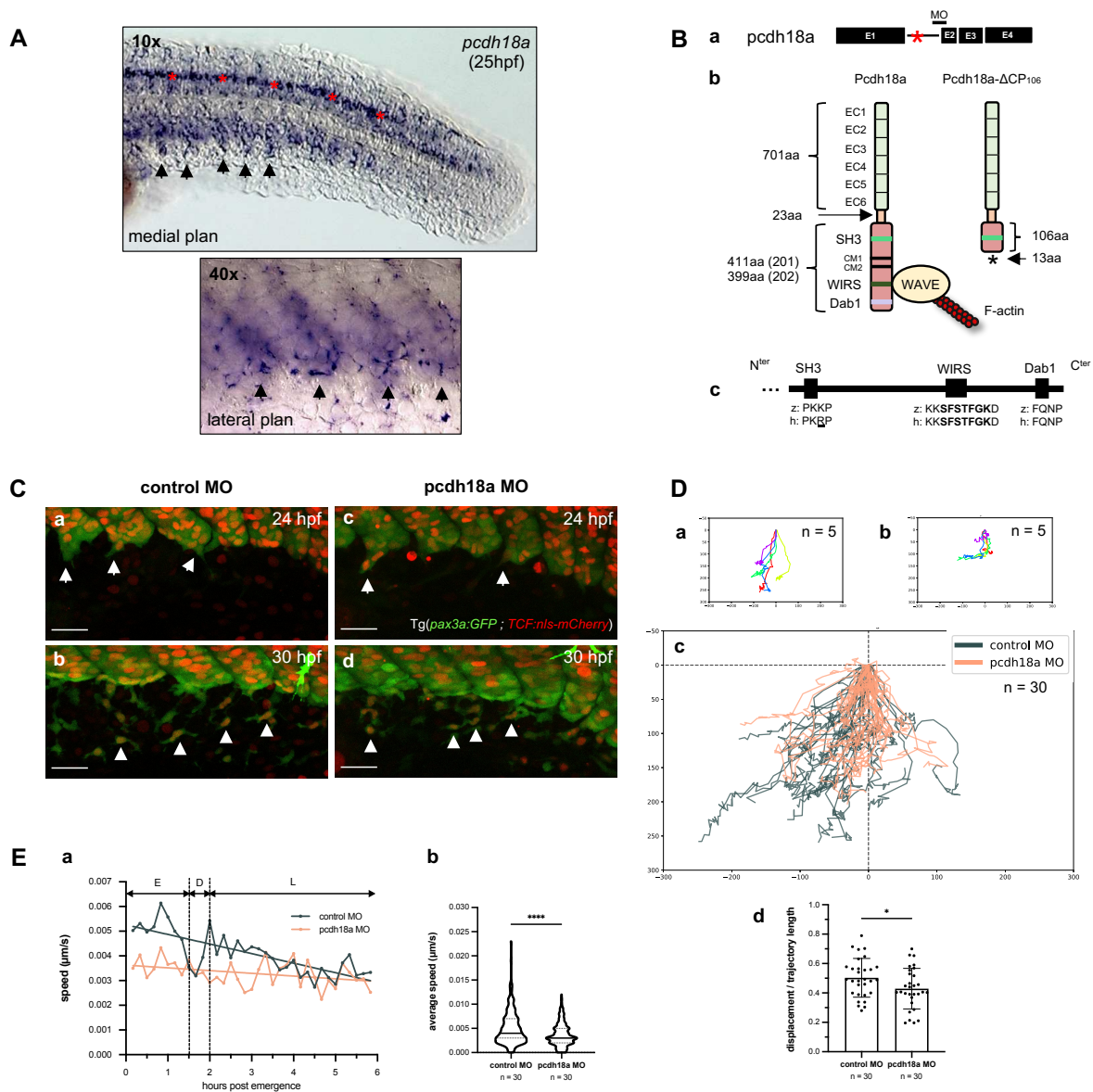


Figure 2. Pcdh18a is involved in the migration of SCPs

(A) VE-DIC microscopy of a whole-mount in situ hybridization of *pcdh18a* at 25 hpf. The ventral side of caudal somites and SCPs migrating from the clusters (arrows) are labeled by *pcdh18a* mRNA probe from the 5th somite counted from the tailbud and in the more rostral (more mature) somites. In addition to the SCP clusters, the dorsal side of the spinal cord is strongly labelled (red asterisks). (B-a) The Pcdh18a splicing-MO used in this study targets the intron1-exon2 junction of *pcdh18a*. (B-b) Injection of *pcdh18a* MO leads to the retention of the first intron and premature STOP codon in it. The resulting transcript leads to a protein truncated after the 106th amino acids of the intracellular domain (ICD) of Pcdh18a. (B-c) Alignment of SH3, WIRS and Dab1 domains located in the ICD of human PCDH18 and zebrafish Pcdh18a. (C) Time-lapse confocal acquisitions of transgenic Tg(*pax3a*:GFP; *TCF*:nls-mCherry) embryos injected with the control or *pcdh18a* MO. Confocal projections were extracted at 24 (a, c) and 30 hpf (b, d). Arrows and arrowheads indicate delaminating SCPs at 24 hpf and migrating SCPs/SCs, respectively. Scale bars, 30 μm. (D-a, b) Trajectories of 5 SCPs obtained from the time-lapse movies shown in (C). Each point was plotted every 10 minutes during 6 hours with the manual tracking plugin of FIJI for a control-MO injected embryo (a) or a *pcdh18a*-MO injected embryo (b). (D-c) Overlay of individual tracks of control and *pcdh18a* MO-injected SCPs during their migration toward the CHT. In a trajectory plot, all (x, y) coordinates of the SCPs' starting points (in the clusters) are set to

(0,0) and negative or positive values on the X axis indicate anterior or posterior migration, respectively. $n_{exp} = 3$, $n_{embryos} = 6$, $n_{tracked\ cells} = 30$ for control and *pcdh18a* morphants. **(D-d)** Trajectory straightness corresponding to the ratio of the displacement efficiency over its trajectory length. SCPs in the *Pcdh18a* morphant migrate less efficiently than those of control embryo. (Mean \pm SD; *, $P = 0.0378$; Student's t test). **(E-a)** Average speed of SCP migration over time for the 30 cells comparing control and *pcdh18a* morphants. Control SCPs show a two-phase migration pattern in terms of speed; a faster migration during the early migration period and a slower migration during the later migration period following the short pause. On the other hand, morphant SCPs migrate rather constantly over the migration period without any pause. E, early migration; D, decision phase; L, late migration. **(E-b)** Violin plot quantifying the migration speed of SCPs against *Pcdh18a* mutation during the first 90 minutes of cell migration. $n = 30$ for control and *pcdh18a* morphants, from three independent experiments. Morphant cells migrate slower than control cells during the early migration phase. (Median \pm SD; ****, $P < 0.0001$; Mann-Whitney test).

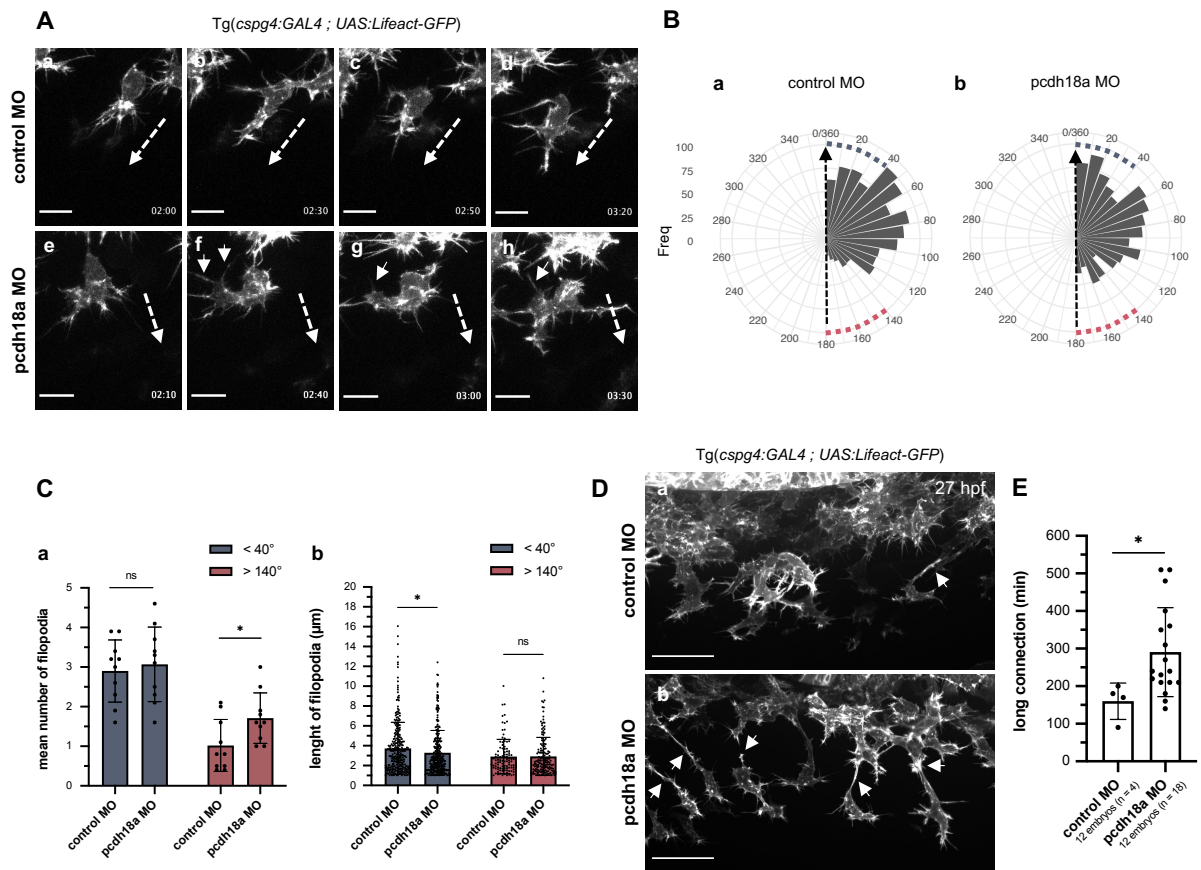


Figure 3. Pcdh18a modulates cell protrusions and connections of migrating SCPs

(A) Time-lapse confocal images of individual migrating SCPs from control and *pcdh18a* MO injected *Tg(cspg4:GAL4; UAS:lifeact-GFP)* embryos by 26 hpf. Images were extracted from movies at 20-30 minutes intervals. Time points from the initiation of SCP migration is shown in the lower right of each panel. Dashed and white arrows indicate the direction of SCP migration and filopodia extending in the opposite direction of migration, respectively. Scale bars, 10 μ m. **(B)** Quantification of the frequency of filopodia according to the direction of their projection in control **(a)** and *pcdh18a* **(b)** MO-injected embryos. In the rose diagram, 0° and 180° represent filopodia in the sense or in the opposite direction of cell migration, respectively (left and right are not distinguished). The direction of SCP migration is indicated by the black dashed arrow, and the relative angles close to the direction of the migration are defined within a sector of 0° to 40° (blue dots), while relative angles opposite to the direction of migration are defined within a sector of 140° to 180° (red dots). The linear mixed-effect model indicates that *pcdh18a* morphants have relative angles increased on average by 14.9° compared to controls ($P = 0.0041$). **(C-a)** Quantification of the mean number of filopodia in sense (< 40°, blue) or in opposite direction (> 140°, red) projected from migrating SCPs in the control or *pcdh18a* MO injected embryos. Each dot represents a biological replicate from 5 independent experiments ($n = 10$ for control and *pcdh18a* morphants). Morphant cells project more filopodia in the opposite direction of migration than control cells. (Mean \pm SD; ns, $P = 0.6666$; *, $P = 0.0284$; Student's *t* test). **(C-b)** Quantification of the length of filopodia in the sense (blue) or in the opposite (red) direction of cell migration. Each dot represents a single filopodium ($n = 392$ for control, 478 for *pcdh18a* morphants). The cut-off threshold was set to 1 μ m. Control cells tend to have longer filopodia directed in the sense of migration than morphant cells. (Mean \pm SD; ns, $P = 0.5190$; *, $P = 0.0247$; Mann-Whitney test). **(D)** Time-lapse confocal acquisitions of migrating SCPs from control and *pcdh18a* MO injected *Tg(cspg4:GAL4; UAS:lifeact-GFP)* embryos around 25-28 hpf. Images were extracted from movies at 10 minutes intervals. In

controls, neighboring cells interact by brief contact of their filopodia which do not change the direction of cell migration (arrows, a-c), while *pcdh18a* morphants tend to have longer contact between cells, which can attract and change the trajectory of the neighboring cell (arrows, d-f). Dashed arrows indicate the direction of cell migration. Scale bars, 10 μm . **(E)** Confocal spinning disk images of live transgenic *Tg(cspg4:GAL4; UAS:Lifeact-GFP)* embryos at 27 hpf. Leader cells tend to show longer connections to the follower cells (arrows) in morphants **(a)** compared to controls **(b)**. Scale bars, 30 μm . **(F)** Quantification of the duration of long (>10 μm) cell connections between leader and follower cells as shown in **a** and **b**. Analysis of 12 embryos revealed such long connections from 18 leader cells in the *pcdh18a* morphants and only 4 leader cells in control embryos. Morphant cells maintained such connections longer than control cells. (Mean \pm SD; *, $P = 0.0113$; Mann-Whitney test).

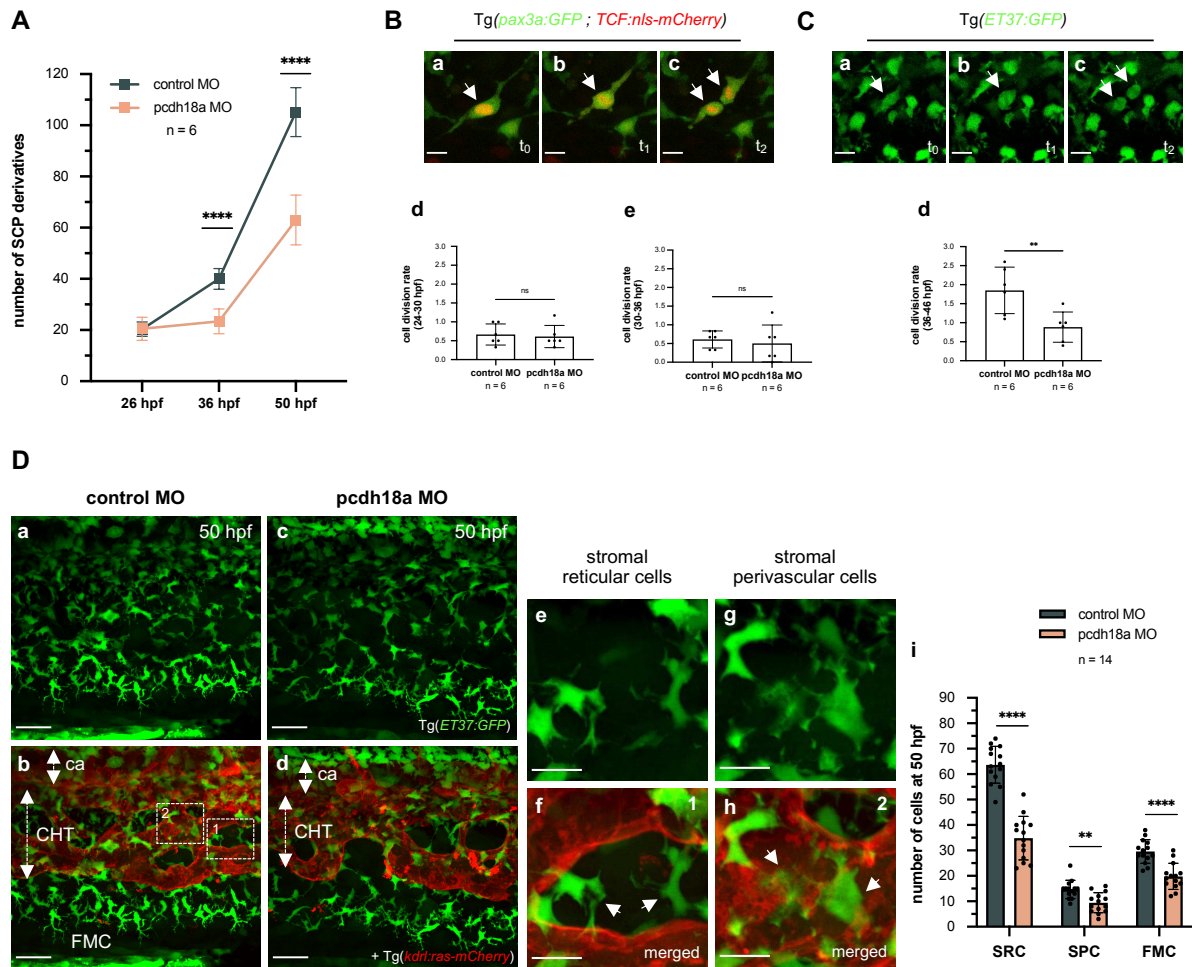


Figure 4. Pcdh18a mutation impacts on the vascular morphogenesis and the development of SCPs

(A) Counting of ET37:GFP+ SCP derivatives in the developing ventral tail over a 5 somites width at 26, 36 and 50 hpf. The plots represent biological replicates from a single experiment; $n = 6$ for control and pcdh18a morphants. Pcdh18a morphants show a nearly 2-fold reduction in SCP derivatives at 36 and 50 hpf compared with control embryos (Mean \pm SD; ****, $P < 0.0001$, Student's t test). **(B)** Counting of the number of cell divisions in Tg(*Pax3a:GFP*; *TCF:nls-mCherry*) during the period of SCP migration (24-34 hpf). **(a, b, c)** Confocal projections of wild-type SCPs undergoing mitosis (arrows, t_0 : before, t_1 : during, t_2 : after mitosis). **(d, e)** Quantification of cell divisions of SCPs in the ventral tail, counted in an area covering 5 caudal somites for 6 hours (**d**, from 24 to 30 hpf; **e**, from 30 to 36 hpf). Each dot represents the average number of cell divisions per hour. $n = 6$ for control and pcdh18a morphants from three independent experiments. (Mean \pm SD; **d**, ns, $P = 0.7467$; **e**, ns, $P = 0.6357$; Student's t test). Scale bars, 10 μ m. **(C)** Counting of cell divisions during the period of SCP settlement / maturation (36-46 hpf). **(a, b, c)** Confocal projections of wild-type Tg(*ET37:GFP*) SCPs undergoing mitosis (arrows, t_0 : before, t_1 : during, t_2 : after mitosis). **(d)** SCPs/SCs divisions were counted for 10 hours. Each dot represents the average number of cell divisions per hour. $n = 6$ for control and pcdh18a morphants from three independent experiments. (Mean \pm SD; **, $P = 0.0088$; Student's t test). Scale bars, 10 μ m. **(D)** Confocal spinning disk projections of live Tg(*ET37:GFP*; *kdr:ras-mCherry*) control or pcdh18a MO-injected embryos at 50 hpf. **(a-d)** Pcdh18a morphant embryos have less stromal cells in the CHT than controls. ca, caudal artery; CHT, caudal hematopoietic tissue; FMC, fin mesenchymal cells. Scale bars, 30 μ m. **(e-h)** Close-up on the different stromal cell types found in the CHT at 50 hpf, indicated by dashed squares numbered 1 and 2. Stromal reticular cells (SRCs) interconnect the vascular segments of

the plexus and seem to maintain its architecture (e and arrows in f), whereas stromal perivascular cells (SPvC) are spread along and around the vessels (g, and arrows in h). Scale bars, 10 μ m. **(i)** The numbers of the three types of SCP derivatives were counted in 14 embryos per condition, covering the width of 5 somites, in the CHT and the caudal fin. They were all significantly reduced in *pcdh18a* morphants compared to control embryos (Mean \pm SD; **, P = 0.0011; ****, P < 0.0001; Student's t test) - SRCs by 45 %, SPvCs by 36 %, and FMCs by 33 %.

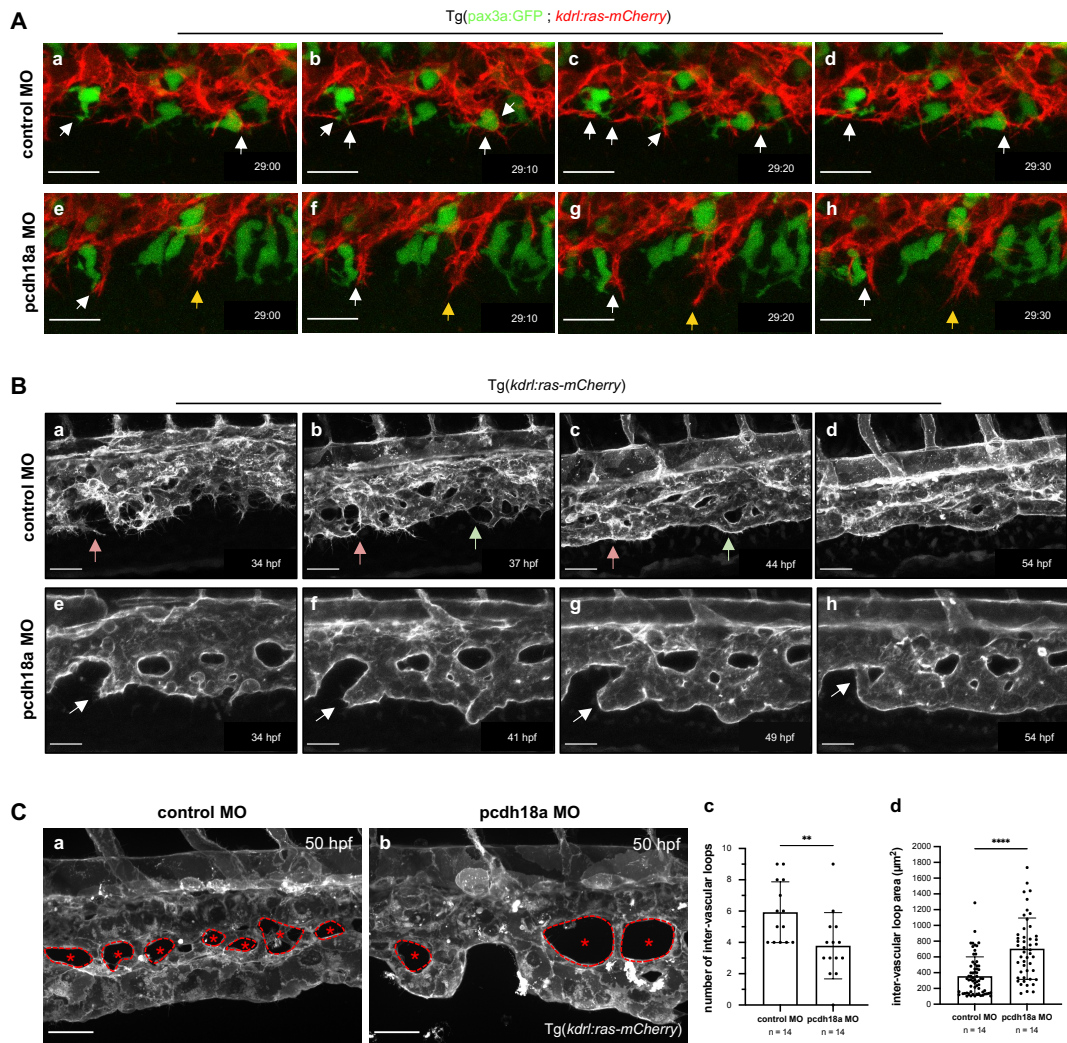


Figure 5. Pcdh18a mutation impacts on the vascular morphogenesis

(A) Time-lapse confocal acquisitions from control (**a-d**) and *pcdh18a* (**e-h**) MO-injected Tg(*pax3a:GFP*; *kdr1:ras-mCherry*) embryos. Confocal projections at the ventral part of the primordial vein during active sprouting angiogenesis and associated co-migration of stromal cells. Images were extracted from movies at intervals of 10 minutes from 29 hpf to 29.5 hpf. Dynamic interactions between stromal and endothelial cells (white arrows) were frequently observed in control embryos whereas *pcdh18a* morphant displayed less interactions and vascular endothelial cells actively migrated to the ventral side regardless of the involvement of stromal cells (orange arrows). Scale bars, 20 μm . **(B)** Time-lapse confocal images from control (**a-d**) and *pcdh18a* (**e-h**) MO-injected Tg(*kdr1:ras-mCherry*) embryos at later stages (34-54 hpf). Arrows in two different colors follow the tubulogenesis for each newly formed tube. *Pcdh18a* morphants show a less dynamic sprouting angiogenesis, with much fewer endothelial filopodia than the control. The resulting vascular plexus had large inter-vascular loops (IVLs), lacked complexity in the 3D structure, and was affected by overall morphology. Unusual tubulogenesis was frequently observed in *pcdh18a* morphants at the most ventral sites of the developing plexus where the caudal vein forms later (white arrows). Scale bars, 30 μm . **(C)** Morphological difference in the formation of IVLs. **(a, b)** Confocal spinning disk acquisitions of live transgenic Tg(*kdr1:ras-mCherry*) control or *pcdh18a* MO-injected embryos at 50 hpf. IVLs are indicated by asterisks and the border of each IVL is delineated by the dashed line. Scale bars, 30 μm . **(c)** Counting of the number of IVLs in control and *pcdh18a* morphants covering the width of 5 caudal somites. $n = 14$ embryos per condition, from 2 independent experiments. (Mean \pm SD; **, $P = 0.0066$; Mann-Whitney test). **(d)** Measurement of the surface area (μm^2) of each IVLs corresponding to the data showed in c. $n = 14$ embryos per condition, from 2 independent experiments. (Mean \pm SD; ****, $P < 0.0001$; Mann-Whitney test).

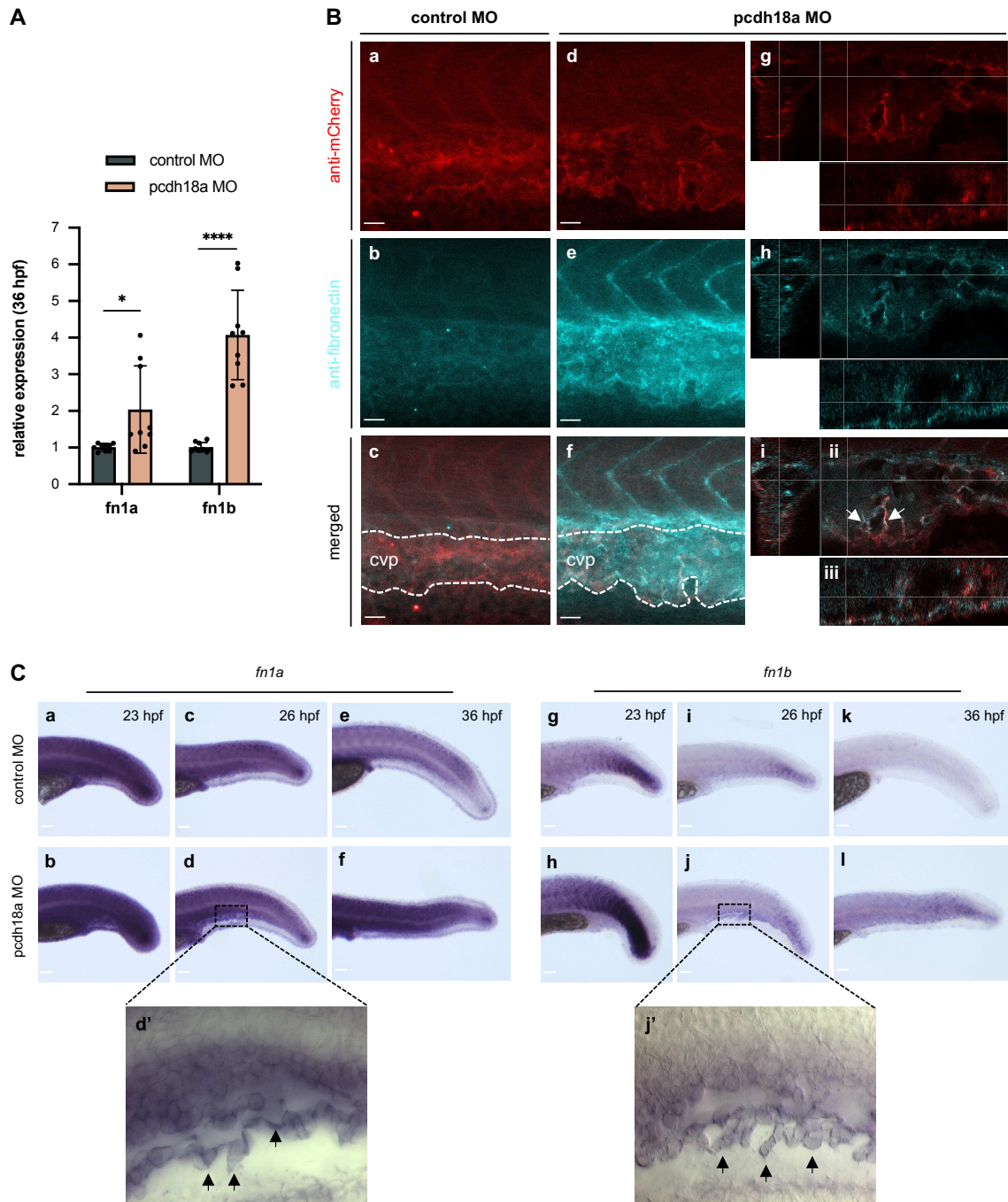


Figure 6. Fibronectin affects vascular morphogenesis

(A) qPCR analysis for fibronectin 1a and 1b (*fn1a* and *fn1b*) in control and *pcdh18a* morphants at 36 hpf ($n = 9$ for each, from 3 independent experiments). (Mean \pm SD; *, $P = 0.0202$; ****, $P < 0.0001$; Student's *t*-test). **(B)** Immunostaining of *Tg(kdr:ras-mCherry)* embryos for Fibronectin (cyan) and mCherry (red) in the caudal region at 36 hpf **(a-f)**. The confocal projections **(c, f)** are redisplayed in the transverse **(i)**, sagittal **(ii)** and frontal **(iii)** sections using Imaris software. Dashed lines delineate the border of the caudal vein plexus (cvp). Arrows indicate double-labeled cells by anti-Fibronectin and anti-mCherry antibodies. Scale bars, 20 μ m. **(C)** WISH for *fn1a* **(a)** and *fn1b* **(b)** at 24, 26 and 36 hpf in control and *pcdh18a* MO-injected embryos. Scale bars, 50 μ m. **(d', j')** Magnified images of the caudal plexus of *Pcdh18a* morphant labeled by *fn1a* and *fn1b* probes at 26 hpf. VE-DIC microscopy evidences the specific expression of *fn1a* and *fn1b* in the endothelial cells of the developing plexus. Arrows indicate sprouting endothelial cells expressing fibronectin genes.

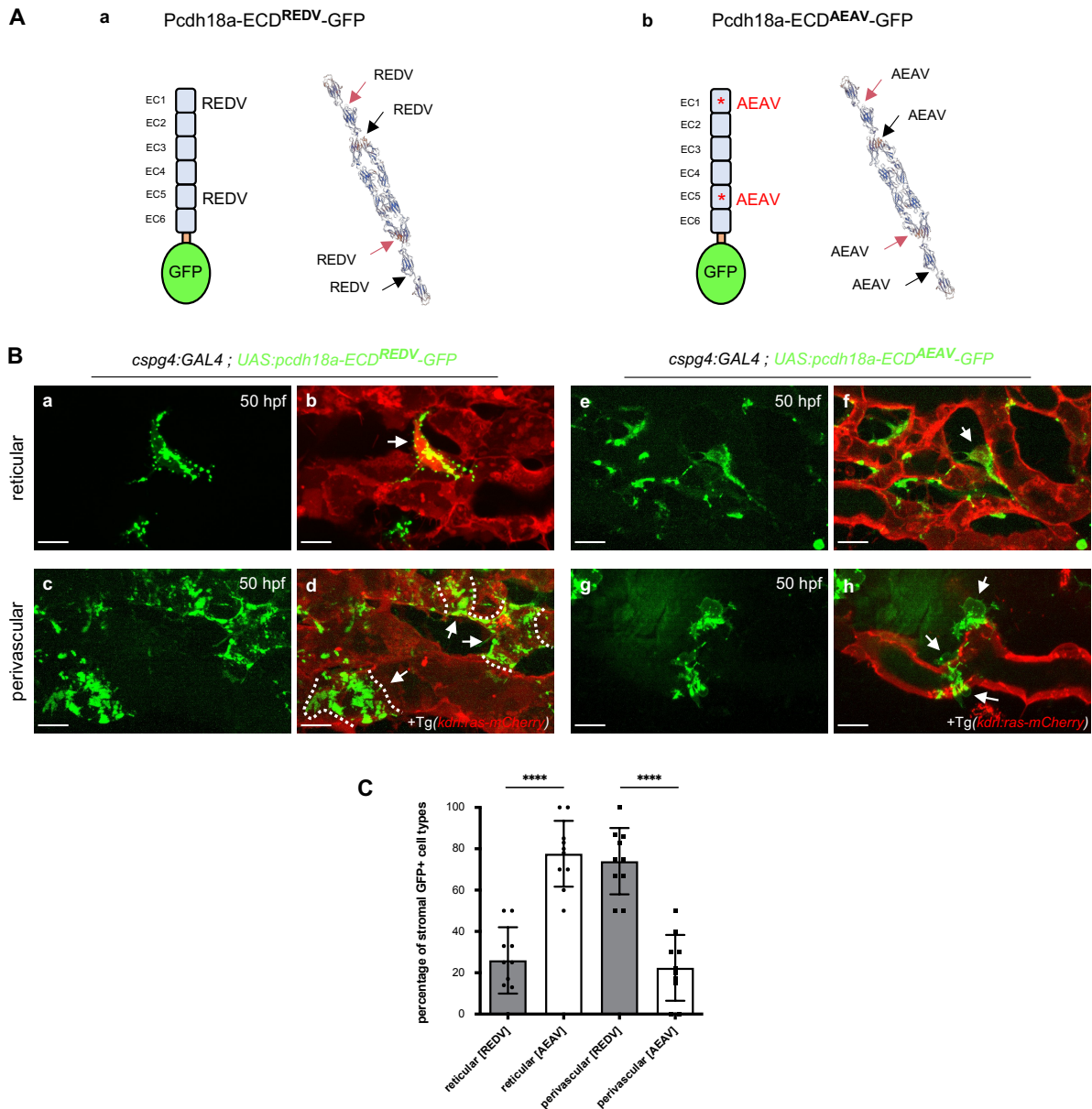
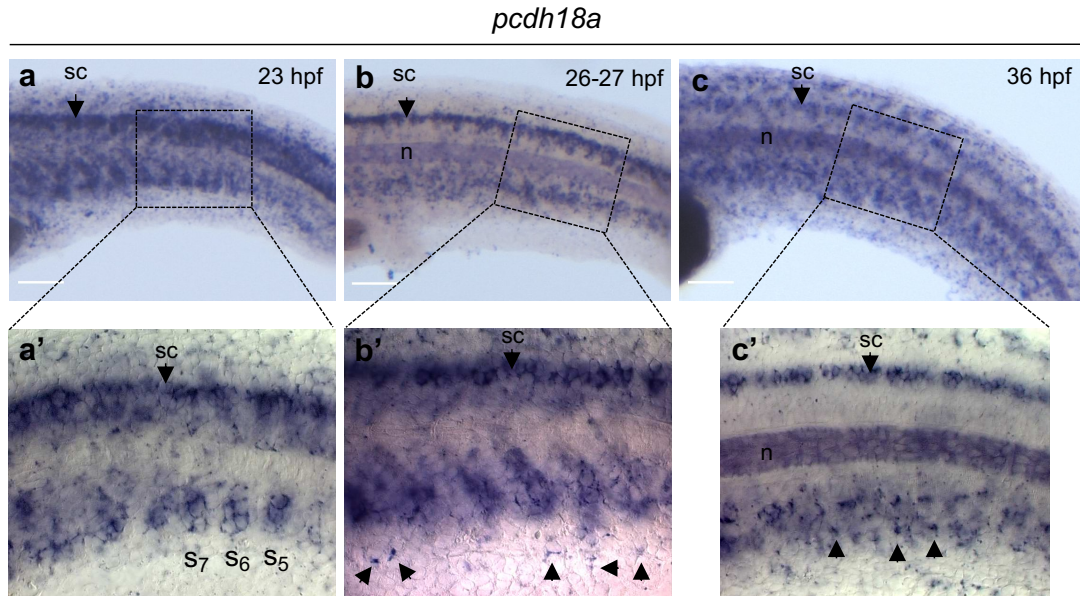


Figure 7. The extracellular domain of Pcdh18a is also involved in the interaction of stromal cells with endothelial cells

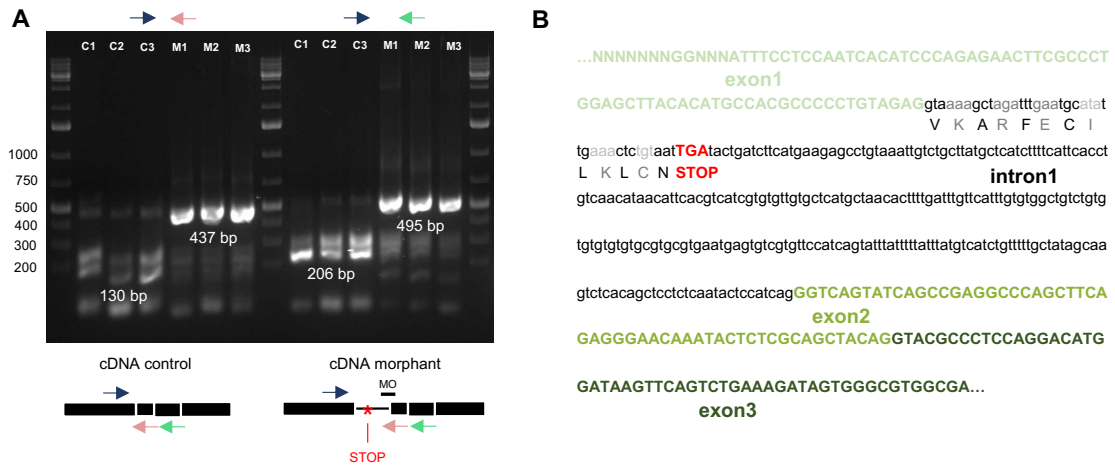
(A) Prediction of tertiary structure for wild type and mutant form of the extracellular domain of Pcdh18a using SWISS-MODEL (expasy.org). Schematic representations indicate the structure of the wild-type extracellular domain containing two REDV motifs **(a)** and the mutant form with AEAV **(b)**, substitution of R and D to A, asterisks). In both constructs, the transmembrane domain is retained, and cytoplasmic domain is replaced by GFP. Red and black arrows indicate the positions where REDV or AEAV sequence locates. **(B)** Confocal spinning disk projections of live Tg(*cspg4:GAL4; UAS:pcdh18a-ECD^{REDV} or AEAV-GFP; kdrl:ras-mCherry*) embryos in the caudal plexus at 50 hpf. **(a-d)** Pcdh18a-ECD^{REDV}-GFP-expressing reticular **(a, b)** or perivascular **(c, d)** stromal cells (green) on the vascular endothelial cells (red). GFP signals were found heterogeneously in the stromal cells (white arrows). Dashed lines indicate the border of each SPvC. **(e-h)** Pcdh18a-ECD^{AEAV}-GFP-expressing reticular **(e, f)** or perivascular **(g, h)** stromal cells (green) on the vascular endothelial cells (red). GFP signals were found heterogeneously in the stromal cells (white arrows). SPvC expressing the construct frequently show a partially swollen appearance (white arrows). Scale bars, 10 μ m. **(C)** Histogram showing the ratio

of reticular- vs. perivascular type GFP+ stromal cells observed among the *pcdh18a-ECD^{AEAV}-GFP* or *pcdh18a-ECD^{REDV}-GFP* expressing stromal cells at 50 hpf. Six embryos were analyzed (cell counting was performed by dividing the CHT into three parts to cover the width of 5 caudal somites) for *Pcdh18a-ECD^{REDV}* and for *Pcdh18a-ECD^{AEAV}* from a single experiment. (mean \pm SD; ****, $P < 0.0001$; Student's t-test for reticular vs. perivascular comparison).



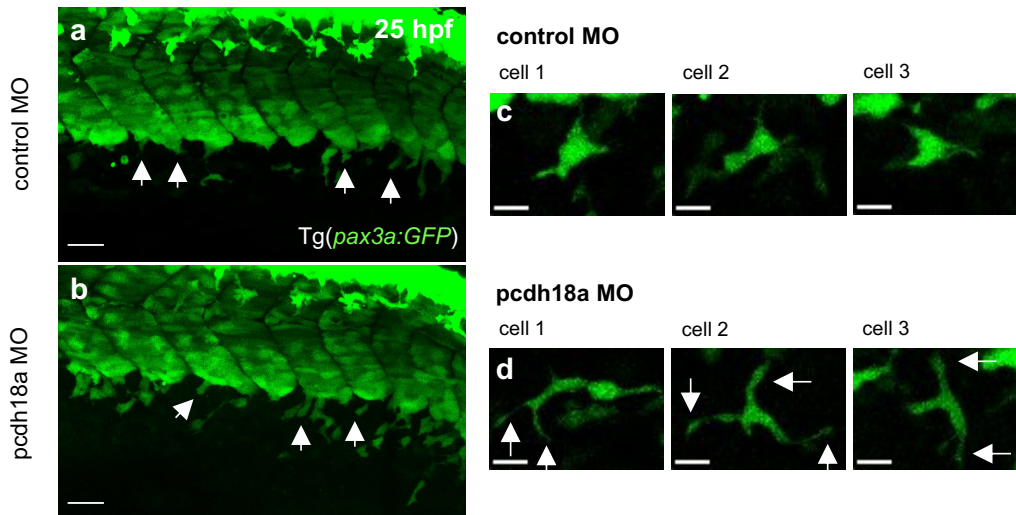
Supplemental Figure 1. Expression of *pcdh18a* during the development of SCPs

(a-c) Macroscopic acquisitions of a whole-mount in situ hybridization of *pcdh18a* during wild-type embryogenesis at 23, 26-27 and 36 hpf. sp, spinal cord; n, notochord. Scale bars, 50 μ m. **(a'-c')** Magnified images indicated by dashed squares in (a-c) using VE-DIC microscopy. **(a')** At 23 hpf, *pcdh18a* expression is firstly observed at the ventral side of the 5th somite from the tailbud (S₅), and continuously found in subsequent S₆ and older somites. **(b')** At 26 hpf, the expression of *pcdh18a* is also found in the migrating SCPs (arrows). **(c')** *pcdh18a*-positive signals persist at 36 hpf in the stromal cells located within the CHT (arrows).



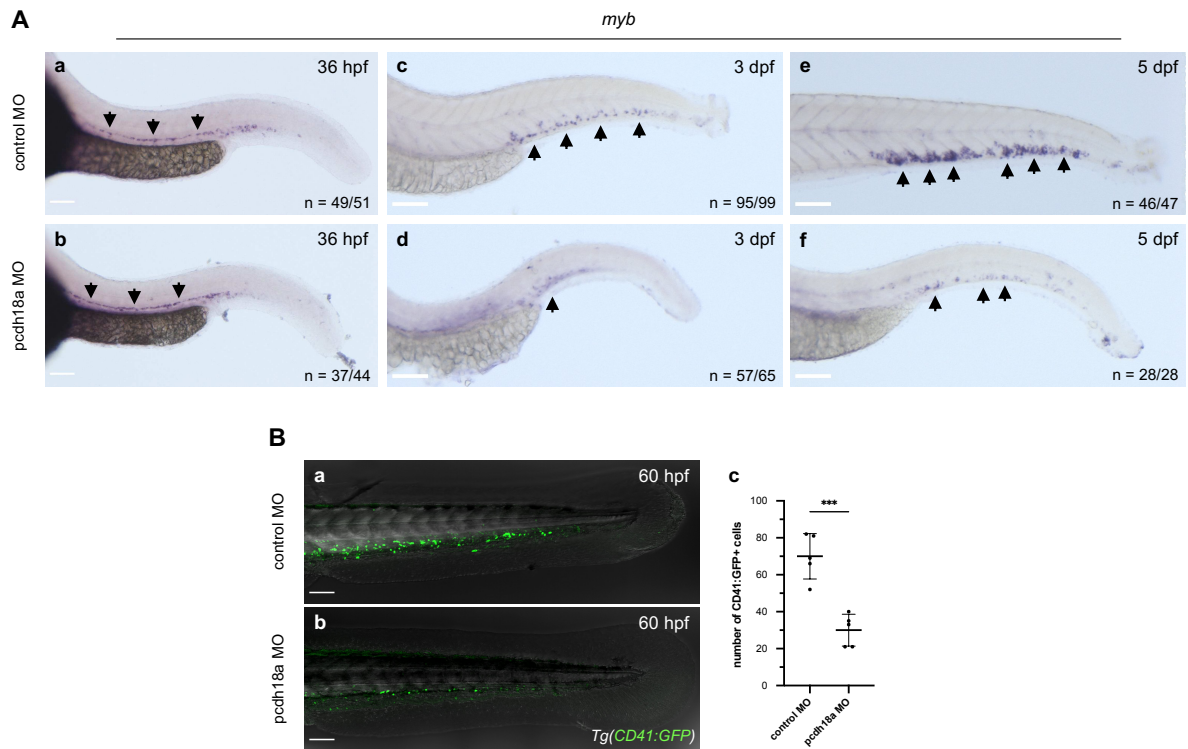
Supplemental Figure 2. Pcdh18a MO injection induces an intron 1-retained splice variant

(A) Representative agarose gel showing *pcdh18a* mRNA products in the control (C1-C3) and *pcdh18a* morphants (M1-M3) as measured by RT-PCR using primers targeting exons 1 (blue arrows), 2 (pink arrows) and 3 (green arrows) indicated in diagrams of the zebrafish *pcdh18a* gene. Injection of *pcdh18a* MO reduced the normal amplicon (130, primer set exon 1 and 2 and 206 bp, primer set exon 1 and 3) and induced a corresponding increase in a variant (437 and 495 bp) evidencing retention of the first intron of *pcdh18a*. **(B)** Extract of DNA sequence of the amplicon obtained from *pcdh18a* morphants shown in A. Retention of the first intron induces a premature STOP in the first intron, resulting in a truncation of the major part of the intracellular domain of Pcdh18a protein.



Supplemental Figure 3. Pcdh18a MO injection induces modifications in SCP morphology during mid-migration

Time-lapse confocal acquisitions of live transgenic *Tg(pax3a:GFP)* control or *pcdh18a* MO-injected embryos from 24 to 30 hpf. **(a, b)** Confocal acquisitions extracted from the time-lapse at 25 hpf. In the early stage of cell migration, no particular differences were observed in the migrating behavior of SCPs in morphants compared to controls. Arrows indicate delaminating SCPs. Scale bars, 30 μm . **(c, d)** During mid-migration (26-29 hpf), SCPs in *pcdh18a* morphants **(d)** showed a more laterally elongated and ramified morphology (arrows) than controls **(c)**. Scale bars, 10 μm .



Supplemental Figure 4. Pcdh18a MO injection alters HSPC lodgment and expansion in the CHT

(A) Macroscopic acquisitions of whole-mount in situ hybridization for *myb* expression by control or pcdh18a MO-injected embryos at different stages. Scale bars, 100 μ m. **(a-b)** At 36 hpf, both control and pcdh18a morphants showed similar *myb* signals along the dorsal aorta (arrows), meaning they can produce definitive HSPCs properly. **(c-f)** At 3 dpf, pcdh18a morphants showed a lower level of *myb* signal in their CHT than controls and the difference is even more marked at 5 dpf. Control embryos have a homogeneous distribution of *myb*⁺ cells in their CHT (c, e, arrows) whereas pcdh18a morphants present very few cells (d, f, arrows), showing that the CHT function is defective. **(B-a,b)** Confocal acquisitions of live Tg(CD41:GFP) control or pcdh18a MO-injected embryos at 60 hpf. Scale bars, 100 μ m. **(B-c)** Quantification of the number of CD41:GFP⁺ cells in the CHT of control or pcdh18a morphants at 60 hpf (n = 5 embryos per condition). Pcdh18a morphants have a strongly reduced number of HSPCs in their CHT compared to control embryos (Mean \pm SD; ***, P = 0.0003; Student's t-test).

Supplemental Movie 1. SCP migration on the primordial vein and caudal vein plexus formation

Optical transverse section reconstituted by Imaris software from a confocal time-lapse acquisition of a Tg(*Pax3a:GFP; kdrl:ras-mCherry*) embryo from 26 to 42 hpf.

Supplemental Movie 2. SCP connections and filopodia visualization during cell migration

Live confocal spinning disk acquisition reconstructed in a 3D view with Imaris software of a Tg(*cspg4:Gal4; UAS:Lifeact-GFP*) embryo at 27 hpf.

Supplemental Movie 3. Actin remodeling and filopodia orientation during SCP migration of control or pcdh18a MO-injected embryos

Time-lapse confocal acquisitions of live transgenic Tg(*cspg4:Gal4; UAS:Lifeact-GFP*) control or pcdh18a MO-injected embryos from 26 to 27.5 hpf.

Scale bars, 10 μ m.

Supplemental Movie 4. Cellular connections between SCPs during their migration in control or pcdh18a MO-injected embryos

Time-lapse confocal acquisitions of live transgenic Tg(*cspg4:Gal4; UAS:Lifeact-GFP*) control or pcdh18a MO-injected embryos starting at 27 hpf, every 10 minutes, showing the long connection phenotype in morphants compared to control embryos.

Scale bars, 10 μ m.

Supplemental Movie 5. Stromal-endothelial cell interactions during caudal vein plexus formation in control or pcdh18a MO-injected embryos

Time-lapse confocal acquisitions of live Tg(*pax3a:GFP; kdrl:ras-mCherry*) control or pcdh18a MO-injected embryos from 26 to 36 hpf.

Scale bars, 20 μ m.

Supplemental Movie 6. Endothelial cell projections and caudal vein plexus formation in control or pcdh18a MO-injected embryos

Time-lapse confocal acquisitions of live Tg(*kdrl:ras-mCherry*) control or pcdh18a MO-injected embryos from 34 to 54 hpf.

Scale bars, 30 μ m.

References

1. Gao, X., Xu, C., Asada, N. & Frenette, P. S. The hematopoietic stem cell niche: From embryo to adult. *Development (Cambridge)* vol. 145 (2018).
2. Murayama, E. *et al.* Tracing Hematopoietic Precursor Migration to Successive Hematopoietic Organs during Zebrafish Development. *Immunity* **25**, 963–975 (2006).
3. Murayama, E. *et al.* NACA deficiency reveals the crucial role of somite-derived stromal cells in haematopoietic niche formation. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
4. Scarpa, E. *et al.* Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Dev. Cell* **34**, (2015).
5. Wakayama, Y., Fukuhara, S., Ando, K., Matsuda, M. & Mochizuki, N. Cdc42 mediates Bmp - Induced sprouting angiogenesis through Fmnl3-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. *Dev. Cell* **32**, (2015).
6. Vanhalst, K., Kools, P., Staes, K., Van Roy, F. & Redies, C. δ -Protocadherins: A gene family expressed differentially in the mouse brain. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, (2005).
7. Redies, C., Vanhalst, K. & Van Roy, F. δ -Protocadherins: Unique structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 62 (2005).
8. Harrison, O. J. *et al.* Family-wide Structural and Biophysical Analysis of Binding Interactions among Non-clustered δ -Protocadherins. *Cell Rep.* **30**, (2020).
9. Tai, K., Kubota, M., Shiono, K., Tokutsu, H. & Suzuki, S. T. Adhesion properties and retinofugal expression of chicken protocadherin-19. *Brain Res.* **1344**, (2010).
10. Biswas, S., Emond, M. R. & Jontes, J. D. Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. *J. Cell Biol.* **191**, (2010).
11. Chen, X., Koh, E., Yoder, M. & Gumbiner, B. M. A protocadherin-cadherin-FLRT3 complex controls cell adhesion and morphogenesis. *PLoS One* **4**, (2009).
12. Kraft, B., Berger, C. D., Walkkamm, V., Steinbeisser, H. & Wedlich, D. Wnt-11 and Fz7 reduce cell adhesion in convergent extension by sequestration of PAPC and C-cadherin. *J. Cell Biol.* **198**, (2012).
13. Jontes, J. D. The nonclustered protocadherins. in *The Cadherin Superfamily: Key Regulators of Animal Development and Physiology* (2016). doi:10.1007/978-4-431-56033-3_9.

14. Pancho, A., Aerts, T., Mitsogiannis, M. D. & Seuntjens, E. Protocadherins at the Crossroad of Signaling Pathways. *Frontiers in Molecular Neuroscience* vol. 13 (2020).
15. Asakawa, K. & Kawakami, K. Protocadherin-Mediated Cell Repulsion Controls the Central Topography and Efferent Projections of the Abducens Nucleus. *Cell Rep.* **24**, (2018).
16. Chen, B. *et al.* The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* **156**, 195–207 (2014).
17. Homayouni, R., Rice, D. S. & Curran, T. Disabled-1 interacts with a novel developmentally regulated protocadherin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, (2001).
18. Stickney, H. L., Barresi, M. J. F. & Devoto, S. H. Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* **219**, 287–303 (2000).
19. Lee, R. T. H., Knapik, E. W., Thiery, J. P. & Carney, T. J. An exclusively mesodermal origin of fin mesenchyme demonstrates that zebrafish trunk neural crest does not generate ectomesenchyme. *Dev.* **140**, (2013).
20. Urbancic, V. *et al.* Filopodyan: An open-source pipeline for the analysis of filopodia. *J. Cell Biol.* **216**, (2017).
21. Morishita, H. & Yagi, T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 19 (2007).
22. Jones, M. C., Caswell, P. T. & Norman, J. C. Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 18 (2006).
23. Kim, S. Y., Yasuda, S., Tanaka, H., Yamagata, K. & Kim, H. Non-clustered protocadherin. *Cell Adhesion and Migration* vol. 5 (2011).
24. Xue, Y. *et al.* A 3D Atlas of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion by Multi-dimensional RNA-Seq Analysis. *Cell Rep.* **27**, (2019).
25. Hubbell, J. A., Massia, S. P., Desai, N. P. & Drumheller, P. D. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Bio/Technology* **9**, (1991).
26. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$. *J. Biol. Chem.* **267**, (1992).
27. Makarem, R. & Humphries, M. J. LDV: A novel cell adhesion motif recognized by the integrin $\alpha 4\beta 1$. in *Biochemical Society Transactions* vol. 19 (1991).
28. Wolf, K. *et al.* Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* **160**, (2003).

29. Wu, J. shun *et al.* Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology* vol. 14 (2021).
30. Clark, A. G. & Vignjevic, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 36 (2015).
31. Seger, C. *et al.* Analysis of Pax7 expressing myogenic cells in zebrafish muscle development, injury, and models of disease. *Dev. Dyn.* **240**, (2011).
32. Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V. & Emelyanov, A. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev. Dyn.* **231**, (2004).
33. Chi, N. C. *et al.* Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation. *Genes Dev.* **22**, (2008).
34. Helker, C. S. M. *et al.* The zebrafish common cardinal veins develop by a novel mechanism: Lumen ensheathment. *Dev.* (2013) doi:10.1242/dev.091876.
35. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, (1995).
36. Suster, M. L., Abe, G., Schouw, A. & Kawakami, K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat. Protoc.* (2011) doi:10.1038/nprot.2011.416.
37. Thisse, C. & Thisse, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, (2008).

Résumé

Les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CSPH) émergent à partir de l'aorte dorsale chez l'embryon de poisson zèbre, comme chez d'autres vertébrés. Elles entrent dans la circulation sanguine puis s'installent dans leur première niche, le tissu hématopoïétique caudal (THC), comparable en cela au foie fœtal des mammifères, où elles se multiplient et se différencient. Notre laboratoire a identifié les cellules stromales réticulaires (CSR) et le plexus veineux caudal comme les composants clés de la niche. La partie ventrale des somites caudaux donne naissance aux progéniteurs des cellules stromales, qui migrent ventralement avec les cellules endothéliales, pour constituer une niche hématopoïétique fonctionnelle. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus sont encore peu connus.

Les travaux de thèse présentés ici démontrent que la protocadhérine-18a (Pcdh18a), exprimée par les progéniteurs des cellules stromales, joue un rôle important dans leur migration, puis dans la formation de la niche hématopoïétique. La migration des cellules stromales, exprimant une Pcdh18a dont une majeure partie du domaine cytoplasmique est manquante (Pcdh18a- Δ CP₁₀₆), est compromise. Normalement, les projections des filopodes sont concentrées vers l'avant de la cellule, tandis que leur genèse est aléatoire chez les cellules exprimant Pcdh18a- Δ CP₁₀₆. De plus, les connexions cellulaires lors de leur migration semi-collective sont plus durables lorsque Pcdh18a est mutée. Ces résultats suggèrent que le domaine cytoplasmique de Pcdh18a est essentiel à la régulation de l'actine-F et qu'il est impliqué dans la médiation de la répulsion cellulaire.

Ensuite, les cellules stromales changent de partenaires de liaison et interagissent étroitement avec les cellules endothéliales qui vont former le plexus veineux. L'analyse *in vivo* a démontré que Pcdh18a est impliquée dans l'interaction physique des cellules stromales avec ces cellules endothéliales. L'expression de Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ par les cellules stromales altère le comportement des cellules endothéliales et la morphogenèse du plexus veineux, et conduit à une niche hématopoïétique non fonctionnelle. L'expression de la fibronectine 1b est fortement augmentée dans cette région chez les embryons Pcdh18a- Δ CP₁₀₆, et cela contribue probablement à la morphogenèse anormale du plexus veineux. Enfin, nous avons découvert qu'un motif à quatre acides aminés REDV, présent dans la région extracellulaire de Pcdh18a, est requis pour la fixation physique des cellules stromales sur les vaisseaux et leur différenciation en cellules stromales périvasculaires (CSP). Ces résultats contribuent à élucider des questions fondamentales concernant l'interaction entre les cellules stromales et les cellules endothéliales dans la construction d'une niche fonctionnelle pour les cellules souches hématopoïétiques.

Mots clés : Danio zébré, protocadhérine-18a, migration cellulaire, niche hématopoïétique, cellules stromales, plexus veineux caudal.

Abstract

Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) emerge from the ventral floor of the dorsal aorta in zebrafish embryos, as in other vertebrates. HSPCs then settle in their first niche, the caudal hematopoietic tissue (CHT), where they expand and undergo multilineage differentiation. Our lab previously identified somite-derived stromal reticular cells (SRCs) and the caudal venous plexus as the key components of the CHT niche. The ventral side of caudal somites give rise to stromal cell progenitors which migrate ventralwards together with endothelial cells to build a functional hematopoietic niche. However, little is known about the molecular mechanisms involved in these processes.

This work demonstrates that protocadherin-18a (Pcdh18a) is expressed by the stromal cell progenitors and plays important roles in their migration and subsequent hematopoietic niche formation. Migration of stromal cells, expressing a Pcdh18a that lacks a major part of the cytoplasmic domain (Pcdh18a- Δ CP₁₀₆), was compromised. This phenotype was linked to the fact that the projection of filopodia is usually concentrated in the leading edge, whereas it occurs randomly in stromal cells expressing Pcdh18a- Δ CP₁₀₆. In addition, during their semi-collective migration, stromal cells expressing Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ retained the connections among each other for a longer time compared to the control group. These results suggest that the cytoplasmic domain of Pcdh18a is essential for F-actin regulation and is also involved in cell-contact-mediated repulsion.

Subsequently, stromal cells switch binding partners to endothelial cells that will form the venous plexus. *In vivo* analysis demonstrated that Pcdh18a is involved in the physical interaction of stromal cells with endothelial cells. The expression of Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ in stromal cells induces severe defects in the venous plexus. The expression of fibronectin 1b is strongly increased in the Pcdh18a- Δ CP₁₀₆ embryos in this region, and this is likely one of the factors causing the abnormal morphogenesis of the venous plexus. Finally, we found that a four-amino-acid motif REDV, present in the extracellular region of Pcdh18a, appears required for the physical attachment of stromal cells on the vessels, and their differentiation in stromal perivascular cells (SPCs). These results contribute to the elucidation of fundamental questions regarding the interaction between hematopoietic stromal cells and endothelial cells, the two main components in the formation of a functional hematopoietic stem cell niche.

Keywords: zebrafish, protocadherin-18a, cell migration, hematopoietic niche, stromal cells, caudal vein plexus.