



HAL
open science

Identification de nouveaux gènes essentiels à la mise en place de la latéralité chez le poisson-zèbre

Thomas Juan

► **To cite this version:**

Thomas Juan. Identification de nouveaux gènes essentiels à la mise en place de la latéralité chez le poisson-zèbre. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4116 . tel-04021266

HAL Id: tel-04021266

<https://theses.hal.science/tel-04021266v1>

Submitted on 9 Mar 2023

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.

École doctorale 85 Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la Vie
et de la Santé - Mention interactions moléculaires et cellulaires
De L'Université Côte d'Azur

par

Thomas Juan

Identification de nouveaux gènes essentiels à la mise en place de la latéralité chez le poisson-zèbre

Dirigée par Dr. Maximilian Fürthauer

Soutenue le 13 Décembre 2017

Devant le jury composé de :

Mr Blader Patrick (Dr.).....	Rapporteur
Mr Delaunay Franck (Prof.)	Président du jury
Mme Durand Bénédicte (Prof.)	Rapporteur
Mr Fürthauer Maximilian (Dr.).....	Directeur de thèse

Remerciements

C'est tout d'abord à mon directeur de thèse, Max Fürthauer, que vont mes sincères remerciements. Il a su me transmettre le goût de la recherche et une certaine abnégation pour aborder mon travail, et m'a appris tout ce que je sais sur le modèle du poisson-zèbre, avec lequel j'espère continuer. Comme toutes les thèses, ces 4 années ont été émaillées de moments difficiles, avec des abandons de projets, de nombreuses remises en question. Mais Max m'a permis de retomber sur mes jambes au terme de ce chemin, et je l'en suis reconnaissant. J'ai eu l'opportunité de participer et de présenter mon travail au cours de nombreuses conférences, et Max m'a également fait confiance pour essayer de nombreuses choses, et donner libre cours à ma curiosité.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté d'évaluer mon travail : Pr. Franck Delaunay, Pr. Bénédicte Durand et Dr. Patrick Blader.

Mon arrivée au laboratoire a de peu coïncidé avec le départ de Morgane, qui a cependant été d'une grande aide à mes débuts, et dont j'ai repris les projets. Je pense aussi à tous les stagiaires, qui ont directement travaillé avec moi au cours de ma thèse, et qui ont amené beaucoup de vie à l'équipe: Elisa, Alycia, Bénédicte, Adrien, Eva, Cécile, Charlotte, Emma et Loïc. Mais aussi à Marie-Alix, Sophie et sa petite Jade, Renaud et ses petits Maïa et Emilio pour leur bonne humeur et leur professionnalisme dans le management de l'équipe et de l'animalerie.

Je souhaite bon courage pour la suite à Vishnu, qui j'en suis sûr saura trouver une belle façon de terminer sa thèse. J'espère que de nouveaux postdocs ou thésards arriveront bientôt pour lui donner le courage de veiller ses embryons mindbomb.

Gros remerciement et pensée pour tous les membres passé et présent du 7^{ème} étage du bâtiment science nat' sans qui cette thèse aurait été bien terne: Bruno, Alexander, Micha, Fabien, Nuria, Nathalie, Pouneh, Clothilde, Paul, Anne, Stéphanie, Céline, Emilie, Bénédicte, Loli, Aline...; Mais aussi tous les chefs : Thomas, Christian et Thierry.

Je tiens à remercier tous mes amis de promotion, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures dispositions, et de décompresser après les journées difficiles : Salsa et Almahdi à l'étage, mais aussi Elodie, Floriane, Zoheir, Laura et Hélène.

Je pense à mes laboratoires de master, avec mes encadrants Véronique et Michael, qui m'ont conforté dans mon choix de continuer en thèse. Mais également au campus des sciences Valrose, que je quitterai bientôt après 9 ans et demi de bons et loyaux services, et tous les professeurs que j'ai pu rencontrer au cours de ces années.

Je remercie la région PACA, et le programme Signalife pour mes financements de thèse, mais aussi l'équipe du Dr. Stéphane Noselli, nos collaborateurs pour le projet Myo1D

En dehors de la vie universitaire, je tiens à remercier mes amis de recherche de fossile, de plongée et autres sorties en mer, entre bien d'autres choses, Flynn, Maxime et Rémy. Mais aussi tous les Callasiens et amis d'enfance.

Finalement, je termine par la famille avec ma femme Priyanka et mes parents, qui me soutiennent en toutes circonstances, et pour lesquels je suis infiniment reconnaissant. L'année 2017 restera pour moi à marquer d'une pierre blanche, avec mon mariage, et ma soutenance de thèse, et tout cela, c'est grâce à vous.

Merci à tous !

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS -----	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX -----	5
I- INTRODUCTION -----	7
<i>I-1- La souris, modèle vertébré historique d'étude de la latéralité</i> -----	10
I-1-a- Cils et reconnaissance de l'importance du flux dans la latéralité -----	10
I-1-b- Mise en place de la chiralité du flux et signalisation PCP-----	12
I-1-c- Transduction du signal transporté par le flux en information latéralisée-----	14
I-1-d- Propagation et amplification de l'information de latéralité-----	16
<i>I-2- Développement de l'asymétrie droite/gauche chez le poisson-zèbre</i> -----	18
I-2-a- Différentiation des progéniteurs de l'organisateur droite/gauche -----	18
I-2-b- Migration et compaction du groupe de cellules précurseurs dorsales -----	19
I-2-c- Expansion de la lumière de la vésicule de Kupffer-----	21
I-2-d- Ciliogenèse de la vésicule de Kupffer-----	22
I-2-e- Mise en place du flux directionnel dans l'organisateur droite/gauche -----	23
I-2-f- Transmission de l'information du flux vers le mésoderme latéral -----	25
I-2-g- Propagation de l'information de latéralité à travers le mésoderme-----	27
I-2-h- Organogenèse latéralisée -----	28
I-2-i- Convergence des mécanismes de mise en place de l'asymétrie droite/gauche -----	32
<i>I-3- ESCRT et exovésicules dans l'asymétrie droite/gauche</i> -----	33
I-3-a- Assemblage d'ESCRT et fonctions cellulaires contrôlées par la machinerie-----	34
I-3-b- Exovésicules et dynamique de transport de matériel dans le milieu extérieur-----	36
I-3-c- ESCRT et biogenèse de vésicules exosomales -----	38
I-3-d- Rôle d'ESCRT dans le bourgeonnement d'ectosomes -----	42
I-3-e- Autres modes de sécrétions contrôlés par ESCRT-----	43
I-3-f- Communication intercellulaire, exovésicules et machinerie ESCRT -----	44
I-3-g- NVP et transport d'exovésicules dans le nœud de la souris -----	48
I-3-h- Transport de vésicules dans la vésicule de Kupffer -----	49
<i>I-4- Diversité des mécanismes d'établissement de la latéralité</i> -----	51
I-4-a- Etablissement de la latéralité chez les vertébrés -----	51
I-4-b- Etablissement de la latéralité chez les deutérostomes non-vertébrés -----	53
I-4-c- Etablissement de la latéralité chez les protostomes -----	53
<i>I-5- Développement de l'asymétrie droite/gauche chez la drosophile et rôle de l'actomyosine</i> -56	
I-5-a- Structure et mode d'action de Myo1D dans la latéralité -----	56
I-5-b- Contrôle de l'activité de <i>myo1D</i> au cours du développement -----	58
I-5-c- Myo1D et signalisation PCP -----	60
I-5-d- Actomyosine et chiralité des tissus -----	61
I-5-e- Chiralité à l'échelle cellulaire -----	62
I-5-f- Génération d'une chiralité à l'échelle moléculaire dans le cytosquelette d'actine -----	63
I-5-g- Génération d'une chiralité à une plus grande échelle -----	64
I-5-h- De la chiralité moléculaire à l'établissement de l'asymétrie D/G chez les vertébrés -----	65

II- RESULTATS ----- 66

II-1- Projet 1 : Etude du rôle d'ESCRT et de la dynamique de transport de vésicules dans la latéralité ----- 66

- II-1-a- Des vésicules Chmp1b-positives sont présentes dans la lumière de la vésicule de Kupffer -67
- II-1-b- Des protéines ESCRT sont requises pour la latéralité d'organes asymétriques -----68
- II-1-c- ESCRT est requis pour l'activité de l'organisateur droite/gauche -----71
- II-1-d- La perte de protéines ESCRT ne perturbe pas la motilité des cils et le flux de la KV -----74
- II-1-e- La perte de Vps4b diminue le nombre de vésicules Chmp1b-positives dans la KV -----76
- II-1-f- Des vésicules extracellulaires sont transportées de façon asymétrique dans la KV -----77
- II-1-g- Simulation du transport de vésicules dans l'organisateur droite/gauche -----79
- II-1-h- La dynamique du flux de la KV permet le transport asymétrique de matériel extracellulaire -81

II-2- Projet 2 : Myo1D est un déterminant essentiel à la latéralité conservé au cours de l'évolution. ----- 83

- II-2-a- Article soumis -----84

III- DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----106

III-1- Projet 1 : Etude du rôle d'ESCRT et de la dynamique de transport de vésicules dans la latéralité ----- 106

- III-1-a- ESCRT et asymétrie droite/gauche chez le poisson-zèbre ----- 106
- III-1-b- Flux de la vésicule de Kupffer et transport asymétrique de matériel extracellulaire ----- 111
- III-1-c- Conclusion ----- 114

III-2- Projet 2 : Myo1D est un déterminant essentiel à la latéralité conservé au cours de l'évolution. ----- 115

- III-2-a- Myo1D et latéralité chez le poisson-zèbre. ----- 115
- III-2-b- Interaction entre Myo1D et PCP dans l'activité de l'organisateur droite/gauche ----- 117
- III-2-c- Conclusion. ----- 120

IV- CONCLUSION GENERALE -----121

BIBLIOGRAPHIE -----122

ANNEXE 1 : REVUE « LE COMPLEXE ESCRT :DU TRANSPORT ENDOSOMAL AU DEVELOPPEMENT D'ORGANISMES MULTIVELLULAIRES » -----141

ANNEXE 2 : REVUE « BIOGENESIS AND FUNCTION OF ESCRT-DEPENDENT EXTRACELLULAR VESICLES» -----156

Liste des abréviations

A/P : Antéro/Postérieur
Abd-B : Abdominal-B
Acb1 : Acyl coA binding protein1
Aei : After eight
Alix : ALG-2 interacting protein X
Arf6 : ADP ribosylation factors 6
ARRDC1: ARRestin Domain-Containing protein 1
ATG : AuTophagy-related protein 12
Azi1: 5-Azacytidine-induced protein 1
BMP : Bone Morphogenetic Protein
CaMK-II : Ca²⁺/CaM-dependant protein Kinase II
Cer12 : Cerberus-like 2
Cftr : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Chmp : Charged multivesicular body protein
CMH : Centre Majeur d'Histocompatibilité
CUPS : Compartment for Unconventional Protein Secretion
Cyk-1: Cytokinesis defect-1
D/G : Droite/Gauche
D/V : Dorso/Ventral
Dand5 : DAN domain family member 5
DFC : Dorsal Forerunner Cells
Dgo : Diego
Dpcd : Deleted In Primary Ciliary Dyskinesia Homolog
Ds : Dachshund
Dvl : Dishevelled
Dvr1: Decapentaplegic and Vg-related-1 protein
Eph : Ephrin
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EVL : Enveloping Layer
FGF : Fibroblast Growth Factor
Fj : Four-jointed
Foxj1 : Forkhead box protein J1
Frz : Frizzled
Ft : Fat
Gag : Group-specific antigen
GFP : Green Fluorescent Protein
Gpa-16 : Guanine nucleotide-binding protein alpha-16 subunit
GRP : Gastrocoel Rool Plate
Hand2 : Heart and neural crest derivatives expressed 2
HD-PTP : Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23
Her12 : Hairy-related12
Hh : Hedgehog
Hox : Homeobox
Hrs : Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan
IFT : IntraFlagellar Transport

IL-1 β : Interleukine-1 β
ILV : Intra-Luminal Vesicle
ISG15 : Interferon-Stimulated Gene15
Iv : Inversin
Kif3 : Kinesin-like protein 3
KV : Kupffer's vesicle
Lgl2 : Lethal giant larvae 2
LPM : Lateral Plate Mesoderm
LRO : Left-Right Organizer
Lrrc50 : Leucine-rich repeat-containing protein 50
MVE : Multivesicular endosome
Myh9a : Myosin, heavy chain 9a, non-muscle
Myo1D : Myosine 1D
MZ : Maternal-Zygotique
Nedd4 : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
NEM : Noninvoluting Endocytic Marginal
NICD : Notch IntraCellular Domain
NMJ : NeuroMuscular Junction
Noto : Notochord Homeobox
NVP : Nodal Vesicular Parcels
OSE : Overlapping Surface Ectoderm
PCP : Polarité cellulaire Planaire
PDZ : PSD95/Dlg/ZO-1
PE : PhosphatidylEthanolamine
Pitx2 : Paired-like homeodomain 2
Pk : Prickle
Pkd : Polycystic kidney disease
PLD2 : PhosphoLipase D2
PNP : Posterior Notochordal Plate
Prrx1a : Paired related homeobox 1a
RA : Retinoic Acid
Rfx : Regulatory factor X
Shh : Sonic hedgehog
SIMPLE : Small Integral Membrane Protein of the lysosome/Late Endosome
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
Sox : SRY-Box
Spaw : Southspaw
STAM : Signal-Transducing Adaptor Molecule
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TH1 : Tail Homology 1
Tsg101 : Tumor susceptibility 101
UAS-Gal4 : Upstream Activating Sequence-Gal4
Ugdh : UDP-glucose dehydrogenase
UTR : UnTranslated Region
Vangl : VanGogh-like
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vps4 : Vacuolar protein-associated sorting4
Wg : Wingless

Liste des figures et tableaux

Introduction

- Figure 1** : Cibles directes et indirectes des facteurs de transcription ciliaire.
- Figure 2** : Structure du nœud chez la souris.
- Figure 3** : Hypothèses sur la nature de l'information latéralisée du nœud.
- Figure 4** : Propagation de l'information de latéralité à travers l'embryon de souris.
- Figure 5** : Formation des DFC et de la KV au cours du développement.
- Figure 6** : Vésicule de Kupffer et modèles de cassure de symétrie.
- Figure 7** : Organogenèse latéralisée du cerveau, du cœur et des viscères.
- Figure 8** : Mécanismes de déformation des membranes par le complexe ESCRT au cours de la biogenèse endosomale.
- Figure 9** : Fonctions cellulaires du complexe ESCRT.
- Figure 10** : Biogenèse de vésicules extracellulaires de façon dépendante d'ESCRT.
- Figure 11** : La machinerie ESCRT promeut la sécrétion exovésiculaires d'Hedgehog.
- Figure 12** : Mise en place de l'asymétrie D/G chez d'autres modèles vertébrés.
- Figure 13** : Mise en place de l'asymétrie D/G chez les protostomes.
- Figure 14** : La perte de fonction de *myo1D* chez la Drosophile entraîne une inversion de la latéralité.
- Figure 15** : Résumé des interactions moléculaires et génétiques prenant place dans les cellules de l'organisateur D/G.
- Figure 16** : Modèle récapitulatif de l'interaction entre Myo1D et Dachshaus dans l'organisateur D/G H1.
- Figure 17** : Structures chirales et torsion en culture de cellules de mammifères.
- Figure 18** : Génération de torsion par le cytosquelette d'actine.
- Figure 19** : Interaction *in vitro* entre filament d'actine et myosine.

Tableau 1 : Composition, fonctions et interactions des sous-complexes de la machinerie ESCRT.

Résultats projet 1 : Etude du rôle d'ESCRT et de la dynamique de transport de vésicules dans la latéralité

- Figure 20** : Chmp1b est présent dans la lumière de la KV sur des vésicules.
- Figure 21** : Vps4a/b et Chmp1a sont importants pour la latéralité du cœur.
- Figure 22** : La perte de *vps4b* entraîne des défauts de latéralité des viscères.
- Figure 23** : Les pertes de Vps4b et Chmp1a entraînent des défauts de latéralité de *spaw* dans le LPM.
- Figure 24** : Les pertes de *vps4b* et *chmp1a* entraînent des défauts de latéralité de *dand5* dans la KV.
- Figure 25** : Vps4b est spécifiquement requis dans la KV.
- Figure 26** : La présence des cils motiles n'est pas perturbée par les pertes de *vps4b* et *chmp1a*.
- Figure 27** : Le flux de la KV n'est pas perturbé par les pertes de *vps4b* et *chmp1a*.
- Figure 28** : La perte de *vps4* entraîne une diminution du nombre de vésicules Chmp1b dans la KV.
- Figure 29** : Les vésicules endogènes de la KV se distribuent et présentent des vitesses latéralisées.
- Figure 30** : Une simulation informatique établit une corrélation entre vitesse angulaire observée et distribution latéralisée.
- Figure 31** : Des billes fluorescentes présentent les mêmes profils de distribution et de vitesse que les vésicules endogènes

Résultats projet 2: Myo1D est un déterminant essentiel à la latéralité conservé au cours de l'évolution – Article soumis

Figure 1: *myo1D* controls zebrafish Left/right asymmetry.

Figure 2: *myo1D* is required for Left/Right Organizer function.

Figure 3: *myo1D* controls Left/Right Organizer flow.

Figure 4: *myo1D* interacts with *vangl2* to control KV function.

Figure S1: Genetic inactivation of zebrafish *myo1D*.

Figure S2: Zebrafish *myo1D* controls Left/Right asymmetry in the brain, heart and viscera.

Figure S3: Zebrafish *myo1D* is not required for the specification and migration of Left/Right organizer precursor cells.

Figure S4: Zebrafish *myo1D* is dispensable for ciliary motility.

Figure S5: The velocity of the zebrafish Left/Right Organizer flow increases upon pharmacological reduction of organ size.

Figure S6: Zebrafish *myo1D* and *vangl2* have opposite effects on cilia orientation in the Left/Right Organizer.

I- Introduction

Chez les bilatériens, malgré une apparente symétrie axiale Droite/Gauche (D/G) de part et d'autre de la ligne médiane du corps, les organismes se différencient selon un plan de symétrie D/G. Cela comprend le positionnement latéralisé d'organes comme le cœur, le foie ou les intestins, la morphogenèse asymétrique d'organes bilatéraux comme les poumons ou le cerveau, mais également la direction de l'enroulement d'organes tubulaires. Les événements déterminants à l'acquisition d'une asymétrie D/G se produisent au cours du développement embryonnaire, et sont régulés par la coordination de molécules de signalisation partiellement conservées au cours de l'évolution qui seront pour partie le sujet de cette thèse.

Notre fascination pour la latéralité et ses conséquences médicales remonte au 18^{ème} siècle, avec la description originelle de la dextrocardie, qui a été la première malformation congénitale du cœur à être reconnue (Baillie 1788). Chez l'homme, les défauts d'asymétrie D/G à la naissance incluent les situs inversus (inversion complète de l'axe D/G), les hétérotaxies (défaut de concordance dans la latéralité des organes internes), et les isomérismes (symétrie de l'axe D/G, qui conduit à des duplications ou des pertes d'organes). La plupart des conditions invalidantes que sont l'hétérotaxie et l'isomérisme ne sont pas prises en charge par des traitements médicaux, et la durée de vie des patients est limitée par rapport à des individus avec un situs solitus (symétrie normale). Des études cliniques ont conduit à l'estimation que de 1/5000 à 1/10000 d'humains seraient concernés. De plus, des asymétries discrètes ont été mises à jour et représentent un enjeu biomédical comme les infections d'organes bilatéraux dans le cas des reins (Schreuder 2011), l'incidence de la polydactylie d'un membre (Schnall and Smith 1974) ou les défauts de fentes palatines (Paulozzi and Lary 1999), mais également la localisation de cancers des seins, des ovaires, des poumons ou des testicules (Wilting and Hagedorn 2011). Les raisons de ces malformations, qui touchent dans certains cas à la mise en place fondamentale du plan D/G du corps sont longtemps restées une énigme pour les médecins. Ce n'est qu'au début du siècle dernier, avec l'avènement des modèles animaux et les progrès effectués dans la compréhension des mécanismes de l'hérédité que les premières avancées notables ont été faites. Les défauts d'asymétrie D/G sont en effets discrets du point de vue d'un observateur externe, par le fait que chez l'écrasante majorité des phylums, seuls les organes internes soient latéralisés. Ainsi, des défauts des axes Antéro-Postérieurs (A/P) ou Dorso-Ventraux (D/V) ont des conséquences plus dramatiques et évidentes que celles du plan D/G, et ont donc été décrits plus précocement.

La première mutation ayant des conséquences sur le plan d'organisation du corps a ainsi été isolée sur une espèce de petit escargot aquatique *Lymnaea peregra* (Boycott and Diver 1923). Les escargots présentent en effet la particularité chez les bilatériens d'exposer un marqueur de latéralité visible de l'extérieur du corps, la direction de l'enroulement de leur coquille. Des spécimens présentant un enroulement inversé apparaissant spontanément dans la population.

Ces découvertes précoces, et un travail significatif de description génétique des différents aspects de l'asymétrie D/G, a ensuite conduit à la première évidence moléculaire d'initiation d'une morphogenèse latéralisée. Il s'agit de l'expression asymétrique du gène *nodal* chez un vertébré, le poulet (Levin et al. 1995).

Il y a en général un accord sur le fait que l'établissement de l'asymétrie D/G requière 3 phases majeures (Levin and Palmer 2007). Dans un premier temps, la symétrie bilatérale est brisée de telle sorte que le plan D/G soit orienté relativement par rapport aux axes A/P et D/V. Dans un deuxième temps, les différences au niveau du D/G produites dans la première étape sont traduites en l'expression spatiale de gènes de façon latéralisée du côté gauche ou droit du corps par rapport à la ligne médiane. Finalement, l'expression asymétrique de gènes entraîne des changements de comportement des cellules, comme des migrations (Lenhart et al. 2013), ce qui résulte en une position et une morphogenèse asymétrique de certains organes. L'étape initiale de l'asymétrie D/G, appelée aussi la cassure de symétrie, est la plus débattue à l'heure actuelle. Un modèle ayant précédé les grandes découvertes récentes de biologie moléculaire concernant l'asymétrie D/G continue cependant à offrir une vision intéressante de la cassure de symétrie. Il propose qu'un embryon symétrique doive initier la distinction entre la gauche et la droite par un processus nommé la conversion au cours duquel une chiralité moléculaire est convertie en une chiralité cellulaire (Brown and Wolpert 1990). Ainsi, il y a consensus dans le domaine à propos d'une origine biophysique de l'asymétrie, en amont de cascades transcriptionnelles latéralisées. Cependant, des débats ont encore lieu à propos de deux interrogations majeures : (1) Quel est l'élément chiral qui permet de casser la symétrie et quels sont les mécanismes qui régulent son intervention au cours l'embryogénèse. (2) A quel point ces mécanismes sont conservés chez les différents phylums.

J'ai utilisé au cours de ma thèse le poisson-zèbre pour étudier ces points et participer à l'identification de nouvelles molécules importantes pour la mise en place de la latéralité. Je différencie ainsi dans ce manuscrit deux projets indépendants, que je traite séparément dans deux parties distinctes. J'introduirai donc dans un premier temps les mécanismes connus de mise en place de l'asymétrie D/G chez deux organismes vertébrés majeurs, la souris et le poisson-zèbre. Après avoir mis en perspectives les problématiques associées au flux de l'organisateur chez ces modèles, je m'intéresserai à l'implication d'une machinerie cellulaire,

le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) dans les premiers évènements asymétriques. Comment des exovésicules, transportées par le flux, dont la synthèse apparait comme étant régulée par ESCRT, jouent un rôle dans le transfert d'une information de latéralité.

Dans un deuxième temps, je résumerai la façon dont les mécanismes d'établissement de la latéralité peuvent être conservés au cours de l'évolution. Quels sont les consensus, et les questions en suspens sur la mise en place de l'asymétrie D/G chez les bilatériens. Je traiterai de la conservation des mécanismes de mise en place de l'asymétrie D/G au cours de l'évolution en analysant le phénotype associé à la perte du gène *myo1D*, connu comme régulant la latéralité d'organes asymétriques chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*.

I-1- La souris, modèle vertébré historique d'étude de la latéralité

Le modèle historique et aujourd'hui prédominant dans l'étude de l'asymétrie D/G chez les vertébrés propose que le mouvement de cils chez l'embryon en neurulation (segmentation pour le poisson-zèbre) entraîne la production d'un flux chiral de liquide dans un organe transitoire spécialisé, connu sous le terme de nœud pour la souris, GRP (Gastrocoel Rool Plate) pour le xénope, PNP (Posterior Notochordal Plate) pour le lapin ou KV (Kupffer's Vesicle) pour le poisson-zèbre et le médaka. Ce modèle ayant été le mieux décrit chez la souris, il me servira de base à sa description dans un premier temps. Puis je traiterai dans un deuxième temps avec plus de détails mon modèle d'étude, le poisson-zèbre.

I-1-a- Cils et reconnaissance de l'importance du flux dans la latéralité

Le nœud est une structure embryonnaire transitoire qui apparaît sur la face ventrale de l'embryon de souris à l'extrémité de la notochorde en développement. Il se présente sous la forme d'une cavité ouverte tapissée d'une monocouche de cellules épithéliales monociliées (Sulik et al. 1994).

Les cils sont un type particulier de projections cellulaires. Ils se composent d'un squelette de microtubules, l'axonème, qui est une extension du corps basal, une structure dérivant du centriole mère. Le corps basal ancre les cils à la surface apicale des cellules. Les axonèmes sont typiquement composés de 9 doublets de microtubules positionnés de façon radiale, avec ou non une paire centrale de singulets de microtubules. L'axonème est formé à partir du corps basal par l'intervention de protéines motrices, kinésines et dynéines. L'importance de produire et maintenir des cils fonctionnels au cours du développement et chez l'adulte est illustrée par un large panel de pathologies humaines liées à des défauts ciliaires, les ciliopathies (Hildebrandt, Benzing, and Katsanis 2011). Traditionnellement, les cils sont classifiés selon qu'ils soient motiles ou immotiles, avec les facteurs de transcription Rfx contrôlant la synthèse et la maintenance de ces deux types, et une autre voie impliquant le facteur de transcription Foxj1 spécialisée dans l'assemblage des cils motiles (Choksi et al. 2014) (Figure 1).

Dans le nœud, la formation des cils est sous le contrôle d'un facteur de transcription à homéobox, Noto (Notochord Homeobox) (Beckers et al. 2007). Noto active Foxj1, qui en retour active Rfx3 afin d'initier la ciliogenèse du nœud. Les cils mettent en mouvement le liquide extra-cellulaire présent dans la région, initiant l'établissement d'un courant de la droite vers la gauche essentiel à la cassure de symétrie (Figure 2). Quand les cils du nœud sont absents, les souris présentent une asymétrie D/G anormale, avec une latéralisation aléatoire. C'est le cas notamment des souris mutantes pour les sous-unités *kif3A* ou *kif3B* du

complexe kinesin-II, un moteur de microtubule essentiel à la ciliogenèse et la maintenance des cils (Nonaka et al. 1998, Takeda et al. 1999). Cependant, ce n'est pas seulement la présence des cils qui est importante, mais également leur motilité. En effet, chez le mutant de souris *inversus viscerum (iv/lrd)*, qui code pour un moteur dynéine, les cils sont présents mais immotiles, et les individus présentent ensuite les mêmes phénotypes que les mutants *kif3A/B* (Supp et al. 1997, McGrath et al. 2003).

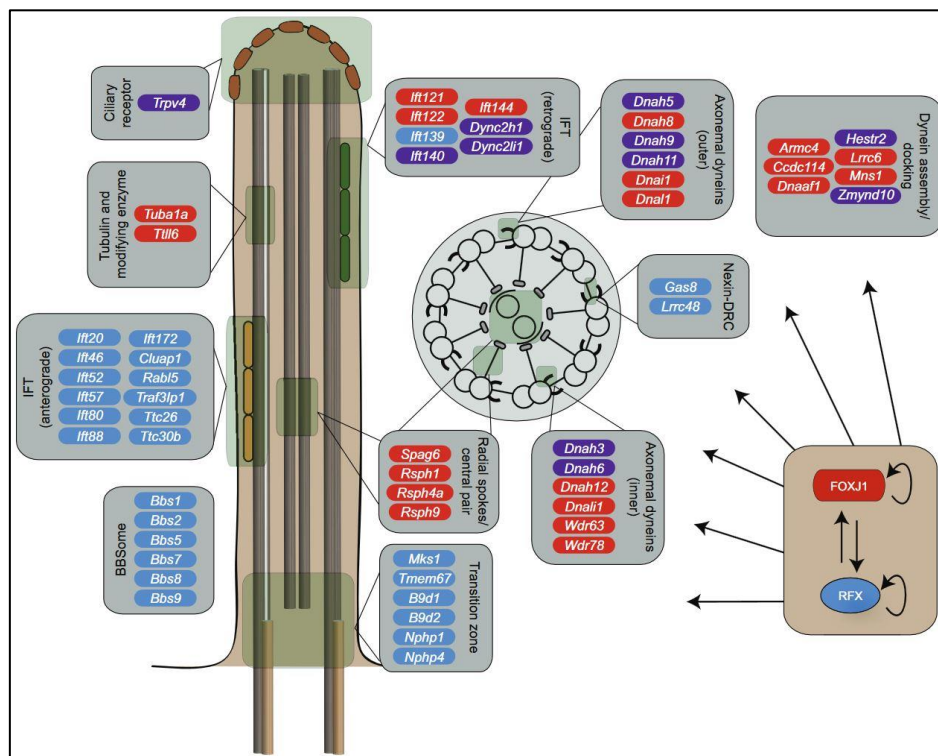


Figure 1 : Cibles directes et indirectes des facteurs de transcription ciliaire. Les gènes cibles des facteurs de transcription FOXJ1 et RFX ont été collectés chez la *Drosophile*, le *C.Elegans* et d'autres vertébrés. Les gènes sont organisés selon leur association/fonction par rapport à certaines structures ciliaires. Les gènes en bleu sont des cibles des facteurs de transcription RFX, tandis que les gènes en rouge sont les cibles de Foxj1. Les gènes en violet sont les cibles des deux facteurs. Les cibles listées ont été montrées comme régulées chez au moins un organisme modèle (Choksi et al. 2014).

L'importance des cils au cours de la latéralisation est suspectée depuis longtemps, avec des liens précoces décelés entre défauts d'asymétrie D/G et sinusites chroniques (Kartagener and Horlacher 1936), mais leur rôle dans la production d'un flux, que l'on nomme chez la souris flux nodal, n'a été décrite que récemment (Nonaka et al. 1998). Une perturbation du flux par des moyens génétiques, pharmacologiques ou expérimentaux en accroissant la viscosité du milieu entraîne toujours des défauts de latéralité (Nonaka et al. 1998). A l'inverse, lorsqu'un courant artificiel est appliqué au niveau du nœud chez des embryons présentant des défauts de cils, les phénotypes de latéralité peuvent être sauvés (Nonaka et al. 2002). La direction du flux semble donc être de façon intrinsèque le régulateur de

l'établissement de l'asymétrie D/G chez la souris. En ce sens, il a été montré chez des souris sauvages que la superposition d'un flux artificiel vers la droite au flux normal entraîne une inversion de l'axe, ce qui démontre l'importance de la directionnalité du flux dans ce processus (Nonaka et al. 2002).

Le nœud de la souris se compose de 200 à 300 cils motiles présentant un mouvement rotatoire horaire (Okada et al. 2005). Cependant, un très petit nombre de cils est suffisant pour la bonne mise en place de la latéralité. Cette observation a été faite à la suite de travaux sur les phénotypes de mutants souris *rfx3* et *dpcd*, qui présentent des défauts d'asymétrie D/G avec une pénétrance incomplète (Bonnafe et al. 2004, Kobayashi et al. 2002). Ces défauts non pleinement pénétrants sont dus à la perte de motilité des cils du nœud avec toutefois quelques cils motiles persistants. Il a été montré dans ce cas qu'au moins 2 cils motiles étaient nécessaires pour réaliser une brisure de symétrie des gènes de latéralité précoce (Shinohara et al. 2012). Cela soulève des interrogations sur le niveau de sensibilité, et la façon dont les cellules du nœud répondent au flux, s'il existe des niveaux seuil de vitesse du flux généré par les cils, ou un nombre de cils minimum à la sensation du flux. Si un flux directionnel extrêmement faible est capable d'induire une asymétrie D/G correcte, existe-t-il des mécanismes d'amplification du signal du nœud afin de la rendre plus robuste ? Un des éléments de réponse semble résider dans la voie de signalisation en aval du flux dont je discuterai plus en détail dans les parties suivantes. Par un mécanisme d'inhibition latérale et d'auto activation, la paire Nodal/Lefty pourrait transformer un signal asymétrique faible en latéralité marquée (Nakamura et al. 2006).

I-1-b- Mise en place de la chiralité du flux et signalisation PCP

La mise en place d'un flux directionnel dans le nœud semble être cruciale pour briser la symétrie D/G. Outre le battement des cils eux-mêmes, rotationnel et donc chiral (Hilfinger and Julicher 2008), la direction du flux semble être l'évènement chiral le plus précoce au cours du développement de la souris. Quels sont les évènements nécessaires à la mise en place de sa chiralité ?

La rotation des cils autour de leur axe (de la base à la pointe), qui se produit de façon horaire, devrait produire un vortex sans directionnalité claire, et pas un flux laminaire comme c'est observé *in vivo*. La façon dont la rotation des cils peut produire un flux laminaire vers la gauche est apportée en deux temps. Premièrement, il apparaît que la surface apicale des cellules du nœud forme une cavité embryonnaire convexe, qui semble jouer un rôle dans ce processus. Dans un deuxième temps, le corps basal, qui ancre le cil à la cellule, est positionné de façon asymétrique le long de l'axe A/P (Okada et al. 2005, Nonaka et al. 2005) (Figure 2). Ces deux facteurs entraînent la mise en place d'une inclinaison postérieure des

cils, et un mouvement de flux vers le côté gauche. Le positionnement postérieur des cils à la surface des cellules du nœud est rendu aléatoire suite à la perte de fonction de gènes de polarité cellulaire planaire cœur (PCP) comme *dishevelled (dvl)* ou *vanGogh-like (vangl)*.

La polarité planaire se réfère de manière générale à l'alignement coordonné de cellules dans un plan. Ce processus est gouverné par deux voies de signalisation majeures. La première est le module de polarité globale comprenant les protéines cadherines atypiques Fat (Ft) et Dachous (Ds) et la kinase du Golgi Four-Jointed (Fj) (Sharma and McNeill 2013, Simon et al. 2010, Thomas and Strutt 2012, Yang, Axelrod, and Simon 2002). La deuxième voie est la polarité planaire cœur, qui inclut les protéines Frizzled (Frz), Dishevelled (Dvl), Diego (Dgo), Vangl/Strabismus, Prickle (Pk) et Flamingo (Vinson and Adler 1987, Krasnow, Wong, and Adler 1995, Tree, Ma, and Axelrod 2002, Wolff and Rubin 1998, Bastock, Strutt, and Strutt 2003).

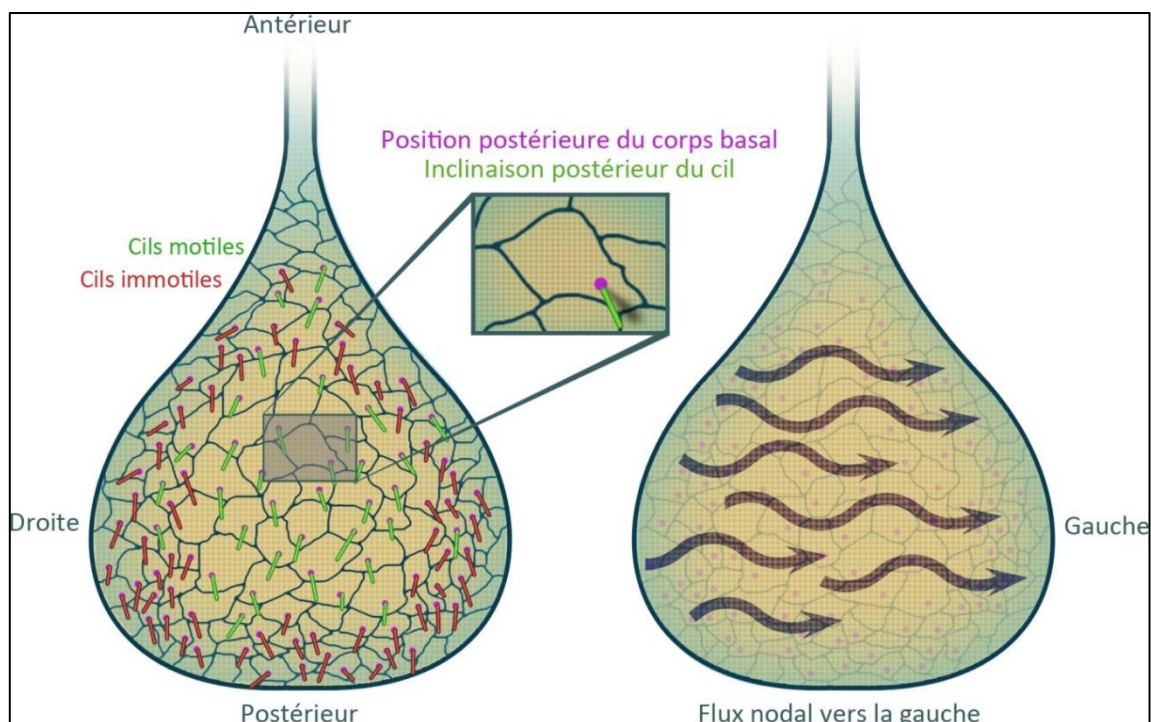


Figure 2 : Structure du nœud chez la souris. Schéma du nœud chez la souris à 3 somites. Le nœud présente une forme concave, et est tapissé de cellules monociliées. Les cils motiles se trouvent dans la partie centrale du nœud, tandis que la couronne périnodale contenant des cils immotiles senseurs se trouve en périphérie. Les cils sont inclinés vers le postérieur, et leur corps basal se trouve également dans les parties postérieures des cellules. Ces caractéristiques permettent un déplacement de flux latéralisé vers la gauche du nœud, et l'induction d'une morphogenèse latéralisée.

Ces voies ont tout d'abord été identifiées chez la drosophile comme régulant l'orientation des ommatidies et les soies des ailes (Goodrich and Strutt 2011)). Une des caractéristiques clés de la polarisation planaire est la distribution asymétrique de complexes transmembranaires dans des compartiments cellulaires distincts. Cette asymétrie des tissus entraîne ensuite

l'orientation de structures cellulaires, et le changement de certains comportements des cellules à travers le remodelage du cytosquelette et des adhésions cellulaires.

Grâce à la signalisation PCP, toutes les cellules du nœud ont le corps basal des cils localisé à l'extrémité postérieure de leur domaine apical, et participent ainsi à la génération d'un flux nodal bien coordonné (Antic et al. 2010, Hashimoto and Hamada 2010, Minegishi et al. 2017)). Le positionnement des corps basaux des cils dépend aussi du remodelage du cytosquelette d'actine, comme le montre la coopération mise en évidence entre la protéine PCP Vangl2 et la protéine de déstabilisation de l'actine Cofilin1 (Mahaffey et al. 2013). Chez le double mutant souris pour ces deux gènes, qui ne présentent pas de défauts D/G seuls, les corps basaux échouent à migrer postérieurement et restent localisés au centre, ce qui conduit à des défauts d'asymétrie D/G (Mahaffey et al. 2013). Ces données établissent un lien entre l'organisation du cytosquelette, la signalisation PCP et la génération d'une asymétrie A/P essentielle à la génération du flux nodal chez la souris.

I-1-c- Transduction du signal transporté par le flux en information latéralisée

Il apparaît maintenant clair que deux populations de cils sont abritées par le nœud. Des cils motiles largement décrits précédemment, sont situés dans la partie centrale du nœud, et des cils immotiles dans la partie périphérique, que l'on nomme la couronne périnodale. A ce jour, deux modèles non mutuellement exclusifs sont en débat, l'un chimique et l'autre mécanique (Okada et al. 2005, Norris and Grimes 2012) sur la façon dont le nœud traduirait l'information contenue dans le flux. Le premier suppose qu'un gradient de morphogène s'établirait grâce au flux nodal et serait ressenti par les cellules de la couronne périnodale. Des vésicules membranaires appelées Nodal Vesicular Parcels (NVP) produites par les cellules du nœud de façon dépendante de la voie FGF, pourraient transporter ces morphogènes (Figure 3). Les NVP ont en effet été identifiées comme transportant le morphogène Sonic Hedgehog (Shh) et l'acide rétinoïque (RA) (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005). L'hypothèse de l'intervention des NVP dans la mise en place de la latéralité nécessite cependant davantage d'évidences expérimentales pour être adoptée. La deuxième hypothèse, mécanique, suppose que le signal porté par le flux nodal serait la force de cisaillement ressentie par les cils senseurs des cellules de la couronne périnodale (McGrath et al. 2003). Sans permettre de retenir l'une ou l'autre des deux hypothèses, il a également été montré que la perception du flux nodal requière le complexe de canal calcique codé par les gènes *pkd2* et *pkd11/1* (Field et al. 2011, Pennekamp et al. 2002) (Figure 3). De façon intéressante, ce complexe semble être requis spécifiquement dans les cellules de la couronne périnodale pour le D/G. Une expérience de transgénèse a montré que dans les souris mutantes pour *pkd2* qui présentent des défauts D/G, lorsque *pkd2* est réintroduit seulement dans les cellules de la

couronne périnodale, une restauration de l'asymétrie D/G peut être observée (Kamura et al. 2011). De la même façon, dans des embryons avec une expression normale de *pkd2*, pour lesquels les cils motiles au centre du nœud sont absents et les cils de la couronne périnodale présents, les embryons sont capables de répondre à un flux artificiel, et la latéralité est restaurée (Takeda et al. 1999). Cela suggère que le complexe Pkd2/111 pourrait être responsable de la détection du flux nodal du côté gauche du nœud (Field et al. 2011, Pennekamp et al. 2002, Kamura et al. 2011, Grimes et al. 2016)). Un travail d'épistasie récent visant à établir une hiérarchie d'action entre les différents acteurs précoces en aval du flux nodal a montré que *pkd111* était un régulateur négatif de *pkd2*, qui est lui-même en amont de *cerl2*, le transcrit latéralisé le plus précoce, et Nodal (Grimes et al. 2016). De plus des travaux en cultures de cellules ont montré que *pkd111* était responsable de l'initiation d'une réponse calcique suite à une stimulation par un flux artificiel.

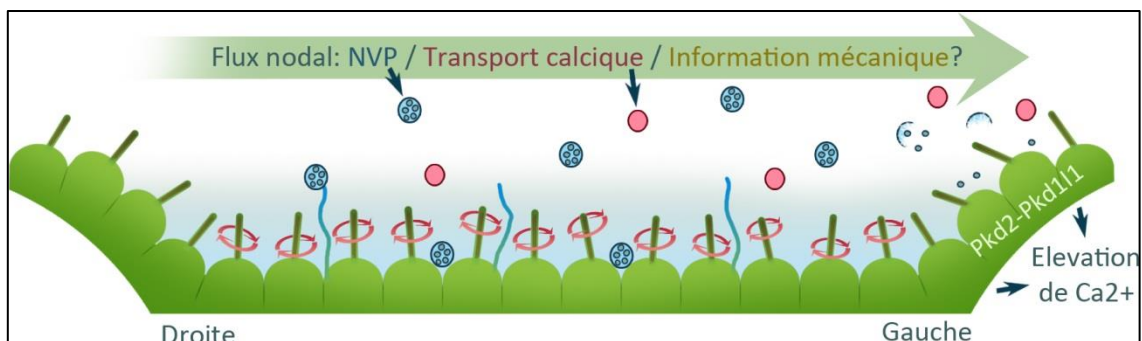


Figure 3 : Hypothèses sur la nature de l'information latéralisée du nœud. Les cils du nœud et leur position dans l'espace conduisent à un transport de liquide vers la gauche de l'embryon. Plusieurs hypothèses sont en cours pour expliquer la morphogenèse latéralisée observée suite la mise en place du flux. La première est le transport de NVP, des vésicules relarguées dans l'espace extracellulaire au niveau de filopodes et transportées du côté droit. Ces NVP se fragmentent et sont absorbées ensuite du côté gauche. La deuxième est le transport de calcium, qui serait ensuite ressenti par le système Pkd2-Pkd111 au niveau de la couronne périnodale préférentiellement du côté gauche. La dernière est la contrainte de cisaillement appliquée aux cils par le flux, qui serait particulièrement ressenti sur la gauche de l'embryon.

Toutes ces observations semblent cohérentes avec l'hypothèse mécanique, qui stipule que la force du flux entraînerait des influx calciques localisés par le biais du système Pkd2/111. Néanmoins cette hypothèse est questionnée par l'observation récente en culture de cellules du nœud que la stimulation mécanique des cils immotiles n'entraînait pas l'accumulation de calcium dans les cils. Grâce à l'utilisation d'une lignée de souris reportrice de l'activité calcique, il n'a été montré aucune élévation des niveaux de Ca^{2+} à la suite de stimulation avec des flux physiologiques, ou même supraphysiologique. Cette observation reste vraie pour des cellules issues d'autres tissus supposés présenter des cils répondant à un signal mécanique comme des cellules épithéliales de rein, ou des cellules ciliées de l'oreille interne (Delling et al. 2016). Si les cils du nœud répondent à un signal mécanique venant du flux, il

ne semble donc pas que cela se produise via un signal calcique. Les deux hypothèses chimiques et mécaniques de sensation du flux restent donc ouvertes, et il faut le souligner, non-mutuellement exclusives.

Alternativement, il a été montré que la glycoprotéine Wnt9b sécrétée pouvait induire l'activation des canaux Pkd et un influx calcique en culture de cellule. L'influx calcique facilité par Pkd pourrait ainsi s'effectuer par l'intermédiaire d'un ligand sécrété (Kim et al. 2016). Cette observation, mise en perspective du système du nœud, pourrait rapprocher les influx calcique d'un transport de ligand Wnt dans le flux nodal, et apporter des arguments au modèle chimique de transport d'information latéralisé.

I-1-d- Propagation et amplification de l'information de latéralité

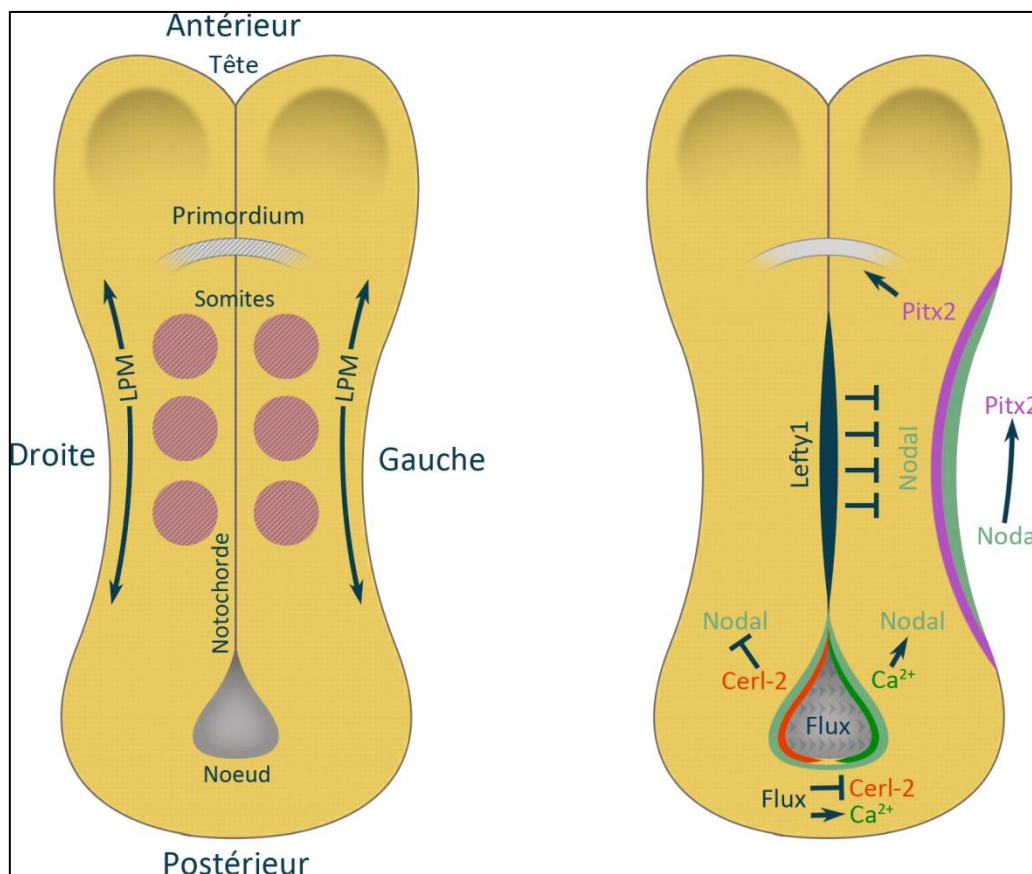


Figure 4 : Propagation de l'information de latéralité à travers l'embryon de souris. Le nœud se trouve dans le prolongement de la notochorde à l'extrémité postérieure de l'embryon. Le flux de liquide dirigé vers la gauche va induire une réponse calcique principalement du côté gauche. Cette élévation latéralisée des niveaux de calcium va ensuite favoriser l'expression de nodal dans le LPM gauche. Cerl-2 de son côté antagonise l'expression de nodal du côté droit. Lefty1 agit au niveau de la ligne médiane comme une barrière à la diffusion du signal nodal du côté droit de l'embryon, et permet de conserver sa latéralité. Nodal active finalement Pitx2 au niveau des primordia d'organes pour initier une organogenèse latéralisée.

A la suite de la mise en place du flux, l'expression de *nodal*, initialement détecté des deux côtés du nœud, se renforce ensuite du côté gauche. Nodal, un membre de la famille des

TGF-beta, diffuse à travers le mésoderme latéral (LPM, Lateral Plate Mesoderm) entourant le nœud, où il active une boucle de rétrocontrôle positive incluant sa propre expression, et celle d'autres gènes comme *lefty2* et *pitx2* dans le LPM et *lefty1* dans la ligne médiane (Brennan, Norris, and Robertson 2002) (Figure 4). L'expression de *lefty1* au niveau de la ligne médiane antagonise nodal du côté gauche du LPM, ce qui prévient sa diffusion dans le LPM droit (Meno et al. 1998, Yamamoto et al. 2003). En conséquence, les mutants nodal présentent un isomérisme droite, tandis que les mutants *lefty1* présentent un isomérisme gauche (Nakamura et al. 2006, Brennan, Norris, and Robertson 2002, Yamamoto et al. 2003). L'autoactivation de Nodal, et l'inhibition de sa diffusion par *lefty1* sont supposées faire partie d'un système permettant d'amplifier des signaux asymétriques faibles dans le voisinage du nœud en signaux robustes de latéralité (Nakamura et al. 2006) (Figure 4). En aval de la signalisation Nodal se trouve le facteur de transcription à homéodomaine *pitx2*. L'expression de *pitx2*, une fois activée par nodal, reste dans le LPM et son expression induit la morphogenèse latéralisée des organes asymétriques (Logan et al. 1998, Piedra et al. 1998, Ryan et al. 1998, Yoshioka et al. 1998) (Figure 4). La cascade de signalisation initiée par le flux est largement conservée chez les vertébrés présentant un flux dans l'organisateur D/G. Je traiterai ainsi plus en détail cette partie dans la description de la cassure de symétrie de mon organisme modèle, le poisson-zèbre.

I-2- Développement de l'asymétrie droite/gauche chez le poisson-zèbre

Les travaux précoces chez la souris ont été suivis par d'autres études chez divers organismes modèles. Chez les vertébrés, le poisson-zèbre a peu à peu émergé comme une alternative à la souris pour l'étude de l'asymétrie D/G. Ainsi, des travaux récents chez le poisson-zèbre ont permis de nombreuses avancées sur la façon dont la symétrie D/G était brisée au cours du développement. Une région organisatrice, similaire à la plupart des vertébrés dans sa fonction se forme au début de la segmentation à l'extrémité de la notochorde postérieure, à 3 somites, et persiste jusqu'à environ 20 somites au niveau du bourgeon de queue. Découverte dès 1868 chez les poissons téléostéens (Kupffer 1868), cet organe transitoire appelé vésicule de Kupffer (KV) consiste en une cavité remplie d'un liquide de composition chimique inconnue, mû par le battement de cils motiles en un vortex se déplaçant de façon antihoraire quand on l'observe à partir de sa face dorsale. D'une façon encore peu comprise, la mise en place de ce flux de liquide est nécessaire à l'expression des premiers gènes asymétriques, et à l'initiation d'une cascade de signalisation latéralisée à travers le mésoderme. La KV se forme à partir d'un groupe de cellules polarisées, connu comme le groupe de cellules précurseurs dorsales (DFC, Dorsal forerunner cells). Les DFC apparaissent au début de la gastrulation au niveau de la marge du blastoderme et leur migration postérieure finement contrôlée aboutit à la mise en place de la structure de la KV et à la formation de sa lumière. Je détaillerai dans cette partie l'état des connaissances sur la mise en place de la latéralité chez le poisson-zèbre, et la façon dont ce modèle a permis de faire avancer les connaissances amorcées par la souris. A partir de la différenciation et la migration des cellules progénitrices de la KV, jusqu'à la formation de la lumière de l'organe et sa ciliogenèse. Je différencierai le groupe de cellules progénitrices, les DFC, de la KV, à partir de la formation de la lumière de l'organe, qui correspond également à l'initiation des premiers signaux latéralisés. Je m'arrêterai ensuite sur la façon dont le flux permet de transmettre les signaux asymétriques, et dont ces derniers conduisent à la mise en place d'une morphogenèse et d'une organogenèse latéralisée. La problématique du flux sera traitée plus en détail, mes travaux de thèse s'y rapportant directement, que ce soit par le travail effectué sur le gène *myo1D*, ou celui effectué avec les membres du complexe ESCRT.

I-2-a- Différenciation des progéniteurs de l'organisateur droite/gauche

Les DFC se différencient à partir d'un groupe de cellules appartenant à l'épithélium de surface enveloppant le blastoderme (EVL, Envelopping Layer), et d'autres cellules de

couches plus profondes. Ces cellules, appelées les cellules marginales endocytiques (NEM, Noninvoluting Endocytic Marginal cells), se situent donc à la marge du blastoderme dorsal et persistent jusqu'à la fin du stade blastula. Leur appartenance à un groupe de cellules cohérent a été mise en évidence initialement par une activité endocytique plus importante que les cellules environnantes, ce qui rend leur marquage grâce à des sondes fluorescentes aisé (Cooper and D'Amico 1996). L'entrée en gastrulation à 50% épibolie, entraîne une compaction des cellules NEM qui sont ensuite appelées DFC, et se situent à la marge de l'embryon au niveau de la ligne médiane embryonnaire (Figure 5). De façon surprenante, bien que présentes à la marge, les DFC ne participent pas à l'involution de cellules entraîné par la gastrulation (Melby, Warga, and Kimmel 1996). La signalisation Nodal joue un rôle majeur dans la différenciation des DFC, en plus de son rôle plus tardif dans la transduction du signal porté par le flux, et sa perte entraîne une diminution de leur nombre (Oteiza et al. 2008). Le calcium joue également un rôle important dans ce processus, et la perturbation de la signalisation calcique à partir de stades aussi précoces que les prémices de la gastrulation, perturbe la formation des DFC (Kreiling et al. 2008, Schneider et al. 2008). De façon très notable pour l'étude du D/G chez le poisson-zèbre, une technique permettant de cibler l'adressage de réactifs seulement dans les DFC a été développé pour comprendre leur rôle dans la mise en place de la latéralité (Amack and Yost 2004). Des ponts cytoplasmiques sont présents entre les cellules et le vitellus jusqu'au stade 64 cellules, à l'exception des DFC, qui conservent ces ponts jusqu'à 256-512 cellules (Cooper and D'Amico 1996). Cette particularité permet ainsi qu'un morpholino marqué, s'il est injecté dans le vitellus à 256-512 cellules, soit adressé spécifiquement aux DFC. Il a également été montré que de l'ARNm injecté dans le vitellus à ce même stade permettait d'obtenir des protéines dérivées de cette injection spécifiquement dans les DFC (Matsui et al. 2011). Cette observation valide l'utilisation de cette technique pour des approches de gain-de-fonction ou de sauvetage phénotypique (Esguerra et al. 2007, Yuan et al. 2015). Ainsi, il a été mis en évidence en utilisant cette technique une grande pluralité de signaux contrôlant la formation et le maintien de la cohésion du groupe de DFC au cours de sa migration (Matsui, Ishikawa, and Bessho 2015), dont je discuterai ensuite.

I-2-b- Migration et compaction du groupe de cellules précurseurs dorsales

Après sa différenciation à partir des cellules NEM, le groupe de DFC migre vers le pôle végétatif de façon continue tout au long de la gastrulation. La migration des DFC s'accompagne de phases de divisions actives durant lesquels le groupe passe de 20-30 cellules à 50-60, sous le contrôle de flux de protons par la v-ATPase *atp6ap1b* (Gokey, Dasgupta, and Amack 2015). Cette migration suit la ligne médiane de l'embryon. Il s'agit

d'une migration collective, qui se caractérise par la combinaison d'une migration dirigée et d'un maintien de la cohésion entre les cellules. Cette migration collective se produit en interaction constante avec l'ectoderme externe (OSE, overlapping surface ectoderm) (Oteiza et al. 2008) (Figure 5). La cohésion du groupe est maintenue par des jonctions cellulaires serrées facilitées par *cadherin1* et le protéoglycan *sdc2*, sous le contrôle d'une boucle de rétrocontrôle positive de la signalisation FGF (Matsui et al. 2011, Arrington, Peterson, and Yost 2013). Durant les phases tardives de la gastrulation, les DFC sont ensuite soumis à une compaction progressive, et se polarisent via un processus régulé par la voie PCP, tandis que le groupe de cellules garde encore le contact avec l'OSE (Oteiza et al. 2010) (Figure 5). Le contact avec l'OSE s'effectue par l'intermédiaire d'intégrines, dont l'inhibition entraîne une localisation aberrante du groupe de DFC (Ablooglu et al. 2010).

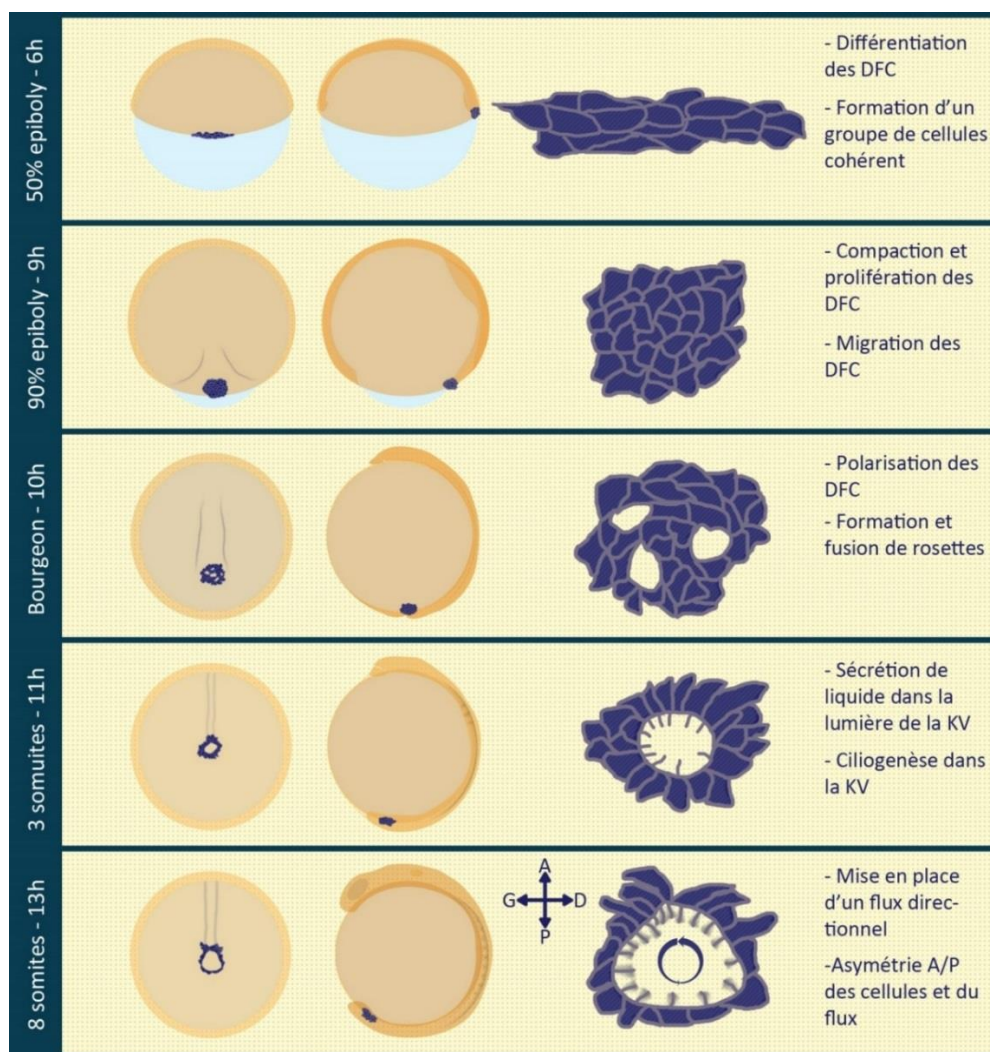


Figure 5 : Formation des DFC et de la KV au cours du développement. Les DFC se différencient à 50% épibolie pour former un groupe de cellules cohérent se situant à la marge de l'embryon sur la ligne médiane. Ils migrent ensuite vers le pôle végétatif tout en proliférant et en renforçant leur cohésion. Certaines cellules du groupe se polarisent pour former des rosettes en plusieurs endroits. Ces rosettes fusionnent alors pour ouvrir la lumière de la KV, et une sécrétion de liquide se met en place. De façon conjointe à l'ouverture de la lumière, une ciliogenèse est initiée afin de mettre en mouvement le fluide sécrété. Le flux se circularise ensuite et acquiert une asymétrie A/P, essentiel à la cassure de symétrie.

Des défauts de spécification, de groupement ou de compaction des DFC entraînent de graves défauts d'organogenèse de la KV, de la ciliogenèse et de la mise en place de l'asymétrie D/G à des stades plus tardifs. Par exemple, dans les mutants du gène nodal-dépendant *casanova/sox32*, la spécification des DFC, la ciliogenèse et la formation de la KV sont abolies (Essner et al. 2005). Quand la boucle de rétrocontrôle positive de FGF est interrompue par la perte-de-fonction du régulateur de FGF *canopy1*, le groupe de DFC se brise en multiples groupes de cellules, ce qui affecte la formation de la lumière et le contrôle de la longueur et du nombre des cils (Matsui et al. 2011). Bien que la perte de fonction de *prickle1*, un composant de la voie PCP, n'affecte pas des processus précoces comme la spécification et le groupement des DFC, le groupe de DFC chez les morphants *prickle1* ne parvient pas à se compacter, ce qui conduit à une lumière fragmentée et des cils plus courts (Oteiza et al. 2010).

A la fin de la gastrulation, le groupe de DFC se détache de l'OSE, et forme de multiples structures en rosette 3D, qui s'agencent finalement en une seule rosette, de façon synchronisée avec l'ouverture de la lumière au début de la segmentation à 3 somites (Oteiza et al. 2008) (Figure 5).

I-2-c- Expansion de la lumière de la vésicule de Kupffer

Après la migration postérieure des DFC à la fin de la gastrulation, l'inflation de la lumière de la KV démarre à un stade de segmentation précoce, 3 somites (Figure 5).

La mise en place d'une sécrétion de fluide dans la lumière de l'organe nécessite comme prérequis la polarisation des cellules qui le composent, et la mise en place d'un trafic vésiculaire pour acheminer les composants essentiels à l'inflation. Cela semble être régulé par le gène *lgl2* (*Lethal giant larvae 2*), par l'intermédiaire de la *E-cadhérine* et de *rab11a* (Tay et al. 2013). Sécrétion de fluide et ciliogenèse semblent étroitement liés, avec plusieurs gènes importants pour les deux processus, comme *lgl2* ou *azi1* (Chamling et al. 2014). Le début de la sécrétion étant concomitante à la ciliogenèse, la présence de boucle de rétrocontrôle entre ces deux processus peut être envisagée.

Il est difficile de dissocier l'inflation de la KV d'autres processus plus généraux du D/G, néanmoins, un certain nombre de gènes sont suspectés jouer un rôle spécifique dans cette étape.

Le gène *cftr* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), qui est largement connu pour son contrôle dans la sécrétion de fluide chez les vertébrés et dont l'altération de la fonction est associée à la mucoviscidose chez l'homme (Riordan et al. 1989), a été montré comme régulant l'influx de liquide dans la KV (Navis, Marjoram, and Bagnat 2013). Sa perte n'entraîne pas de défaut de ciliogenèse ou de migration des DFC, ce qui indique que ces

processus peuvent également être indépendants de l'inflation. *Cftr* semble initier seul l'inflation de la KV, et le gène *pkd2*, en augmentant les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} va ensuite stimuler l'action de *cftr* et amplifier son effet (Roxo-Rosa et al. 2015). La sécrétion de fluide dans la lumière s'effectue par la mise en place d'un gradient osmotique par l'action conjointe de *cftr* et *pkd2*.

Etonnamment, entre la migration postérieure des DFC et la mise en place de la structure de la KV, les cellules gardent plus ou moins la même position selon les axes D/G et A/P (Dasgupta and Amack 2016). Ainsi, une cellule présente à l'antérieur gauche du groupe de DFC, se retrouvera à l'antérieur gauche dans la KV. De plus, une étude récente a montré que le facteur de transcription *her12* (*hairy-related12*) était exprimé dans davantage de cellules des DFC au postérieur en comparaison de l'antérieur (Tavares et al. 2017). Ces observations soulèvent la question de la préexistence du signal de cassure de symétrie D/G, qui pourrait théoriquement remonter aux DFC, avant la mise en place d'un flux dans la KV. En effet, si les DFC apparaissent comme étant différenciées le long de l'axe A/P, et que le plan D/G se définit par rapport à lui, la cassure de symétrie est possible à ce stade (Figure 5).

Il est également important de noter que le niveau de remplissage de la lumière de la KV est très finement contrôlé, et que le remplissage de la KV en liquide ne suffit pas pour permettre la mise en place d'une bonne latéralité. Ainsi, l'influx de liquide semble être soumis à un volume seuil (Gokey et al. 2016, Compagnon et al. 2014), qui se traduit par une taille limite de KV en dessous duquel des défauts de latéralité D/G surviennent.

I-2-d- Ciliogenèse de la vésicule de Kupffer

Au cours de la ciliogenèse, les centrioles des cellules forment des corps basaux qui ancrent les cils à la surface des cellules et permettent la synthèse des axonèmes. Les cils sont mis en place et maintenus par des gènes IFT (intraflagellar transport) comme *ift57* ou *ift88* (Figure 1). Le facteur de transcription contrôlant la production de cils motiles chez le poisson-zèbre a été identifié comme étant *foxj1a*, un gène cible de la voie hedgehog (Stubbs et al. 2008, Yu et al. 2008), mais également de la voie Wnt/ β -catenin (Zhu, Xu, and Lin 2015). La perte de *foxj1a* entraîne un déficit de production dans les cils ou les corps basaux de composants ciliaires essentiels à leur fonctionnement comme *Ird* ou *centrin2*, ce qui résulte en une absence ou une réduction de la taille des cils ou de leur motilité. La perte d'*ift57* ou *ift88* a les mêmes conséquences sur la taille des cils (Kramer-Zucker et al. 2005)). De plus, dans les mutants *deltaD* (*Aei/After eight*), ou dans des embryons inactivés pour l'orthologue de *fgfr1a* ou le médiateur de la voie PCP *duboraya*, les composants ciliaires et/ou les gènes IFT sont sous-exprimés dans les DFC, les cils de la KV deviennent plus courts, et des

défauts D/G surviennent (Lopes et al. 2010, Neugebauer et al. 2009, Oishi et al. 2006). La signalisation Delta/Notch particulièrement semble essentielle au contrôle de la longueur des cils, avec un phénotype de rallongement des cils suite à la surexpression du domaine intracellulaire de Notch (NICD) (Lopes et al. 2010).

Cependant, bien qu'une réduction de la longueur des cils apparaisse toujours comme ayant un impact négatif sur le flux de la KV et la latéralité, une augmentation de leur longueur ne semble qu'entraîner des défauts plus anecdotiques (Pintado et al. 2017).

Initialement, seule la présence de cils motiles a été décrite dans la KV (Kramer-Zucker et al. 2005), contrairement à la souris. Puis le développement de lignées transgéniques spécifiques a permis d'identifier la présence de cils immotiles minoritaires par rapport aux cils motiles dans la KV (Borovina et al. 2010). Cependant, leur ultrastructure ne semble pas différer des cils motiles environnants (Pintado et al. 2017) avec des bras de dynéine et un doublet central, et leur immotilité est transitoire dans la mise en place de la KV (Pintado et al. 2017, Ferreira et al. 2017). Les cils immotiles, nombreux à l'ouverture de la lumière à 3 somites, sont quasi absents à 8 somites, tous les cils motiles ayant acquis la motilité. De la même façon que pour le *Xenopus*, la signalisation Delta-Notch semble être essentielle au contrôle du ratio entre cils immotiles et cils motiles (Pintado et al. 2017). Néanmoins, le nombre de cils immotiles dans la KV, et leur utilité dans la mise en place d'une latéralité est sujet à débat (Sampaio et al. 2014, Yuan et al. 2015, Ferreira et al. 2017), à l'inverse de la souris où leur rôle a clairement été mis en évidence.

I-2-e- Mise en place du flux directionnel dans l'organisateur droite/gauche

Le flux de la vésicule de Kupffer se présente sous une forme circulaire antihoraire quand on le regarde par le pôle dorsal (Figure 6). Pratiquement immobile à 3 somites, il gagne ensuite en vitesse jusqu'à 8 somites, et sa trajectoire plutôt chaotique à son initiation s'affine et se circularise (Tavares et al. 2017). Dans des embryons sauvages, le flux est plus rapide à l'antérieur de la KV par rapport au postérieur. La kinase rho *rock2b* semble jouer un rôle majeur dans l'acquisition d'un flux A/P, car son inactivation entraîne la formation d'un flux homogène (Wang et al. 2011). Sa perte entraîne une perturbation de la forme des cellules de la KV, qui présentent normalement une surface apicale réduite à l'antérieur et élevée au postérieur, affectant l'accélération antérieure du flux. Au cours de la formation de la KV, les cellules ont tout d'abord une surface apicale réduite, puis seules la surface apicale des cellules postérieures s'accroît (Wang et al. 2012) (Figure 5). Ainsi, les cellules de la KV étant mono-ciliées, le nombre de cils va être plus important à l'antérieur qu'au postérieur (Kreiling, Williams, and Creton 2007), ce qui entraîne une accélération locale à l'antérieur du flux. Ce processus a été montré récemment comme étant dépendant de la présence de la

notochorde à l'antérieur de la KV, qui dicte leur changement de forme aux cellules de l'organisateur, grâce à l'intervention de protéines de la matrice extracellulaire comme la Laminine (Compagnon et al. 2014).

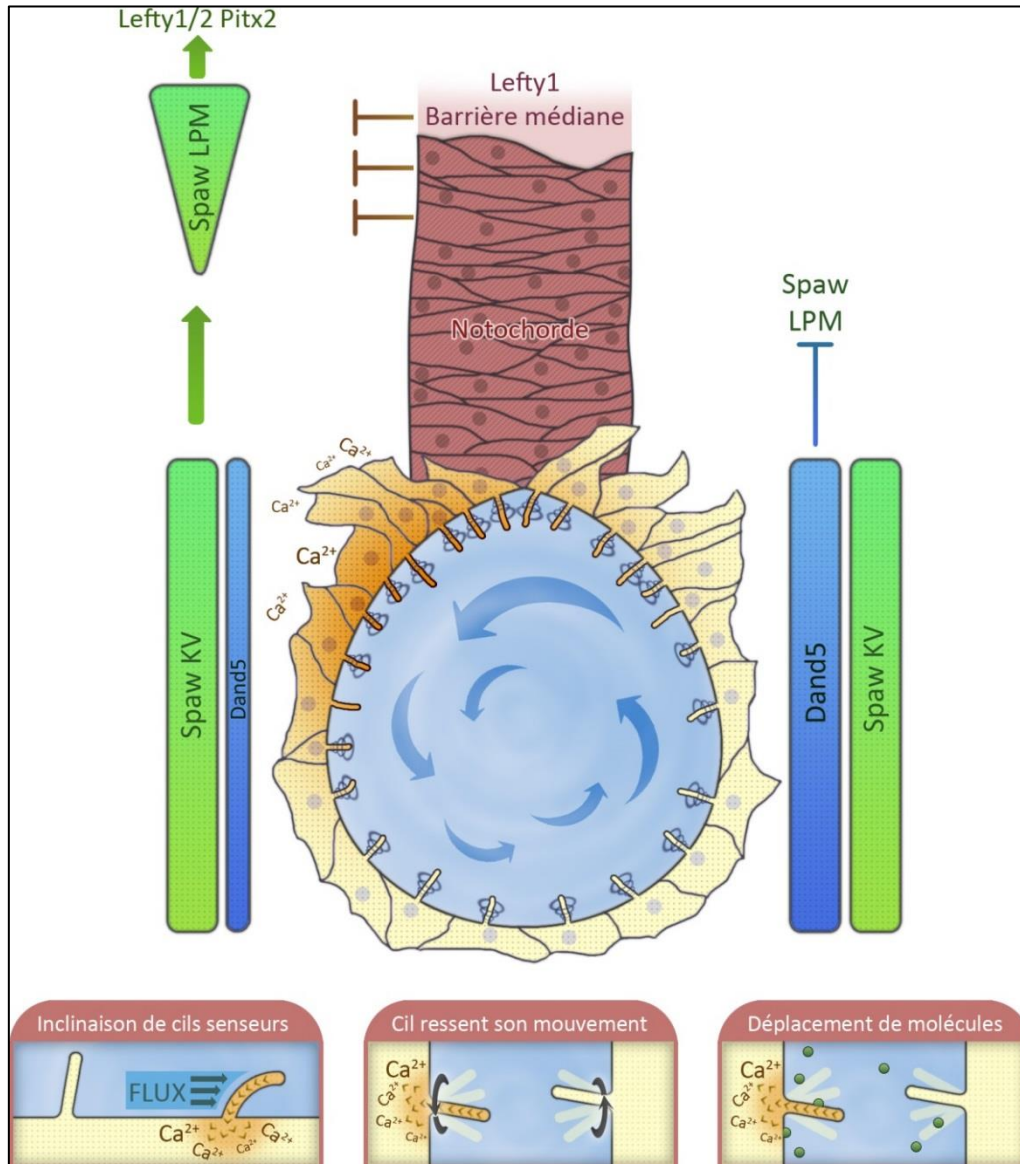


Figure 6 : Vésicule de Kupffer et modèles de cassure de symétrie. Le flux de la vésicule de Kupffer est circulaire à 8 somites et présente une accélération franche à l'antérieur. Cela est dû à une forme différentielle des cellules de l'antérieur qui présentent une surface apicale réduite, augmentant le nombre de cils localement à l'antérieur. Des cils immotiles peuvent être observés, mais dans de faibles proportions en comparaison des cils motiles. Le premier évènement de latéralité observé est l'apparition d'influx calciques, principalement dans les cellules situées à l'antérieur gauche. Ensuite, le premier gène exprimé de façon latéralisé est *dand5*, préférentiellement du côté droit de la vésicule. La latéralité des influx calciques et de l'expression de *dand5* vont ensuite favoriser l'expression de *spaw* dans le LPM gauche, et l'inhiber du côté droit. L'expression de *spaw* est responsable de l'activation de *lefty1/2* et *pitx2* au niveau des primordia d'organes. La présence de *lefty1* au niveau de la notochorde prévient la diffusion de *spaw* dans le LPM droit. Différents modèles sont ensuite présentés pour expliquer la façon dont le flux entraîne un influx latéralisé de calcium : une inclinaison de cils senseurs d'un côté préférentiellement ; des cellules étant capable de disperser des molécules en fonction du sens de rotation du cil ; le déplacement latéralisé de molécules de signalisation.

Aucune distinction physique n'a cependant été observée entre la gauche et la droite de la KV au niveau du placement des cils ou de la forme des cellules. Cependant, une controverse subsiste entre la présence d'un flux asymétrique avec une accélération sur la gauche (Sampaio et al. 2014), ou un flux bilatéral (Wang et al. 2011). De plus, un modèle mathématique de flux récent a soumis l'hypothèse que les accélérations de flux les plus prononcées pourraient se produire du côté droit (Ferreira et al. 2017). Le consensus est donc pour le moment du côté d'un flux antéro-postérieur, mais des travaux additionnels seront requis pour faire la lumière sur sa potentielle latéralité.

Il a été montré que le fléchissement des cils motiles dû à la force du flux est négligeable par rapport au fléchissement dû à leur seule rotation, ce qui rend peu probable que les cils motiles de la KV soient utiles à la sensation d'une information mécanique contenue dans le flux (Ferreira et al. 2017). Une hypothèse intéressante, qui peut être envisagée à cause de la forme sphérique de la KV serait que les cellules puissent être capable de ressentir le sens de rotation des cils. Ainsi, comme tous les cils battent dans un sens horaire, les cils situés sur la gauche conduiraient une réponse cellulaire différente de ceux situés sur la droite (Figure 6).

L'inclinaison des cils de la KV, qui semble comme chez la souris être sous le contrôle de la voie de signalisation PCP par l'intermédiaire de *vangl2* (Borovina et al. 2010), est également cruciale à l'initiation d'un flux circulaire (May-Simera et al. 2010). Les cils de la KV sont principalement inclinés de façon postérieure ; cependant, la KV étant une cavité sphérique, leur inclinaison par rapport à l'axe D/V est également nécessaire. En ce sens, il a tout d'abord été prédit que les cils devaient être inclinés dorsalement afin de produire un flux circulaire robuste (Montenegro-Johnson et al. 2016), puis cela a été vérifié *in vivo* grâce à une lignée permettant d'observer la direction du cône de battement des cils (Ferreira et al. 2017) (Figure 6).

I-2-f- Transmission de l'information du flux vers le mésoderme latéral

Suite à la mise en place du flux dans la KV à 3 somites, un certain nombre d'évènements asymétriques se produisent dans un laps de temps court. L'asymétrie initiée s'amplifie avec l'accroissement de la vitesse du flux et l'acquisition de la motilité pour les cils de la KV, qui est au maximum à environ 8 somites. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse d'un flux qui participe à une acquisition progressive de la latéralité, et non avec celle d'un évènement précoce isolé.

Nodal, un membre de la famille des TGF- β (Transforming growth factor) des morphogènes sécrétés, est requis pour la mise en place du D/G chez tous les vertébrés étudiés jusqu'à présent (Schier 2009). Chez le poisson-zèbre un gène homologue de Nodal, *southspaw*

(*spaw*), est exprimé de façon bilatérale dans les cellules entourant la KV aux stades 4 à 6 somites, et se restreint ensuite du côté gauche du LPM à partir de 10-12 somites (Long, Ahmad, and Rebagliati 2003). L'expression de *spaw* semble être contrôlée par sa propre synthèse, et cette boucle de rétrocontrôle positive est cruciale pour générer une asymétrie dans LPM (Shiratori et al. 2006, Schier 2009). Il n'est pas encore totalement compris comment la distribution bilatérale de *spaw* autour de la KV stimule ensuite son asymétrie, mais différents modèles explicatifs sont proposés.

Il a ainsi été montré que le flux de la KV entraîne une élévation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires du côté gauche. Cette augmentation induit la phosphorylation de la protéine CaMK-II (Ca^{2+} /CaM-dépendant protein kinase II), ce qui active à la fois le relâchement de Ca^{2+} au niveau du réticulum endoplasmique, et un influx de Ca^{2+} extracellulaire (Francescato et al. 2010, Jurynek et al. 2008, Sarmah et al. 2005). De plus, l'influx de calcium semble se produire au niveau des cils de la KV, au plus près du contact avec le flux, ce qui renforce l'hypothèse du transport de calcium comme premier événement latéralisé (Yuan et al. 2015). Cette boucle de rétrocontrôle positive des signaux Ca^{2+} pourrait ensuite entraîner une mise en place/sécrétion de *spaw* seulement du côté gauche de la KV (Figure 5).

D'un autre côté, *dand5*, un antagoniste des TGF- β , membre de la famille Cerberus/Dan, contribue aussi à la génération d'une expression de *spaw* de façon asymétrique autour de la KV (Figure 6). *Dand5* a initialement été décrit comme bilatéral dans les cellules de la KV au stade 6 somites, mais son expression devient asymétrique autour de 8-10 somites de façon dépendante du flux (Lopes et al. 2010). Comme *dand5* se lie à *spaw* et antagonise sa fonction (Hashimoto et al. 2004), l'expression de *dand5* du côté droit de la KV tend à inhiber *spaw* plus fortement à droite. A cause des gradients opposés d'activation (*spaw*) et d'inhibition (*dand5*), *spaw* ne peut pas stimuler sa propre expression du côté droit. A l'inverse, *spaw* induit sa propre expression du côté gauche par rétrocontrôle positif. De façon intéressante, son expression est contrôlée par le facteur de transcription *foxj1a* par le biais d'une fonction non ciliaire (Zhu, Xu, and Lin 2015).

L'attribution des premiers signaux asymétriques à *Dand5* ou aux influx calciques autour de 3-6 somites est toujours soumise à controverse chez le poisson zèbre. Néanmoins, des travaux récents chez la souris semblent faire la lumière sur la question. Dans ces travaux, l'orthologue de *dand5*, *cerl-2*, perd son asymétrie chez un mutant *Pkd111*, responsable de l'augmentation des niveaux calciques intracellulaire avec *Pkd2* (Grimes et al. 2016). Ainsi, la signalisation calcique semble être la plus précoce en termes de latéralité chez la souris, et les travaux récents chez le poissons-zèbre sur les oscillations calciques de cils tendent à le confirmer (Yuan et al. 2015).

Récemment, deux travaux ont permis également d'identifier des gènes essentiels au transfert de l'information D/G entre les influx calciques/*dand5* et *spaw*. Ils ont mis en évidence un protéoglycan, *ugdh*, dont la perte n'entraîne pas de défaut du flux ou de ciliogénèse, mais une perte de l'asymétrie de CaMK-II et *dand5* (Superina, Borovina, and Ciruna 2014). Ainsi que *dvr1* qui appartient comme *spaw* à la famille des TGF- β , et qui n'entraîne pas de défaut de d'expression de *dand5* lorsqu'il est inhibé, mais des défauts de latéralité de *spaw* dans le LPM (Arrington, Peterson, and Yost 2013).

I-2-g- Propagation de l'information de latéralité à travers le mésoderme

Une fois l'asymétrie de *spaw* établie dans le LPM autour de 10-12 somites, il va activer toute une cascade de gènes cibles au fur et à mesure de sa remontée vers l'antérieur. Ainsi, sa perte abolit l'expression de gènes incluant *pitx2*, *lefty1* et *lefty2* dans le LPM, et *lefty1* dans la ligne médiane (au niveau de la notochorde postérieure). *Spaw* est responsable de l'induction d'une morphogénèse latéralisée, ce qui est cohérent avec les phénotypes de perte d'information D/G observés suite à son inactivation (Long, Ahmad, and Rebagliati 2003) (Figure 6).

Ces observations indiquent la présence chez le poisson-zèbre d'une cascade génétique conservée, initiée par *spaw*, et cruciale au transfert d'une information D/G latéralisée dans les primordia d'organes. Une fois l'expression de *spaw* démarrée à l'extrémité postérieure du LPM gauche à 10 somites, le *spaw* nouvellement synthétisé dans le LPM stimule de façon progressive du postérieur vers l'antérieur sa propre expression, celle de *pitx2*, *lefty1* et *lefty2* dans le LPM de gauche, à une vitesse de 2.3 somites par temps de génération de somites (Long, Ahmad, and Rebagliati 2003, Wang and Yost 2008) (Figure 6). La cascade d'activation et les principes généraux de rétrocontrôle étant très conservés par rapport à la souris.

Ainsi, *spaw* va initier l'expression de gènes importants pour la mise en place des primordia d'organes, mais ceux-ci vont également contrôler en retours l'expansion de *spaw* à travers le LPM. En l'absence de *lefty1*, l'expression du côté gauche de *spaw* s'initie normalement, mais il va ensuite « fuiter » du côté droit, et stimuler sa propre expression dans le LPM droit (Smith et al. 2011, Wang and Yost 2008). Une fois l'expression de *spaw* établie du côté droit, la boucle de rétrocontrôle positive de *spaw* entraîne son expression bilatérale. Ces découvertes indiquent que *lefty1* agit comme une barrière au niveau de la ligne médiane, et mettent en évidence la capacité de diffusion de *spaw* sur une longue distance (dans ce cas du LPM gauche au droit). De plus, chez les morphants *lefty1*, la propagation de l'expression de *spaw* du LPM postérieur à l'antérieur est plus rapide que chez des embryons sauvages,

ce qui suggère également un rôle de *lefty1* dans l'optimisation de l'expansion de *spaw* dans le LPM gauche.

Cette interprétation est cohérente avec les données expérimentales montrant que *Lefty1* est un composant majeur d'une barrière de diffusion au niveau de la ligne médiane chez la souris (Meno et al. 1999), et est accréditée par un modèle théorique dans lequel un inhibiteur ayant la capacité de diffuser (comme *lefty1*) dans la ligne médiane contribue à l'établissement d'une asymétrie de nodal dans le LPM. Le système de réaction-diffusion, un modèle théorique, fait intervenir deux composants : un activateur rétroactif et un inhibiteur rétroactif (Turing 1990). En fonction des caractéristiques de la paire activateur/inhibiteur, de multiples motifs comme des vagues, des rayures ou des spirales peuvent être générés. Un système de réaction-diffusion comprenant un activateur local et un inhibiteur à longue distance peut générer une asymétrie robuste à partir de petites différences entre deux régions séparées. Différentes études ont proposé que l'asymétrie D/G dans le LPM était générée par un système de réaction-diffusion en utilisant la paire *nodal/lefty1* (Chen and Schier 2002, Nakamura et al. 2006, Schier 2009, Shiratori et al. 2006). Cependant, les limites de la capacité de *Spaw* et *Lefty1* à diffuser sur une longue distance demeurent inconnues. Des expériences additionnelles mesurant la diffusion de *spaw* et *lefty1* dans des embryons vivants de poissons seront importants pour connaître la nature exacte de la barrière de diffusion de la ligne médiane, et donc de déterminer la façon dont le signal Nodal est restreint du côté gauche.

I-2-h- Organogenèse latéralisée

Suite à l'expansion de *spaw* dans le LPM antérieur, et l'expression de ses gènes cibles, on suppose que le signal *spaw* du côté gauche est relayé aux primordia d'organes, entraînant une organogenèse latéralisée. Le point commun de ces primordia est l'expression précoce latéralisée de *pitx2* dans le diencéphale gauche, l'intestin embryonnaire, et le primordium cardiaque (Essner et al. 2000) (Figure 6). Les signaux en aval de *pitx2* semblent ensuite diverger, et sont encore peu compris. Je traiterai dans cette partie de façon séparée de l'organogenèse des différents organes embryonnaires asymétriques mentionnés précédemment.

Le cerveau de nombreux animaux est organisé de manière asymétrique. Chez l'homme, des asymétries structurelles et fonctionnelles existent entre les deux hémisphères, tandis qu'un petit nombre de gènes sont connus pour être exprimés de façon asymétrique (Karlebach and Francks 2015). L'étude de l'initiation de l'asymétrie dans le cerveau a connu au cours des dernières années des avancées majeures chez le poisson-zèbre (Concha, Bianco, and

Wilson 2012, Gunturkun and Ocklenburg 2017), chez qui une inversion de la signalisation Nodal conduit à des inversions morphologiques du cerveau, mais également du comportement des animaux (Barth et al. 2005).

Dans le cerveau du poisson-zèbre, les asymétries sont le plus visibles au niveau de l'épithalamus, qui se divise en le complexe pinéal et l'habenula gauche et droite, un organe bilatéral. Le complexe pinéal est lui-même composé de l'épiphyse sur la ligne médiane et de la glande parapinéale présentant un biais de localisation vers la gauche. La glande parapinéale parvient à sa position latéralisée sur la gauche en migrant de la ligne médiane vers l'habenula gauche au cours du développement (Snelson et al. 2008, Concha et al. 2003). Ce processus nécessite la mise en place de la signalisation Nodal, exprimée du côté gauche de l'épithalamus, et FGF, exprimé symétriquement dans l'habenula. Dans les mutants *fgf8*, la glande parapinéale échoue à migrer, et reste sur la ligne médiane (Regan et al. 2009). Dans des conditions avec un Nodal symétrique (absent ou exprimé bilatéralement), on observe une migration aléatoire de la glande parapinéale vers la gauche ou la droite, tandis qu'une source ectopique de FGF est suffisante pour orienter la migration de l'organe, mais seulement si nodal est absent (Regan et al. 2009, Concha et al. 2000) (Figure 7).

Un autre organe latéralisé, le cœur, présente des caractéristiques très asymétriques, par sa forme intriquée, ses connexions vasculaires, et la position de la cavité qui l'accueille. Les processus contrôlant la cassure de symétrie du cœur interviennent à différents stades développementaux, et sont principalement séparés en deux classes : Le positionnement précoce du tube cardiaque à 24-26h à gauche de l'embryon, et la torsion du tube cardiaque plus tardive, sachant que ces deux processus peuvent être découplés.

Le plus précoce est donc le positionnement latéralisé des progéniteurs cardiaques, qui se déplacent du côté gauche de l'embryon au fur et à mesure qu'ils s'étendent en une structure en entonnoir appelée le tube cardiaque. A partir de 22h après fertilisation, le cœur du poisson-zèbre consiste en un cône de cellules myocardiques surmontant des cellules endocardiques, positionné au niveau de la ligne médiane (Staudt and Stainier 2012). Peu de temps après, les cellules du côté gauche du cône migrent vers l'antérieur plus rapidement que les cellules du côté droit, ce qui résulte en une rotation horaire et un mouvement latéral du cône, qui s'étend pour produire un tube cardiaque pointant vers la gauche aux alentours de 24-26h après fertilisation (Baker, Holtzman, and Burdine 2008, Smith et al. 2008, de Campos-Baptista et al. 2008)) (Figure 7).

Durant la phase symétrique de cône cardiaque, les cellules cardiaques progénitrices du côté gauche reçoivent un signal Nodal venant de l'antérieur gauche du LPM (Baker, Holtzman, and Burdine 2008, Smith et al. 2008)). Ce signal contrôle la migration rapide des cellules du

côté gauche à une vitesse de 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour 0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$ du côté droit (Lenhart et al. 2013). Les embryons qui ne présentent pas de signal Nodal présentent une migration bilatérale plus lente des progéniteurs (Lenhart et al. 2013). Le mécanisme par lequel la signalisation Nodal du côté gauche augmente la vitesse de migration des progéniteurs n'est pas bien compris, bien que quelques cibles de *spaw* dans ces cellules aient été identifiées (Smith et al. 2008, Veerkamp et al. 2013)). L'une de ces cibles est la Hyluronane synthase 2 (*has2*), une enzyme de remodelage de la matrice extracellulaire qui est exprimée du côté des progéniteurs gauches à un niveau supérieur par rapport au côté droit (Veerkamp et al. 2013). Une autre de ces cibles est une sous-unité de la myosine non musculaire II, *myh9a/myh9l2*, dont l'expression est réprimée par l'activité Nodal. Ainsi, elle a été trouvée comme plus active du côté des progéniteurs droits au stade cône, et son expression ectopique du côté gauche conduit à des placements du cœur inversés ou centrés (Veerkamp et al. 2013). Il semble que Nodal et les signaux en aval convergent vers un contrôle du cytosquelette et de la dynamique de la matrice extracellulaire pour promouvoir une asymétrie des progéniteurs cardiaques.

S'ensuit un processus de torsion du cœur au cours duquel le tube cardiaque primitif se replie de façon latéralisée, permettant aux différentes structures cardiaques d'acquies leur forme définitive (Figure 7). La courbure initiale se produit du côté ventral. Chez le poisson-zèbre, la perte de *spaw* n'entraîne pas de défauts morphogéniques de développement du cœur, mais résulte en une torsion inversée dans 25% des embryons (Baker, Holtzman, and Burdine 2008). Cependant, la majorité présente tout de même une torsion normale. De plus, des cœurs cultivés *in vitro*, sans l'influence de *spaw* développent une torsion normale dans la plupart des cas (Noel et al. 2013). D'un point de vue mécanistique, la torsion requière l'action de l'actine et de la myosine, la signalisation *Spaw* contrôlant l'expression asymétrique d'*actin1b* (Noel et al. 2013). De façon intéressante, il a très récemment été montré que le gène *prrx1a*, appartenant à la même famille que *pitx2*, était impliqué dans la torsion du cœur. Il est exprimé de façon latéralisé principalement à droite dans le LPM par le biais de la signalisation BMP et sa perte entraîne une absence de torsion (Ocana et al. 2017).

Finalement le système gastro-intestinal, qui a été souvent présenté pour être l'élément moteur à l'adoption d'une disposition latéralisée de la part des autres organes internes (Burn and Hill 2009), car il occupe la majeure partie du volume attribué aux viscères, qui se positionnent ainsi par rapport à lui. L'intestin précoce, divisé en trois portions nommées en fonction de leur position par rapport à l'axe A/P, l'intestin antérieur, l'intestin médian et l'intestin postérieur, est une structure tubulaire constituée de cellules endodermes. Une asymétrie émerge quand des portions de l'intestin sont déplacées de la ligne médiane au cours d'un processus appelé l'enroulement de l'intestin. Chez le poisson-zèbre, le premier

enroulement se produit à une position particulière le long de l'axe A/P, quand la région qui va faire émerger le foie et le bulbe intestinal se déplace vers la gauche de la ligne médiane. L'imagerie de l'émergence de l'asymétrie des intestins a révélé que les cellules épithéliales du LPM, qui encadrent l'endoderme, présentent des asymétries de morphologie et de migration qui vont pousser l'endoderme vers la gauche (Horne-Badovinac, Rebagliati, and Stainier 2003) (Figure 7). Ce comportement asymétrique des cellules est permis par le remodelage de la matrice extracellulaire qui se produit en aval de la voie Nodal-Pitx2 (Yin et al. 2010). La laminine plus spécifiquement est dégradée par l'activité de métalloprotéases de la matrice le long de la route que prennent les cellules en migration du LPM.

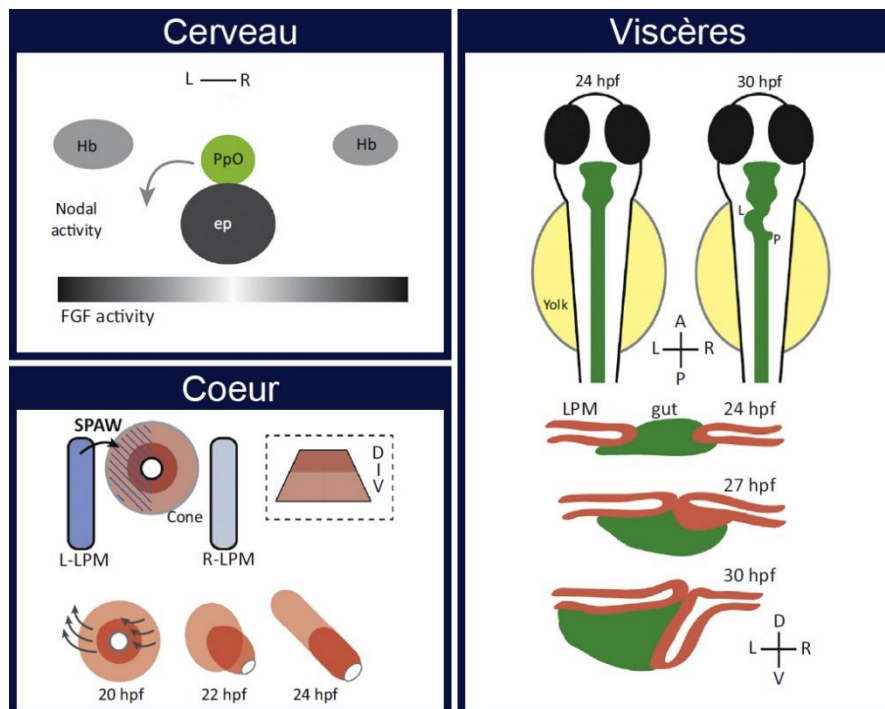


Figure 7 : Organogenèse latéralisée du cerveau, du cœur et des viscères. *Pour le cerveau*, schéma de la région épithalamique représentant les habenulas gauche et droite, la glande parapanéale et l'épiphysse. La glande parapanéale migre vers la gauche en direction de l'habenula gauche en fonction d'un gradient FGF qui s'accroît de la ligne médiane vers les tissus périphériques. *Pour le cœur*, son positionnement latéralisé se produit à partir de 22h. Le cône cardiaque, composé de cellules atriales (rouge clair) et de cellules ventriculaires (rouge foncé) présente tout d'abord une structure parallélogrammique (vue latérale entre les pointillés). Le signal *spaw* dans le LPM gauche active des gènes du côté gauche seulement du cône. En conséquence, les cellules du côté gauche migrent plus rapidement que les cellules du côté droit. Cela résulte en une rotation horaire, une involution et une extension du cône pour former un tube linéaire qui pointe du côté gauche. *Pour les viscères*, l'endoderme (en vert) acquiert une morphologie asymétrique entre 24 et 30h. A 30h, les bourgeons de foie (L) et de pancréas (P) émergent et l'intestin s'enroule de façon asymétrique. A 24h, l'endoderme se présente comme une structure en tige entouré par le LPM. Le LPM (en orange) migre vers la ligne médiane en direction de la tige d'endoderme. Le LPM gauche migre dorsalement tandis que le LPM droit migre de façon ventro-latérale. A 30h, les viscères se sont déplacés vers la gauche suite à la migration du LPM (Grimes and Burdine 2017).

En amont, l'activité des métalloprotéases elle-même est régulée par le facteur de transcription *hand2*, de telle sorte que les mutants *hand2* ne parviennent pas à réaliser un

enroulement (Yin et al. 2010). De façon intéressante, la *laminine* et *hand2* jouent un double rôle dans la latéralité, en étant également requis pour interpréter le signal de la voie Nodal-Pitx2 (Yin et al. 2010, Hochgreb-Hagele et al. 2013)). Cela démontre que des régulateurs de l'asymétrie peuvent avoir de multiples rôles à différents stades de développement de l'asymétrie D/G.

I-2-i- Convergence des mécanismes de mise en place de l'asymétrie droite/gauche

La mise en place d'une asymétrie chez le poisson-zèbre est donc similaire en certains points à la souris, notamment concernant les voies de signalisation impliquées et la hiérarchie d'expression qui s'établit suite à la cassure de symétrie. A l'heure actuelle, pour ces deux modèles, la symétrie semble n'être brisée qu'au niveau de l'organisateur D/G cilié se trouvant dans le prolongement de la notochorde. Principalement la topologie de l'organe change drastiquement, avec une cavité fermée chez le poisson-zèbre, et donc un système de flux en 3D, alors que chez la souris, qui présente une cavité ouverte, le transport de flux se fait majoritairement en 2D. Les implications de ce changement de topologie seront discutées dans la partie suivante, qui porte sur l'étude du transport de matériel extracellulaire dans l'organisateur D/G du poisson-zèbre. Avant cela, dans le contexte de mon premier projet de thèse qui porte sur le rôle de la machinerie ESCRT dans l'établissement de la latéralité, je m'efforcerai d'introduire les modes de fonctionnement d'ESCRT. Quel est le panel de mécanismes contrôlés par ESCRT, et comment les protéines ESCRT s'agencent-elles pour promouvoir sa fonction? Parmi ces points, je me focaliserai sur le rôle d'ESRT dans la sécrétion d'exovésicules dans le milieu extracellulaire, et ses implications cellulaires et développementales.

I-3- ESCRT et exovésicules dans l'asymétrie droite/gauche

L'évènement de rupture de symétrie chez les vertébrés présentant un flux dans l'organisateur D/G, est le déplacement latéralisé de liquide vers le côté gauche de l'embryon. D'un intérêt majeur pour la compréhension de ce premier projet de thèse, je me permettrai de rappeler les deux hypothèses actuellement débattues pour expliquer la façon dont le flux permet de transporter l'information de latéralité.

La première est celle d'une mécanosensation du flux, où des cils immotiles seraient capables de sentir la contrainte de cisaillement qu'applique le flux. Cette hypothèse est controversée chez la souris par le fait que les cils du nœud ne semblent être pas capables de produire un influx calcique, supposé être le premier évènement latéralisé, à la suite d'une stimulation mécanique *in vitro* (Delling et al. 2016). De plus, chez le poisson-zèbre, la contrainte que le flux ferait subir aux cils apparaît comme négligeable par rapport à la contrainte infligée par leur mouvement propre, identique à gauche et à droite (Ferreira et al. 2017). La deuxième hypothèse est celle de la chimiosensation, qui stipule qu'une information chimique, sous la forme par exemple d'un morphogène, serait transportée préférentiellement d'un côté de l'embryon, par le biais du flux. Peu d'observations accréditent cette hypothèse, si ce n'est celles qui réfutent l'hypothèse de mécanosensation. La seule évidence expérimentale qui pourrait aller en ce sens à l'heure actuelle est celle des NVP, des exovésicules qui transportent le morphogène sonic hedgehog (Shh) et l'acide rétinoïque, et qui se désagrègent préférentiellement du côté gauche du nœud de la souris (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005, Kobayashi et al. 2005).

Dans cette optique, on a identifié au laboratoire la présence d'exovésicules positives pour un membre du complexe ESCRT, Chmp1b, dans la lumière de la KV chez le poisson-zèbre, et des expériences suggèrent qu'elles pourraient être importantes pour l'établissement du D/G. J'apporte de plus des évidences expérimentales de la possibilité d'un transport de vésicules extracellulaires de façon latéralisé dans la KV, de la même façon que chez la souris. Je présenterai ici la mise en place d'ESCRT au niveau cellulaire, et au cours du développement. Je me focaliserai ensuite sur les évidences de transports extracellulaires de molécules de signalisation au cours du développement chez divers organismes modèles médiés par le complexe ESCRT. Finalement, je reviendrai et résumerai les différentes hypothèses en cours pour expliquer un transport asymétrique de matériel dans l'organisateur D/G, en m'attardant plus particulièrement dans la description des NVP précédemment mentionnés, ainsi qu'un modèle de flux présenté très récemment chez le poisson-zèbre.

I-3-a- Assemblage d'ESCRT et fonctions cellulaires contrôlées par la machinerie

Les membranes cellulaires sont des structures très dynamiques, qui sont soumises continuellement à des événements de remodelages, de bourgeonnement et de fission. Les types de fission de membrane les plus étudiées sont celles qui consistent en un bourgeonnement vers le cytosol, comme l'endocytose. Cela est contrôlé par des complexes de protéines cytosoliques qui s'assemblent autour du goulot de vésicule ou tubule en formation. Les mécanismes qui contrôlent les bourgeonnements ou fission de membrane avec une topologie inversée, en s'éloignant du cytosol pour aller vers l'espace extracellulaire ou luminal sont moins compris.

Nous savons que les dynamiques de membranes inverses peuvent être contrôlées par des composants d'une machinerie multiprotéique connue comme étant ESCRT (Figure 8). Pour la première fois identifiées pour leurs rôles dans le tri de protéines vacuolaires chez la levure (Babst, Katzmann, Snyder, et al. 2002, Babst, Katzmann, Estepa-Sabal, et al. 2002), les protéines ESCRT constituent un ensemble conservé au cours de l'évolution qui contraint les membranes par l'intérieur du goulot de membrane.

	<i>ESCRT-0</i>		<i>ESCRT-I</i>		<i>ESCRT-II</i>		<i>ESCRT-III</i>		<i>Vps4</i>		<i>Accessoires</i>	
<i>Composants</i>	<i>Levure</i>	<i>Métazoaires</i>	<i>Levure</i>	<i>Métazoaires</i>	<i>Levure</i>	<i>Métazoaires</i>	<i>Levure</i>	<i>Métazoaires</i>	<i>Levure</i>	<i>Métazoaires</i>	<i>Levure</i>	<i>Métazoaires</i>
		Vps27 Hse1	Hrs Stam1,2	Vps23 Vps28 Vps37 Mvb12 -	Tsg101 Vps28 Vps37a-d Mvb12a,b Ubap1	Vps22 Vps25 Vps36	Vps22 Vps25 Vps36	Vps2 Vps24 Vps32 Vps20 -	Chmp2a,b Chmp3 Chmp4/Snf7a-d Chmp6 Chmp7	Vps4 Vta1 Did2 Vps60 Ist1	Vps4a,b Lip5 Chmp1a,b Chmp5 Ist1	Bro1 Doa4 -
<i>Fonction</i>	Reconnaît les cibles ubiquitinilées au niveau de la membrane.		Forme un pont entre ESCRT-0 et ESCRT-II.		Agit en collaboration avec ESCRT-I pour initier une courbure de la membrane attenante à la cible d'ESCRT-0. Recrute ESCRT-III.		Forme un long filament en spirale qui permet la constriction du goulot de membrane.		Catalyse grâce à son activité enzymatique la dissociation de la spirale ESCRT-III en monomères pour permettre son recyclage.		Alix recrute et stabilise ESCRT-III. Ubpy et Amsh assurent la dé-ubiquitination de la cible.	
<i>Interactions</i>	Protéique: Ubiquitine, Amsh, Ubpy, Clathrine, ESCRT-I		Protéique: Ubiquitine ESCRT-0, ESCRT-I		Protéique: Ubiquitine ESCRT-I, ESCRT-II		Protéique: Ubiquitine, Amsh, Ubpy, Alix, ESCRT-II, Vps4		Protéique: ESCRT-III		Protéique: Ubiquitine ESCRT-0, ESCRT-III	
	Membranaire: PtdIns-3P				Membranaire: PtdIns-3P		Membranaire: PtdIns-(3,5)P ₂					

Tableau 1 : Composition, fonctions et interactions des sous-complexes de la machinerie ESCRT. (Juan and Furthauer 2015).

La machinerie ESCRT consiste en quatre sous-complexes distinct d'un point de vue biochimique, connus sous les termes ESCRT-0,-I,-II et -III. ESCRT-III, avec l'ATPase AAA Vps4 (Vacuolar protein-associated sorting 4), sont responsables de la fonction de scission et de remodelage membranaire au sein de la machinerie, tandis que les fonctions d'ESCRT plus précoces contribuent principalement au tri des protéines et au recrutement des sous-unités d'ESCRT-III à leur site d'action (Tableau 1). Le recrutement des sous-unités ESCRT-

III à leur site d'action implique généralement des protéines ESCRT-I et des protéines à domaine Bro1, qui sont des accessoires ESCRT comme Alix ou HD-PTP. Ces éléments sont actifs dans les voies qui entraînent la polymérisation des monomères d'ESCRT-III cytosoliques en filaments qui entourent le goulot de la membrane en bourgeonnement. Les sous-unités ESCRT-III activées utilisent des motifs en C-terminal pour recruter différentes molécules effectrices comme Vps4. Dans un processus qui repose principalement sur l'activité Vps4, le remodelage des filaments ESCRT-III entraîne une constriction et une scission des membranes (Henne, Buchkovich, and Emr 2011, Hurley et al. 2010, Hurley 2015, Raiborg and Stenmark 2009, McCullough, Colf, and Sundquist 2013) (Figure 7).

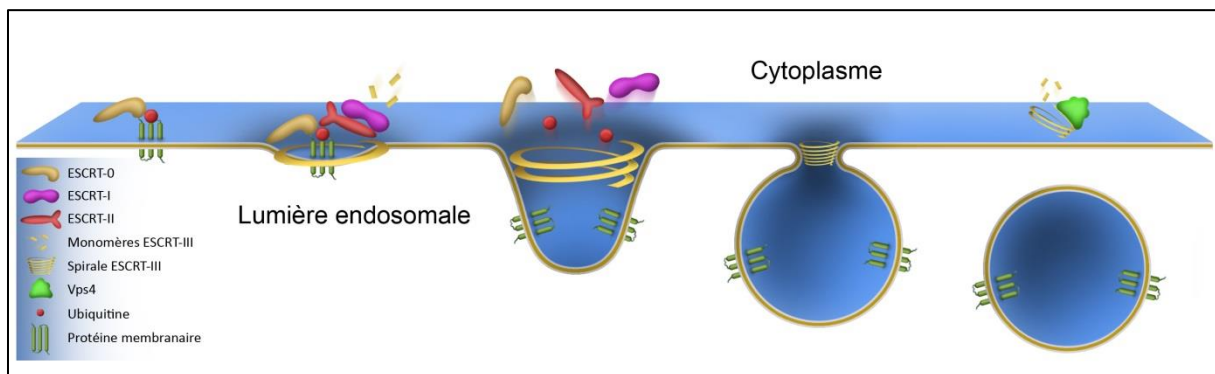


Figure 8 : Mécanismes de déformation des membranes par le complexe ESCRT au cours de la biogenèse endosomale. ESCRT-0 reconnaît les éléments internalisés conjugués à l'ubiquitine. Il recrute ensuite ESCRT-I et ESCRT-II, qui collaborent pour initier une première courbure de la membrane de la future vésicule intraluminaire. ESCRT-II initie par ailleurs l'assemblage de monomères d'ESCRT-III en une spirale qui va encercler la cargaison. La spirale d'ESCRT-III va ensuite continuer à déformer la membrane évaginée, simultanément avec la dé-ubiquitination de la cargaison et les décrochages des autres ESCRT. La constriction de la spirale ESCRT-III se poursuit jusqu'au clivage du septum membranaire séparant la membrane de la vésicule formée. Vps4 intervient alors pour désassembler ESCRT-III en monomères, pour permettre son recyclage (Juan and Furthauer 2015).

On a assisté au cours des dernières années à une explosion de la découverte des fonctions cellulaires utilisant la machinerie ESCRT, comme la formation des vésicules intraluminales (ILV) des endosomes multivésiculaires (MVEs) (Babst, Katzmann, Snyder, et al. 2002)), les bourgeonnement viraux (Morita and Sundquist 2004), la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano 2007, Morita et al. 2007)), la réparation de la membrane plasmique (Jimenez et al. 2014), l'élagage neuronal (Loncle et al. 2015), le contrôle qualité des complexes de pores nucléaires (NPC, nuclear pore complex) (Webster et al. 2014), l'assemblage de l'enveloppe nucléaire (Olmos et al. 2015, Vietri et al. 2015) et sa réparation après une rupture (Raab et al. 2016, Denais et al. 2016), la sécrétion de protéines (Curwin et al. 2016) et le relargage d'exovésicules (Nabhan et al. 2012) (Figure 9). Cette liste évoluant très rapidement, et ayant de fortes chances d'être mise à jour au cours de prochaines années.

La fonction d'ESCRT qui représente un intérêt majeur pour mon projet de thèse est celle impliquée dans le relargage d'exovésicules. Cette fonction est réalisée par l'intermédiaire de

deux voies majoritaires, l'une dépendante des MVEs par l'intermédiaire de la formation des ILV, et l'autre indépendante de ce processus.

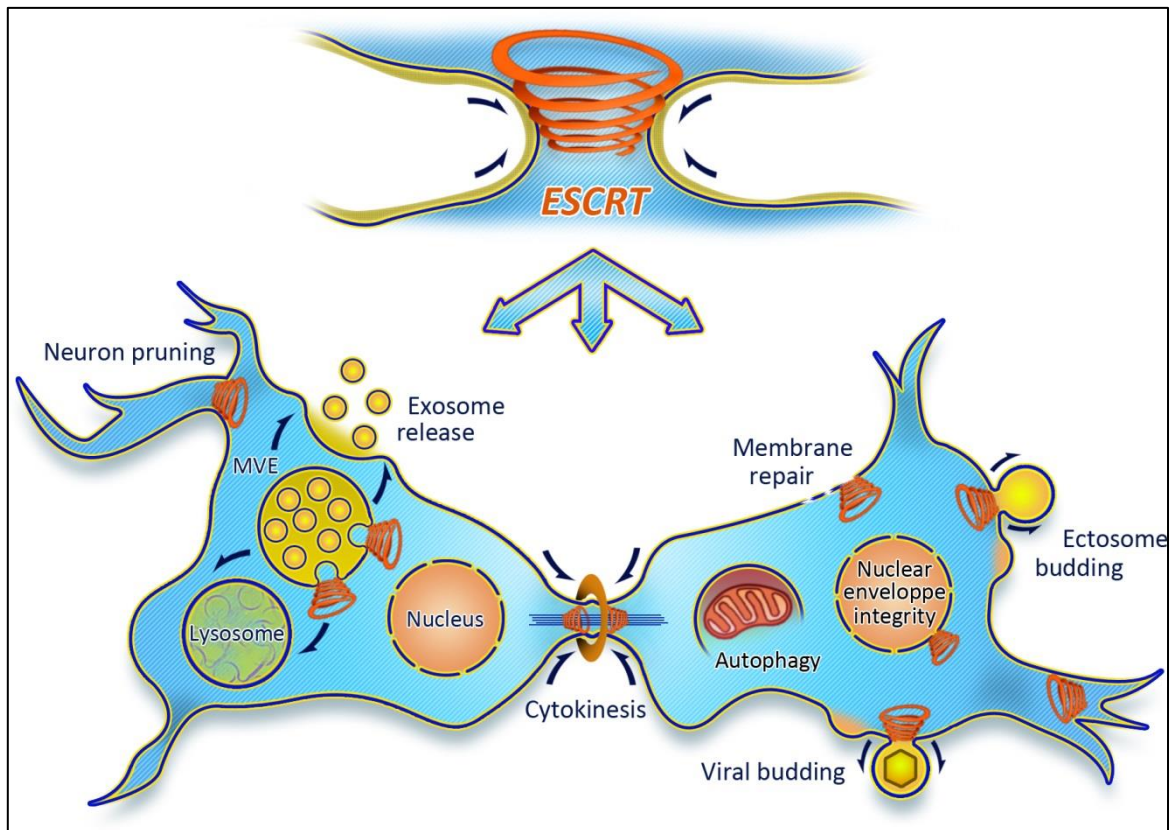


Figure 9 : Fonctions cellulaires du complexe ESCRT. ESCRT reconnaît les cibles ubiquitinylées et la spirale ESCRT-III va permettre une constriction de membrane avec une topologie inversée. ESCRT est impliqué dans un large panel de fonctions cellulaires. Sont illustrés ici l'élagage neuronal, la cytokinèse, la réparation de la membrane plasmique, le contrôle de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire, le relargage d'exosome, et le bourgeonnement d'ectosomes et de virus (Juan and Furthauer 2017).

I-3-b- Exovésicules et dynamique de transport de matériel dans le milieu extérieur

J'utiliserai le terme générique d'exovésicules pour désigner des particules délimitées par une bicouche lipidique et relarguées dans l'espace extracellulaire. Les exovésicules sont généralement séparées en deux catégories en fonction de leur mode de formation. Le terme exosome désigne des exovésicules d'origine endo-lysosomale qui sont relarguées à la suite de la fusion des MVEs avec la membrane plasmique (Johnstone et al. 1987). La deuxième catégorie est représentée par différents termes (ectosomes, microvésicules, vésicules de bourgeonnement...) utilisés pour désigner des exovésicules qui se forment suite à un bourgeonnement au niveau de la surface des cellules. J'utiliserai le terme ectosome pour désigner cette seconde classe d'exovésicules.

Différents types d'exovésicules peuvent être relargués par différentes populations cellulaires (Romancino et al. 2013, Mathivanan, Ji, and Simpson 2010), ou même par un type cellulaire

(Kowal et al. 2016, Forterre et al. 2014). La recherche de méthodes pour identifier, isoler et manipuler différentes exovésicules en est cependant à ses balbutiements. La taille des exovésicules est un des critères les plus utilisés pour la classification de vésicules, avec les plus petites (<150nm) assimilées à des exosomes, tandis que les ectosomes seraient d'une taille plus importante (de 100 à 1000nm) (Colombo, Raposo, and Théry 2014, Kowal et al. 2016). Le chevauchement entre ces gammes de taille, et l'observation du fait que des bactéries, qui ne possèdent pas d'endosomes, relarguent des exovésicules d'une taille comprise entre 30 et 150nm, illustre cependant les limites d'une telle classification (Ellen et al. 2009).

Une étude récente de référence de protéomique sur des exovésicules a révélé qu'exosomes et ectosomes peuvent tous deux être représentés dans les fractions de petite taille (Kowal et al. 2016). Les auteurs proposent que les exosomes sont de petites exovésicules qui sont caractérisés par la présence des tétraspanines CD9, CD63 et CD81, la protéine ESCRT Tsg101, et Syntenin, une protéine impliquée dans la biogenèse d'exosomes de façon dépendante d'Alix (Baietti et al. 2012). En se basant sur des cellules dendritiques humaines, les auteurs suggèrent qu'un fractionnement en fonction de la taille et une immuno-isolation à partir de CD63 serait une bonne combinaison pour isoler des exosomes. Un certain nombre de découvertes indiquent cependant qu'il est essentiel d'adapter la méthode choisie au contexte biologique : chez le poisson-zèbre, CD63 est seulement exprimé et requis dans les cellules de la glande d'éclosion (Trikic et al. 2011), et est donc peu probable de représenter un marqueur exosomal pour ce modèle. Chez la Drosophile, une expression hétérologue de CD63-GFP a été utilisée pour marquer des exosomes (Gross et al. 2012, Gradilla et al. 2014), bien que la drosophile ne présente pas d'homologue de CD63 dans son génome. Bien que des marqueurs spécifiques aux exosomes commencent à émerger, la situation reste donc encore problématique pour les ectosomes et de plus larges exovésicules (Kowal et al. 2016). A ce jour, il n'existe pas de réactifs permettant sans l'ombre d'un doute d'interférer avec la biogenèse d'exovésicules de façon indépendante d'autres processus cellulaires (Tkach and Thery 2016).

Les exosomes ont été initialement découverts dans des réticulocytes en maturation, chez qui leur relargage permet le transfert extracellulaire des récepteurs Transferrin afin de mettre un terme à l'import de fer, et prévenir une toxicité dû au fer (Pan and Johnstone 1983, Johnstone et al. 1987, Harding, Heuser, and Stahl 1983). De façon intéressante, d'autres études ont révélé que la sécrétion d'exosomes contenant des CMH de classe 2 par des cellules présentatrices d'antigènes, entraînait une réponse par des cellules T, établissant une fonction pour ces exovésicules dans la communication intercellulaire (Bobrie et al. 2011). Depuis ces découvertes initiales, les exovésicules exosomales et ectosomales ont été impliquées dans un certain nombre de processus, incluant le transport de molécules de

signalisation importantes pour le développement, la morphogenèse embryonnaire, le nettoyage et la propagation de protéines neurotoxiques, les comportements sociaux, et les interactions hôte-pathogène (Beer and Wehman 2017, McGough and Vincent 2016, Gutierrez-Vazquez et al. 2013, Thompson et al. 2016, Brown et al. 2015).

I-3-c- ESCRT et biogenèse de vésicules exosomales

Comme je l'ai mentionné précédemment, la machinerie ESCRT a été initialement découverte pour son rôle dans le tri de cargo ubiquitinylés et endocytés vers les ILVs des MVEs, qui permettent le transport de molécules internalisées vers la dégradation lysosomale (Henne, Buchkovich, and Emr 2011, Raiborg and Stenmark 2009). En plus de leur rôle dans le transport vers les lysosomes, les MVEs peuvent également exercer d'autres activités en fonction du contexte biologique comme fusionner avec la membrane plasmique, et libérer leur ILV en tant que vésicules extracellulaires.

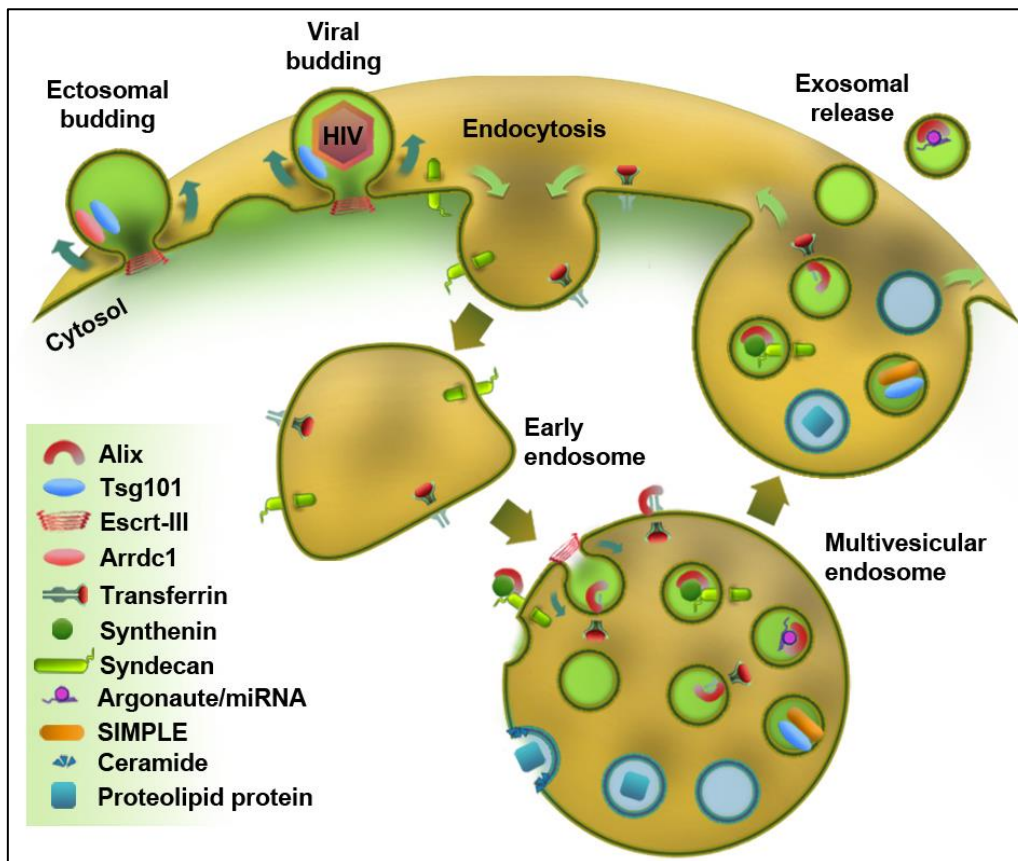


Figure 10 : Biogenèse de vésicules extracellulaires de façon dépendante d'ESCRT. Les protéines ESCRT promeuvent la formation de vésicules extracellulaires par l'intermédiaire de deux voies. La première est un bourgeonnement ectosomal direct à partir de la membrane plasmique à la façon des virus. La deuxième est un relargage exosomal des vésicules intraluminales des endosomes multivésiculaires. La biogenèse exosomale indépendante d'ESCRT par le biais de céramides est également représentée. En plus de la biogenèse de vésicules extracellulaires, les protéines ESCRT régulent également le choix des cargos. Arrdc1 : Arrestin domain-containing protein1, SIMPLE : Small Integral Membrane Protein of the lysosome/Late Endosome, HIV : Human Immunodeficiency Virus (Juan and Furthauer 2017).

D'une façon particulièrement importante pour la biologie des MVEs de sécrétion, un certain nombre de protéines ESCRT ont été détectées dans des exosomes de divers sources (Thery 2011, Mathivanan, Ji, and Simpson 2010, Kowal et al. 2016, Luhtala et al. 2017, Wang et al. 2012, Chiasserini et al. 2015, de Gassart et al. 2004)). Le composant ESCRT-I Tsg101 et l'accessoire ESCRT Alix sont ainsi parmi les marqueurs exosomaux les plus fréquemment utilisés (Figure 10). En plus de marquer les exosomes, les protéines ESCRT sont-elles également importantes pour leur formation ? Au cours de la formation de MVE à destination du compartiment lysosomal, la machinerie ESCRT gouverne à la fois la sélection des cargos incorporés dans les ILVs, et la scission/remodelage de membrane requis pour la formation des ILV (Henne, Buchkovich, and Emr 2011, Raiborg and Stenmark 2009). Bien que notre compréhension de la biogenèse des exosomes reste fragmentaire, ESCRT apparaît une fois encore comme impliqué dans le bourgeonnement exosomal des ILVs, et le chargement des cargos.

- *La voie de biogenèse exosomale par l'intermédiaire de Alix/Syntenin/Syndecan.*

Des études sur des cellules de cancer du sein chez l'homme ont montré qu'Alix utilisait des motifs protéiques requis pour le bourgeonnement viral dépendant d'ESCRT pour interagir avec la protéine Syntenin (Baietti et al. 2012). A la suite de cela, le domaine PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) de Syntenin lie la queue cytoplasmique de l'Heparan Sulfate ProteoGlycan (HSPG) transmembranaire Syndecan. Ce complexe tripartite Alix/Syntenin/Syndecan agit ensuite comme un pont entre la sélection de cargo exosomaux et la formation d'ILV. Grâce à leur chaîne HSPG, les Syndecans peuvent interagir avec des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et la signalisation (Poulain and Yost 2015), et peuvent ainsi recruter des cargos spécifiques. Le complexe Alix/Syntenin/Syndecan dirige aussi physiquement la biogenèse d'ILV exosomales : Bien que la surexpression de ces facteurs accentue leur propre sécrétion exosomale, et celle du marqueur exosomal CD63, leur perte d'expression réduit la formation d'ILV et le relargage d'exosomes (Baietti et al. 2012) (Figure 10). Les HSPG ne semblent pas seulement requis dans les cellules relarguant des exosomes, mais aussi à la surface de cellules réceptrices, où ils agissent comme des récepteurs pour l'internalisation d'exosomes (Christianson et al. 2013).

Des cribles génétiques chez la levure ont initialement permis d'identifier les rôles essentiels des 4 différents sous-complexes d'ESCRT dans la biogenèse des MVE (Henne, Buchkovich, and Emr 2011, Henne, Stenmark, and Emr 2013, Votteler and Sundquist 2013). Des études supplémentaires chez différents métazoaires ont révélé cependant que, dans certains cas, le trafic de certains MVE n'utilisait qu'une fraction de tous les composants ESCRT (Maminska et al. 2016, Ali et al. 2013). D'une façon similaire, d'autres processus dépendants d'ESCRT comme le bourgeonnement viral ou la cytokinèse peuvent se passer de certains composants

(Henne, Stenmark, and Emr 2013, Votteler and Sundquist 2013, Bhutta, McInerney, and Gould 2014). Ces observations soulèvent donc la question des composants requis pour la biogenèse exosomale.

La formation des exosomes par le système Syntenin/Syndecan requiert une interaction directe d'Alix avec des protéines Chmp4 (ESCRT-III) (Baietti et al. 2012) qui sont le principal composant des filaments en spirale permettant les remodelages membranaires (Lata et al. 2008, Tang et al. 2015). Des expériences additionnelles suggèrent cependant que des composants des complexes ESCRT-I (Tsg101) et ESCRT-II (Vps22) sont aussi importants pour la formation des exosomes Syntenin/Syndecan (Baietti et al. 2012). La séquence mécanistique de l'action d'ESCRT dans ce processus restant à établir.

Le tri exosomal, et la sécrétion de Syndecan est ensuite régulé par l'Heparanase, une enzyme capable de cliver la chaîne Heparane sulfate de Syndecan. Il a été proposé que cet événement puisse favoriser le regroupement de cargo (David and Zimmermann 2016), un processus qui promeut la sécrétion exosomale du récepteur Transferrin (Vidal, Mangeat, and Hoekstra 1997) et des molécules du CMH de classe II (Muntasell, Berger, and Roche 2007). La formation d'exosomes Alix/Syntenin/Syndecan requiert la petite GTPase Arf6 et l'un de ses effecteurs, l'enzyme métabolisant les lipides Phospholipase D2 (PLD2) qui est enrichie sur les exosomes (Ghossoub et al. 2014, Laulagnier et al. 2004). PLD2 métabolise la phosphatidylcholine en acide phosphatidique, un lipide dont la forme en cône pourrait promouvoir le bourgeonnement d'exosomes dans la lumière endosomale. En accord ces hypothèses, l'inactivation de Arf6 ou PLD2 inhibe la biogenèse d'ILV exosomaux (Ghossoub et al. 2014).

Des études dans différents types cellulaires suggèrent que les mécanismes de biogenèse exosomale dépendent du contexte biologique (Colombo et al. 2013, Tamai et al. 2010, Abrami et al. 2013). Bien qu'Alix ait été montré pour contrôler à la fois la biogenèse exosomale et le chargement de cargo dans des cellules de cancer du sein (Baietti et al. 2012), sa fonction dans d'autres types cellulaires semble se restreindre à la sélection de cargo exosomaux (Colombo et al. 2013, Abrami et al. 2013). De façon similaire, la déplétion de Tsg101 affecte la sécrétion exosomale dans des cellules HeLa (Colombo et al. 2013), mais également le chargement de cargos exosomaux dans des cellules épithéliales pigmentées de rétine (Abrami et al. 2013). La situation est encore plus confuse pour ce qui est du facteur de désassemblage Vps4 qui en fonction du contexte biologique et de la méthode utilisée, a été décrit pour décroître, agir de façon neutre, ou même accroître la sécrétion exosomale (Baietti et al. 2012, Colombo et al. 2013, Abrami et al. 2013).

Le fait que les exosomes peuvent être générés à travers différents mécanismes dans différents contextes biologiques suggère que ces processus doivent être régulés de façon

précise. Ainsi, par exemple, la protéine Interferon-Stimulated Gene 15 (ISG15) inhibe la sécrétion exosomale en induisant la dégradation de Tsg101 (Villarroya-Beltri et al. 2016).

- *ESCRT et chargement de cargos exosomaux*

La manipulation de l'activité de différentes protéines ESCRT affecte la taille des ILV au cours de la formation de MVE de sécrétion et de dégradation (Romancino et al. 2013, Stuffers, Brech, and Stenmark 2009, Colombo et al. 2013, Nickerson et al. 2010). Il reste ainsi à comprendre si des altérations de taille d'exosomes sont liées à la présence ou l'absence de cargos spécifiques. Est-ce que la taille des ILVs est déterminée par différentes protéines ESCRT en fonction des cargos, ou est-ce que les protéines ESCRT reconnaissent des cargos dont la taille détermine ensuite passivement celle des vésicules ? Dans des MVEs de dégradation, les cargos ubiquitinylés endocytiques promeuvent la biogenèse d'ILV de façon dépendante d'ESCRT (MacDonald et al. 2012). La compréhension des mécanismes de chargement de cargo exosomal n'en est cependant qu'à ses balbutiements (Colombo, Raposo, and Théry 2014, Moreno-Gonzalo, Villarroya-Beltri, and Sanchez-Madrid 2014).

Les protéines ESCRT Hrs, STAM et Tsg101 se liant à l'ubiquitine, ont été reliées à la biogenèse exosomale (Gross et al. 2012, Colombo et al. 2013, Tamai et al. 2010). La façon dont l'ubiquitine contribue au tri des cargos exosomaux n'est cependant pas entièrement claire. Au cours de la biogenèse de MVE de dégradation, des enzymes de dé-ubiquitination retirent l'ubiquitine des cargos endocytés avant leur incorporation dans des ILVs matures (Raiborg and Stenmark 2009). Les ILVs exosomales contiennent cependant des protéines ubiquitinylées (Buschow et al. 2005). L'ubiquitination de la protéine se liant à l'ARN Y-box1 a été suggérée comme permettant son interaction avec Tsg101 et sa sécrétion exosomale en aval (Shurtleff et al. 2016, Palicharla and Maddika 2015). En contraste, l'introduction du CMH de classe 2 dans des exosomes produits par des cellules dendritiques présentatrices d'antigène n'est pas dépendante de l'ubiquitine, mais plutôt de son incorporation dans des domaines membranaires résistants aux détergents contenant le tétraspanine CD9 (Buschow et al. 2009). Des modifications post-traductionnelles comme des sumoylation ont également été impliquées dans le tri de cargo exosomaux (Moreno-Gonzalo, Villarroya-Beltri, and Sanchez-Madrid 2014, Kunadt et al. 2015).

Au moins deux protéines ESCRT peuvent recruter des cargos exosomaux à travers des interactions moléculaires directes. Dans des réticulocytes de rat, l'interaction avec Alix a été suggérée comme permettant le tri exosomal des récepteurs Transferrin (de Gassart et al. 2004). Dans des cellules hépatiques humaines, la liaison d'Alix à la protéine Argonaute2 est requise pour le chargement de miARN sur des exosomes (Iavello et al. 2016). Tsg101 se lie à la protéine SIMPLE (Integral membrane protein of the lysosome/Late endosome), impliquée dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth pour permettre sa sécrétion exosomale (Zhu et al.

2013) (Figure 10). L'analyse de SIMPLE permet d'entrevoir la complexité potentielle de la régulation de la sécrétion exosomale : tandis que la sécrétion SIMPLE est régulée positivement par sa liaison à Tsg101, elle est antagonisée par Nedd4, une E3-ubiquitine ligase favorisant la dégradation lysosomale. La surexpression de la protéine sauvage SIMPLE promeut la sécrétion exosomale. A l'inverse, le relargage exosomal est inhibé dans un modèle souris portant un variant SIMPLE pathologique (Zhu et al. 2013).

I-3-d- Rôle d'ESCRT dans le bourgeonnement d'ectosomes

Avant la découverte de l'importance de la machinerie ESCRT dans la biogenèse exosomale, quelques protéines ESCRT avaient déjà été montrées comme étant requises dans le bourgeonnement de virus enveloppés comme le VIH à la surface des cellules (Votteler and Sundquist 2013). Tandis que le bourgeonnement à la surface des cellules de façon dépendante d'ESCRT a initialement été considéré comme un processus pathologique, d'autres études ont révélé que le relargage d'ectosomes au niveau de la membrane plasmique était essentiel à la morphogenèse, la signalisation cellulaire au cours du développement et de l'immunité, mais aussi dans la maintenance de l'intégrité cellulaire (Wehman et al. 2011, Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014, Jimenez et al. 2014, Long et al. 2016, Scheffer et al. 2014, Choudhuri et al. 2014) (Figure 10).

L'analyse cellulaire de la sécrétion ectosomale a révélé des similarités frappantes entre les bourgeonnements viraux et ectosomaux. Au cours du bourgeonnement du VIH, la protéine virale Gag recrute Tsg101 (Garrus et al. 2001). Dans des cellules de mammifère non-infectées, ARRDC1 (Arrestin Domain-Containing protein 1) agit comme un adaptateur se liant à la membrane plasmique grâce à son domaine arrestin, et à Tsg101 par un motif PSAP (Nabhan et al. 2012) (Figure 10). La présence d'ARRDC1 soustrait Tsg101 à sa localisation endosomale au niveau de la membrane plasmique, et promeut le relargage d'ectosomes contenant Tsg101 et ARRDC1 lui-même, mais pas le marqueur exosomal CD63. A l'inverse, l'expression d'une version mutante d'*ARRDC1* qui ne se localise pas à la membrane plasmique, ou ne lie pas Tsg101, inhibe la production d'ectosomes (Nabhan et al. 2012).

A la lumière de ces observations, il n'est pas surprenant que le relargage d'ectosomes de façon dépendante d'ESCRT soit souvent assimilé au bourgeonnement viral. Cependant, les protéines ESCRT peuvent non seulement promouvoir le bourgeonnement de virus à la surface des cellules, mais également être impliquées dans la biogenèse de virions au niveau des MVEs (Tamai et al. 2012, Feng et al. 2013, Corless et al. 2010). Cette voie endosomale permet au virus de se dissimuler dans les endosomes, où il peut échapper à une détection par le système immunitaire (Anderson, Kashanchi, and Jacobson 2016).

Comme c'est aussi le cas pour les exosomes, les lipides jouent un rôle important dans la biogenèse ectosomale. Les protéines de la famille des ATPases P4 agissent comme des flippases lipidiques transmembranaires qui déplacent des phospholipides de la couche externe à la couche interne de la membrane plasmique pour maintenir l'asymétrie physiologique de la bicouche lipidique. Les mutants *C.Elegans* pour l'ATPase P4 TAT-5 présentent une exposition aberrante de phosphatidylethanolamine (PE) à la surface externe de la cellule (Wehman et al. 2011). La présence de PE sur la surface externe, en forme de cône générateur de courbure, est accompagnée par un relargage excessif d'ectosomes dont la présence interfère avec l'adhésion cellulaire et la morphogenèse. Dans les mutants TAT-5, Rab11 et des protéines ESCRT s'accumulent à la surface des cellules. La production de ces ectosomes délétères implique Rab11, ESCRT-0 et -I, mais de façon surprenante, pas d'autres composants plus tardifs d'ESCRT.

Comme au cours de la biogenèse exosomale, la formation d'ectosomes peut se produire par des biais dépendants d'ESCRT, mais également par des mécanismes indépendants. Chez le *C.Elegans*, le relargage d'ectosomes à partir de neurones senseurs ciliés contrôle le comportement d'accouplement d'une façon indépendante d'ESCRT (Wang et al. 2015, Wang et al. 2014, Silva et al. 2017). De plus, une étude récente a montré l'importance des ectosomes pour le relargage de récepteurs couplés à des protéines G (Nager et al. 2017). Dans ce contexte, des régulateurs de l'actine permettent le relargage de vésicules positives pour CD81 et Tsg101 à partir du sommet des cils. L'importance d'ESCRT pour ce processus reste à déterminer. Bien que la sécrétion ectosomale ait été rapportée dans des tissus non ciliés (Wehman et al. 2011, Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014), les cils et flagelles représentent souvent des sites importants de relargage d'ectosomes (Long et al. 2016, Wang et al. 2014, Nager et al. 2017, Diener, Lupetti, and Rosenbaum 2015, Wood et al. 2013, Cao et al. 2015).

I-3-e- Autres modes de sécrétions contrôlés par ESCRT

Bien que les fonctions d'ESCRT dans la sécrétion aient été majoritairement reliées à des vésicules extracellulaires exo et ectosomales, des études récentes suggèrent qu'ESCRT est également important pour des processus de sécrétion non conventionnelle de protéines qui ne présentent pas de séquence de peptide leader d'entrée dans le réticulum endoplasmique. La sécrétion non conventionnelle a été proposée comme reposant directement sur la translocation de membrane ou sur des transporteurs vésiculaires exotiques (Zhang and Schekman 2013). La sécrétion, induite dans des conditions stringentes, de la protéine de levure Acb1 (Acyl CoA binding protein1) implique ainsi le compartiment CUPS (multivesicular Compartment for Unconventional Protein Secretion) (Curwin et al. 2016). Ce compartiment

comprend des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique incluant Grh1 (une protéine de levure impliquée dans le réassemblage du Golgi) qui se trouvent dans une autre vésicule membranaire les englobant. La formation et la fermeture de la vésicule membranaire externe requière ESCRT-I, -II et -III, mais pas ESCRT-0. La formation des compartiments CUPS apparaît comme étant le premier évènement de remodelage membranaire ne requérant pas la fonction AAA-ATPase de Vps4 (Curwin et al. 2016).

Un système de sécrétion non conventionnel est également impliqué dans le relargage de cytokines pro-inflammatoires Interleukin-1 β (IL-1 β) (Zhang et al. 2015). La protéine chaperonne Hsp90 promeut un changement de conformation d'IL-1 β , ce qui permet à la protéine de passer la bicouche lipidique des phagophores autophagosomaux (Simonsen and Tooze 2009). Les protéines ESCRT Hrs et Tsg101 sont toutes les deux requises pour la sécrétion d'IL-1 β (Zhang et al. 2015). Cela peut être via leur capacité à promouvoir la formation de MVEs pouvant fusionner avec les autophagosomes pour former des amphisomes (Simonsen and Tooze 2009) qui peuvent ensuite fusionner avec la membrane plasmique pour relarguer leur contenu dans l'espace extracellulaire.

ESCRT et autophagie sont intimement liés (Simonsen and Tooze 2009). Dans ce contexte, les protéines d'autophagie ATG12 et ATG3 interagissent directement avec Alix et permettent une biogenèse exosomale dépendante d'Alix (Murrow, Malhotra, and Debnath 2015). Des études supplémentaires seront requises pour comprendre la régulation et la signficité de la sécrétion via CUPS ou l'autophagie dans les relargages extracellulaires contrôlés par ESCRT.

Ensembles, ces études suggèrent que les protéines ESCRT peuvent être considérées comme des régulateurs importants de la sécrétion cellulaire. Dans la partie suivante, j'illustrerai les différents rôles biologiques assignés aux fonctions sécrétoires d'ESCRT. Bien que de nombreuses études aient utilisées les protéines ESCRT comme des marqueurs exovésiculaires, je me focaliserai sur les données permettant de comprendre l'importance du relargage d'exovésicules de façon dépendante d'ESCRT.

I-3-f- Communication intercellulaire, exovésicules et machinerie ESCRT

Transport exovésiculaire de molécules de signalisation importantes pour le développement.

Un certain nombre d'études ont révélé que le transport de molécules de signalisation par des vésicules extracellulaires sont importantes à la fois pour la communication intercellulaire, mais également pour la communication inter-organismes (Beer and Wehman 2017, McGough and Vincent 2016). D'un intérêt tout particulier au cours du développement, les morphogènes entraînent des réponses dépendantes de leur concentration pour induire l'expression de gènes. Afin de contrôler le développement des tissus, les morphogènes

doivent souvent se déplacer sur de grandes distances. De façon surprenante, les morphogènes de la famille Wingless (Wg)/Wnt et Hedgehog sont sujet à des lipidations qui entravent leur libre diffusion dans le milieu extracellulaire hydrophilique (Briscoe and Therond 2013, Willert and Nusse 2012). La sécrétion de ces molécules nécessite donc leur isolement, et a été proposée comme faisant intervenir des particules de lipoprotéines (Panakova et al. 2005) ou de longues extensions filopodiales (Gradilla et al. 2014, Stanganello et al. 2015, Sanders, Llagostera, and Barna 2013). Additionnellement, un certain nombre d'études suggère que Wg/Wnt et Hh sont sécrétés sur des vésicules extracellulaires.

- *Transport exovésiculaire de Wingless.*

Wg chez la Drosophile et leur homologue vertébré Wnt peuvent être sécrétés sur des exosomes (Gross et al. 2012, Koles and Budnik 2012, Korkut et al. 2009, Beckett et al. 2013, Luga et al. 2012). Au niveau des jonctions neuro-musculaires (NMJ) de drosophile, le transport trans-synaptique de vésicules extracellulaires contenant Wg permet la coordination entre croissance synaptique et taille des muscles (Korkut et al. 2009). La présence de MVE au niveau des NMJ soutient une origine endosomale de ces vésicules, mais une analyse fonctionnelle montre que le relargage d'exovésicules se produit indépendamment d'ESCRT (Koles and Budnik 2012). L'importance de la sécrétion exosomale de Wg pour le développement du primordium d'aile reste débattue : deux études ont montré que les cellules de Drosophile sécrètent des exosomes qui peuvent stimuler la transduction du signal Wg, mais ont obtenu des résultats contradictoires sur l'implication d'une sécrétion exosomale dépendante d'ESCRT en condition physiologique (Gross et al. 2012, Beckett et al. 2013). La sécrétion exosomale de Wnt a de plus été montrée comme régulant la motilité des cellules de cancer du sein par l'activation de la voie PCP (Luga et al. 2012).

Au-delà de la sécrétion de ligands Wg/Wnt, la transduction du signal Wnt peut être interrompue par le relargage exovésiculaire de β -catenin, un processus qui requière des tetraspanines et des ceramides, mais pas ESCRT (Chairoungdua et al. 2010). La biogenèse de MVE de façon dépendante d'ESCRT a été suggérée comme étant essentielle à la transduction d'un signal Wnt (Taelman et al. 2010) et Wnt5b régule le recrutement d'ESCRT au cours de la cytokinèse (Fumoto et al. 2012). Des évidences indiscutables de l'importance d'exovésicules ESCRT-dépendantes dans la sécrétion de Wng/Wnt sont cependant toujours recherchées.

- *Transport et sécrétion d'Hedgehog*

Trois études indépendantes vont dans le sens d'une fonction d'ESCRT dans la sécrétion d'exovésicules Hh au niveau des ailes de drosophile, avec quelques différences dans les mécanismes cellulaires proposés. Matusek et al suggèrent que la sécrétion d'Hh est basée

sur le relargage d'ectosome de façon dépendant d'ESCRT (Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014) (Figure 11). D'une façon similaire au bourgeonnement viral à la surface des cellules, la sécrétion d'Hh requière ESCRT-I et -III, Alix et Vps4, mais pas ESCRT-II. De plus, une perte partielle de différents composants ESCRT permet de générer des conditions qui affectent la biogenèse des MVE de dégradation sans altérer la sécrétion d'Hh, ou altèrent la sécrétion d'Hh mais pas le trafic de MVE. Ces découvertes accréditent un relargage d'Hh de façon dépendante d'ESCRT mais indépendante de la biogenèse de MVE. Finalement, la perte de Vps4, qui est supposée inhiber la scission exovésiculaire dans les cas de biogenèse exosomale et ectosomale, emprisonne Hh au niveau de la surface externe de la membrane plasmique des cellules productrices d'Hh. La sécrétion exovésiculaire d'Hh est requise pour l'activation à longue-distance de ses cibles, mais est dispensable pour les cibles à courte distance (Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014).

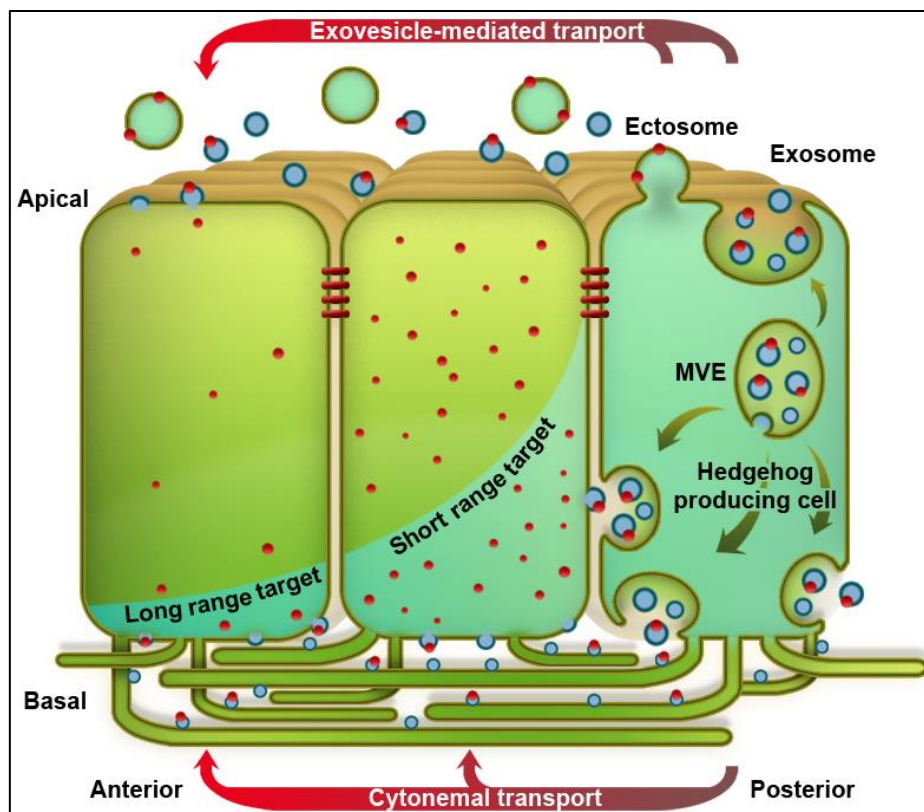


Figure 11 : La machinerie ESCRT promeut la sécrétion exovésiculaire d'Hedgehog. Dans les disques imaginaux d'ailes de drosophile, Hedgehog (en rouge) est transporté des cellules productrices au postérieur, jusqu'aux cellules réceptrices à l'antérieur, pour activer des gènes cibles à longue et courte distance. La sécrétion d'Hedgehog est réalisée par l'intermédiaire du complexe ESCRT, qui permet le relargage de vésicules extracellulaires. Les vésicules contenant Hh ont été proposées comme étant d'origine exo- et ectosomales, et se déplacent au niveau de l'espace luminal apical, ou sur des cytonèmes baso-latéraux. MVE : Multivesicular Endosome (Juan and Furthauer 2017).

Cette dernière conclusion est également présentée par Parchure et al, qui, par contre, supposent une origine exosomale à la sécrétion d'Hh de façon dépendante d'ESCRT

(Parchure et al. 2015) (Figure 11). Cette conclusion est basée sur la présence de Hh endocyté dans les MVEs, et sur l'observation du fait que de fortes perturbations du système endo-lysosomal résulte en une rétention intracellulaire d'Hh. De façon intéressante, cette étude montre aussi que l'oligomérisation d'Hh est requis pour la sécrétion exovésiculaire, ceci allant dans le sens d'un regroupement de cargo comme événement essentiel à l'incorporation dans des exovésicules (Vidal, Mangeat, and Hoekstra 1997, Muntasell, Berger, and Roche 2007, Fang et al. 2007).

Une troisième étude suggère que la sécrétion, de façon dépendante d'ESCRT, d'exovésicules contenant Hh, est permise par le transport d'exosomes sur des extensions cytonémales présentes à la surface basale du primordium d'aile (Gradilla et al. 2014) (Figure 11). Dans ce travail, la perturbation d'ESCRT, SNARE et TAT-5 (qui chez *C.Elegans* inhibe le relargage de d'exovésicules dépendants d'ESCRT (Wehman et al. 2011) altère l'induction à longue et courte distance de gènes cibles (Gradilla et al. 2014). Comment des exosomes sont chargés et transportés sur des cytonèmes reste cependant à établir. Ensembles, ces trois études établissent un lien solide entre ESCRT et transport d'Hh grâce à des exovésicules *in vivo* (Gradilla et al. 2014, Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014, Parchure et al. 2015). Elles illustrent également la difficulté mécanistique de disséquer le transport exovésiculaire avec les outils actuels.

L'importance des exovésicules dans le relargage d'Hh est également soulignée par des études sur la sécrétion de Sonic Hedgehog (Shh) dans des lignées de cellule humaines, et des cellules de notochorde de poulet. Bien que l'importance de la machinerie ESCRT ne soit pas étudiée dans ces travaux, il est révélé que Shh est sécrété sur deux types de vésicules exosomales qui diffèrent dans leur composition protéique. Alors que les deux types d'exovésicules peuvent activer des rapporteurs synthétiques de Shh, seules les exovésicules positives pour des intégrines peuvent entraîner la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris de façon dépendante de Shh (Vyas et al. 2014).

- *Signalisation Eph/Ephrin*

En contraste avec Wnt et Hg, le récepteur tyrosine kinase Eph et les ligands Ephrin ont été classiquement montrés comme impliqués dans une signalisation juxtacrine entre membrane de cellules adjacentes. Une des particularités de cette voie est le fait qu'elle implique une signalisation directe (du ligand au récepteur), mais également inverse (du récepteur au ligand). EphB2 interagit avec des protéines ESCRT qui permettent la sécrétion d'exovésicules, internalisées ensuite dans des neurones positifs pour Ephrin1, où elles entraînent une signalisation inverse (Gong et al. 2016). Comme il a précédemment été décrit pour le relargage d'exosomes à partir de neurones corticaux (Faure et al. 2006, Lachenal et al. 2011), la sécrétion d'exovésicules positifs pour EphB2 est dépendante de l'activité

neuronale. Cela suggère que des transporteurs vésiculaires dépendants d'ESCRT sont importants pour le remodelage neuronal.

Cette étude montre que le transport de molécules de signalisation sur des exovésicules trouble la distinction établie entre des molécules sécrétées agissant à distance, et des interactions à faible distance basées sur des contacts entre cellules.

- *Vésicules extracellulaires au cours de la morphogenèse*

En plus des molécules de signalisation impliquées dans la communication cellulaire, les exovésicules transportent des composants essentiels à la morphogenèse. Chez le nématode *C. Elegans*, des exosomes dérivés des MVE transportent des protéines de la famille de Hedgehog, requises pour la morphogenèse de la cuticule. Ce processus est régulé par le sous-complexe V0 de la protéine vacuolaire H⁺-ATPase, la petite GTPase Ral1, et des protéines ESCRT (Hyenne et al. 2015, Liegeois et al. 2006). La sécrétion excessive d'exovésicules dépendantes d'ESCRT dans un mutant pour la flippase *TAT-5* entraîne des défauts morphogénétiques et une létalité embryonnaire (Wehman et al. 2011). Ces phénotypes délétères mettent en lumière l'importance d'un contrôle strict de la formation d'exovésicules.

I-3-g- NVP et transport d'exovésicules dans le nœud de la souris

Le transport de molécules de signalisation dans le milieu extracellulaire apparaît donc comme crucial à de nombreux processus développementaux. Notamment les voies Wnt et Hedgehog chez la drosophile, utilisent ce moyen de communication entre cellules. Mais qu'en est-il de la signalisation se mettant en place au niveau de l'établissement des axes, et notamment du D/G ? Dans cette partie sera résumée la découverte, qui reste unique à ce jour, du transport latéralisé de morphogènes dans le nœud de la souris, empaquetés dans les NVP, mentionnés précédemment (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005) (Figure 3).

Dans le but de visualiser les conséquences directes d'une suppression de FGFR dans les cellules du nœud de souris, les auteurs ont procédé à un marquage des lipides de surface de l'embryon. En plus des mouvements des cils qui ont pu être perçus, il a été détecté des vésicules extracellulaires de diamètres allant de 0,3 à 5µm, transférées vers le côté gauche de nœud. Une analyse par microscopie électronique a révélé la présence de ces vésicules prêtes à être relarguées, adhérant à la surface du nœud.

Chaque NVP semble contenir de plus petites vésicules, entourées d'une membrane externe. Les NVP sont fréquemment associés à des protrusions cellulaires, qui pourraient être des microvillosités par l'absence de microtubules dans leur structure interne (Figure 11).

Le relargage des NVP semble être un processus actif prenant approximativement 10s. La direction initiale des NVP, qui émergent de toutes les régions du nœud, est aléatoire, et peut même aller parfois à l'encontre du flux. Leur relargage à partir des villosités les place au milieu du flux laminaire, plusieurs micromètres au-dessus de la surface ciliée, là où le flux est le plus important. Ainsi, les NVP ne sont pas heurtés par les cils rotatifs au cours de cette phase initiale. Au cours des 10 secondes suivantes, les NVP sont transportés du côté gauche du flux nodal, se cognent contre la surface ciliée, et se fragmentent. Au cours de la phase finale, les NVP sont absorbés à la surface des cellules du côté gauche. La fragmentation des NVP pourrait prévenir leur retour du côté droit, et faciliter le relargage de leur contenu actif. Une augmentation du volume de NVP semble précéder leur fragmentation, qui pourrait être lié à une élévation de la pression interne.

Un traitement avec un inhibiteur de FGFR supprime complètement le relargage des NVP et l'élévation de Ca^{2+} du côté gauche visualisée en condition normale, sans perturber le flux. Le relargage des NVP et l'élévation latéralisée de Ca^{2+} peut être sauvé par un traitement avec le fragment N-terminal de sonic hedgehog (Shh-N) ou l'acide rétinoïque. Cela suggère que le relargage de NVP est régulé par des morphogènes comme FGF, Shh-N et l'acide rétinoïque, et que les NVP portent un signal essentiel à l'élévation des niveaux de Ca^{2+} . En conséquence, la découverte des NVP fournit la première évidence expérimentale que des morphogènes peuvent être transportés par le flux nodal (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005).

I-3-h- Transport de vésicules dans la vésicule de Kupffer

Très récemment, l'hypothèse de transport latéralisé de matériel extracellulaire énoncé précédemment a été testée chez le poisson-zèbre (Ferreira et al. 2017). En effet, en combinant de l'imagerie *in vivo* avec une modélisation de la dynamique des fluides, les auteurs ont été capables de cartographier les caractéristiques biophysiques des cils de la KV. Cela leur a permis de tester de manière quantitative les limites physiques des mécanismes de détection du flux qui ont été présentés précédemment : la mécanosensation, et la chimiosensation.

Ils ont montré que le petit nombre de cils immotiles trouvé dans la KV n'était pas suffisant pour détecter de façon robuste la direction du flux, en considérant les grandes variations locales qu'il engendre. Les cils motiles pourraient peut-être ressentir leur propre mouvement, mais cette hypothèse réduit drastiquement l'influence que pourrait avoir le flux directionnel. Ainsi, ce mécanisme est incompatible avec les observations effectuées chez d'autres vertébrés qui ont montré que la latéralité peut être supprimée en augmentant la viscosité du milieu, ou inversée avec un flux artificiel (Nonaka et al. 2002, Schweickert et al. 2007). Ils

montrent qu'un mécanisme de gradient L/R impliquant de la chimiosensation est possible, et comprend la présence d'un flux directionnel autour de l'axe D/V, et la sécrétion de particules du côté antérieur. Ils estiment que les particules doivent présenter pour cela une taille d'au moins 2nm. Bien qu'ils ne fassent pas la lumière sur la nature de la molécule à la base de la détection du flux, ils proposent que le transport d'une molécule selon un gradient D/G permette une cassure de symétrie plus robuste qu'un mécanisme purement mécanique (Ferreira et al. 2017).

I-4- Diversité des mécanismes d'établissement de la latéralité

Une des questions fondamentales qui restent en suspens pour comprendre comment la forme du corps est établie au cours de l'évolution est celle de l'origine de l'asymétrie D/G. Y-a-t-il des caractéristiques conservées et comment l'établissement de l'asymétrie D/G a évolué chez les bilatériens ? Une des spécificités de l'asymétrie D/G, comme je l'ai mentionné précédemment, est le fait qu'elle doit être coordonnée selon les deux autres axes du corps (A/P et D/V), et est donc établie de façon relative comme un axe secondaire par rapport à eux. L'établissement en deux étapes de la forme du corps est particulièrement intéressant car elle suppose que l'asymétrie D/G dépend de mécanismes qui intègrent des informations de position en 2D. Afin d'étudier ces caractéristiques fondamentales, au cours des dernières années, différentes études utilisant différents modèles ont aidés à identifier des mécanismes uniques dans l'établissement de l'asymétrie D/G. Bien qu'une variété de mécanismes aient été découverts, des similarités fascinantes entre les phylums commencent à émerger. Je comparerai donc dans cette partie les différentes mises en place de l'asymétrie D/G, en me focalisant sur les deux branches des bilatériens, deutérostomes et protostomes à travers l'étude de différents organismes modèles.

I-4-a- Etablissement de la latéralité chez les vertébrés

Tous les deutérostomes vertébrés ne présentent pas de flux, mis en mouvement dans un organisateur D/G pour permettre la cassure de symétrie. Chez le poulet par exemple, la structure homologue, le nœud de hensen, diffère de celui de la souris. Le nœud de la souris ou du lapin sont formés de cellules mésodermales dont les cils motiles produisent un flux (Okada et al. 2005, Feistel and Blum 2006), tandis que chez le poulet, les cellules du nœud de hensen sont des cellules endodermales, qui présentent des cils plus courts et tous immotiles (Stephen et al. 2014, Chinnici et al. 2014). De façon intéressante, le nœud du poulet devient asymétrique en lui-même et présente une inclinaison vers la gauche à la suite de réarrangements cellulaires, de migrations et d'interactions avec les tissus environnants (Cui, Little, and Rongish 2009, Gros et al. 2009) (Figure 12). Cette observation ne semble pas être une particularité du poulet ou des vertébrés non mammaliens, comme cela a été reporté également chez l'embryon de cochon (Gros et al. 2009).

Dans ce cas, il a été montré que ces migrations cellulaires, qui précèdent l'expression asymétrique de Nodal de plusieurs heures, sont contrôlées en amont par l'activité de pompes ioniques H^+/K^+ -ATPase (Gros et al. 2009).

Identifiés initialement à travers un crible pharmacologique pour des effets de drogues sur la latéralisation, des pompes et canaux ioniques comme la H^+/K^+ -ATPase, la H^+ -V-ATPase ou

la Na⁺/K⁺-ATPase, ont été montrées pour être localisées et avoir des activités asymétriques à des stades antérieurs au nœud, et aussi précocement que les premiers clivages chez différentes espèces de vertébrés (Levin et al. 2002, Adams et al. 2006, Aw et al. 2008) (Figure 12). L'expression asymétrique de ces pompes et canaux d'un côté de l'embryon est supposée être à l'origine d'un flux localisé d'ions entraînant des différences de pH et une différence de voltage transmembranaire entre la gauche et la droite de l'embryon. Ces gradients de pH ou électriques sont présumés orienter la latéralisation ou permettre une concentration locale de petites molécules de signalisation. De façon intéressante, certaines données indiquent que la brisure initiale de symétrie de ces pompes ioniques durant le développement précoce dépend de l'organisation du cytosquelette (Adams et al. 2006). Ainsi, la brisure de symétrie n'implique pas forcément un flux extracellulaire asymétrique. De plus, des brisures de symétries semblent pouvoir s'effectuer dès les clivages initiaux au cours du développement, même en présence d'un organisateur cilié en aval. Finalement, ces brisures de symétrie précoces semblent impliquer des mouvements ioniques, et l'activité du cytosquelette d'actine. Que se passe-t-il quand on s'éloigne d'un point de vue évolutif des vertébrés ?

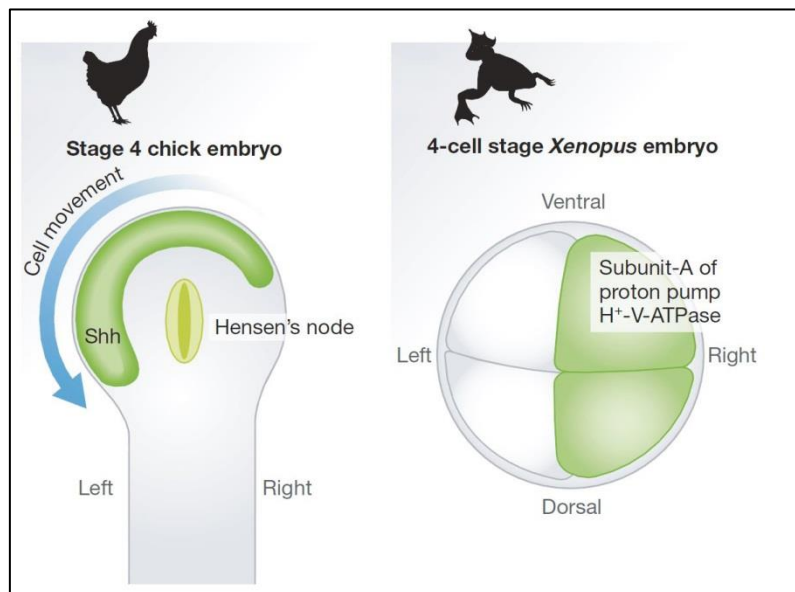


Figure 12 : Mise en place de l'asymétrie D/G chez d'autres modèles vertébrés. Schéma de la ligne primitive et du nœud de Hensen d'un embryon de poulet au stade 4. Le mouvement de cellules de la droite vers la gauche induit un remodelage latéralisé du nœud, et permet l'expression asymétrique de certains gènes. Pour le Xénope, schéma de l'embryon au stade 4 cellules montrant un enrichissement du côté droit de la sous-unité A de la pompe à proton H⁺-V-ATPase, dont l'activité est nécessaire à la latéralité de l'individu. Cette asymétrie précoce est dépendante de l'actine, mais pas des microtubules (Coutelis et al. 2014).

I-4-b- Etablissement de la latéralité chez les deutérostomes non-vertébrés

De nombreux acteurs et mécanismes retrouvés dans la détermination de l'asymétrie D/G chez les vertébrés sont conservés chez les deutérostomes non-vertébrés sans structure s'apparentant au nœud, comme chez les ascidies *Ciona intestinalis* et *Halocynthia roretzi* ou l'échinoderme *Paracentrotus lividus*. Les larves de *C.intestinalis* possèdent deux zones pigmentées sensorielles asymétriques près du cerveau et de l'intestin (Shimeld and Levin 2006). Similairement aux vertébrés mentionnés précédemment, la signalisation nodal est détectée du côté gauche et entraîne l'expression de l'homologue de Pitx2, qui permet en retour une morphogenèse latéralisée (Shimeld and Levin 2006).

L'activité H⁺/K⁺-ATPase apparaît également comme active avant l'expression asymétrique de nodal et sa perturbation affecte l'expression du côté gauche de l'homologue de Pitx2 (Shimeld and Levin 2006). Chez *H.roretzi*, la signalisation Nodal est aussi détectée du côté gauche de l'embryon. De façon originale, l'expression de nodal dépend de la localisation d'une zone de contact entre l'épiderme de l'embryon et la membrane vitelline, qui est permise par la rotation de l'embryon de façon dépendante des cils (Nishide et al. 2012).

Ces observations, qui lient une fois de plus nodal et la fonction ciliaire, suggèrent que les cils pourraient agir de plus d'une façon sur l'asymétrie D/G. Finalement, chez la larve de *P.lividus* au stade pluteus, les rudiments adultes (les tissus progéniteurs du futur individu) se forment d'un côté seulement des tissus du mésoderme (Raff and Snoke Smith 2009, Molina et al. 2013). Ici, les activités Nodal et H⁺/K⁺ ATPase sont aussi impliqués dans le D/G. Mais il y également un retournement de situation, Nodal n'est pas un marqueur ou inducteur du côté gauche, mais est exprimé du côté droit, où il empêche le développement des rudiments adultes au profit du côté gauche (Molina et al. 2013, Duboc et al. 2005).

I-4-c- Etablissement de la latéralité chez les protostomes

Les modèles précédents ont été développés chez les deutérostomes, mais des données complémentaires chez les protostomes sont également tout à fait importantes pour comprendre les bases de l'asymétrie D/G d'un point de vue morphologique et fonctionnel (Speder et al. 2007, Frasnelli, Iakovlev, and Reznikova 2012). Particulièrement, l'étude de trois organismes modèles, l'escargot *Lymnaea genus*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et la mouche *Drosophila melanogaster*, ont conduit à des avancées majeures dans notre compréhension de l'asymétrie D/G.

Chez l'escargot, les deux homologues de Nodal et Pitx sont exprimés de façon asymétrique au cours de l'embryogenèse (Figure 13). Leur expression est localisée du côté droit pour les

escargots dextraux (présentant une symétrie normale), et du côté gauche pour les escargots sinistres (présentant une symétrie inversée). Un traitement avec un inhibiteur chimique des TGF- β entraîne l'apparition d'individus sans enroulement de la coquille, ce qui suggère une perte d'asymétrie D/G (Grande and Patel 2009).

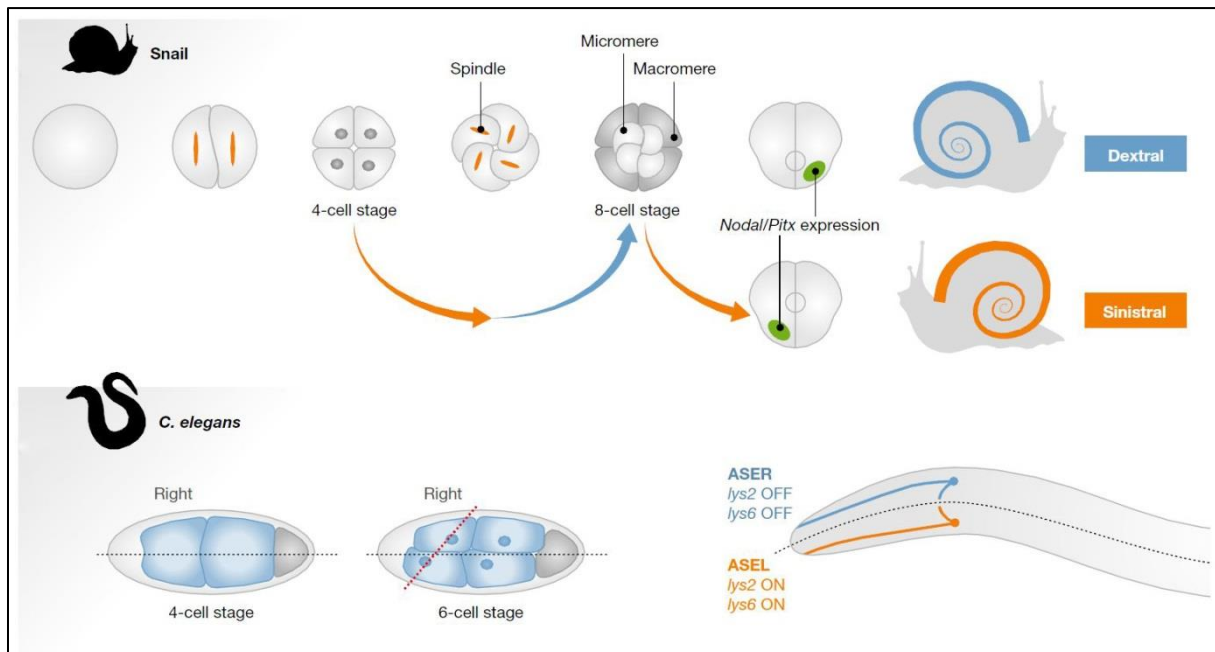


Figure 13 : Mise en place de l'asymétrie D/G chez les protostomes. Chez les escargots, l'asymétrie D/G se manifeste par l'enroulement de la coquille. La direction de l'enroulement dépend de la zone de clivage des deux premières cellules. L'agencement spatial des blastomères entraîne une orientation en spirale de l'axe. Une inversion forcée de cette orientation à 4-8 cellules entraîne une inversion permanente de l'axe D/G, avec une expression inversée de la paire *Nodal/Pitx*. Chez *C. Elegans*, le premier marqueur asymétrique est le placement des blastomères au cours de la transition 4-6 cellules. La cellule antérieure et la cellule postérieure se tournent légèrement de sorte que l'axe mitotique se positionne de façon biaisée vers la droite. Cette asymétrie précoce se propage ensuite au cours du développement. Un des exemples est l'apparition d'une asymétrie fonctionnelle des neurones ASEL/ASER, contrôlés par l'expression spécifique des gènes *lys2* et *lys6* (Coutelis et al. 2014).

L'évènement exact qui entraîne la cassure de symétrie est inconnu, mais il semble que cela se produise dès 8 cellules, où l'agencement des cellules apparaît comme chiral (Figure 13). De façon intéressante, un traitement à 4 cellules avec du nocodazole, qui entraîne une dépolymérisation des microtubules, n'affecte pas l'asymétrie D/G, tandis qu'un traitement à la latrunculine A ou B qui affecte la dépolymérisation de l'actine à 4 cellules provoque des défauts de latéralité, ce qui souligne l'importance du cytosquelette d'actine dans ces processus (Shibazaki, Shimizu, and Kuroda 2004). Malgré ces découvertes, les mécanismes moléculaires régulant la chiralité de la coquille sont longtemps restés un mystère. Des expériences génétiques ont montré que la chiralité dépend d'un seul gène (Liu et al. 2013, Freeman and Lundelius 1982). De plus, l'injection de cytoplasme d'œufs dextraux dans des œufs sinistres a été montrée comme suffisante pour induire une dextralité normale, tandis

que le contraire n'a pas eu d'effets, indiquant que l'allèle dextral est dominant (Freeman and Lundelius 1982). Finalement, très récemment, le gène responsable de la dextralité chez l'escargot semble avoir été identifié, avec la mise en évidence de la Formine, une protéine importante pour la polymérisation de l'actine (Davison et al. 2016).

Chez le *C.Elegans*, un positionnement dextral des blastomères se produit à la transition 4-6 cellules. Ce processus a été largement utilisé pour l'étude de l'asymétrie D/G (Pohl 2011, Hutter and Schnabel 1995a, b). Au cours de la transition 4-6 cellules, les blastomères dorsaux antérieurs et postérieurs se tournent légèrement vers la droite, orientant par la même occasion leur fuseau mitotique vers la droite (Figure 13). L'embryon au stade une cellule est soumis à une rotation de 120° toujours dans la même direction avant la première mitose. Ce processus est dépendant de l'organisation du cytosquelette d'actine, comme le suggère la déplétion du complexe WAVE-Arp2/3 ou de l'homologue de la formine *Cyk-1*, qui altèrent la rotation de l'embryon, révélant l'existence d'un mécanisme de chiralité intrinsèque basé sur l'actine (Pohl and Bao 2010). Cette chiralité initiale se transmet aux microtubules astraux du fuseau, grâce à la protéine G codée par le gène *Gpa-16* (Figure 13). La perte de *Gpa-16* entraîne une latéralisation aléatoire du blastomère à 6 cellules (Bergmann et al. 2003). La voie de signalisation PCP a été suggérée comme jouant un rôle important sur l'organisation du cytosquelette, et ainsi permettre le contrôle de l'orientation des fuseaux du blastomère (Cabello et al. 2010, Bischoff and Schnabel 2006).

L'établissement de la latéralité chez la mouche sera traité dans la partie suivante, car elle requière un niveau de développement plus précis. En effet, mon deuxième projet de thèse a été réalisé en collaboration avec une équipe drosophile, dirigée par Stéphane Noselli. La molécule que j'étudie pour analyser la conservation des mécanismes de mise en place de la latéralité, Myosin1d (*Myo1D*), en me servant de mon modèle vertébré le poisson-zèbre, a été initialement découverte chez la drosophile, par nos collaborateurs (Speder, Adam, and Noselli 2006). La mouche présente l'originalité d'arborer différents organes asymétriques apparaissant à des phases du développement diverses et requérant plusieurs organisateurs D/G. L'asymétrie de tous ces organes apparaît toutefois comme étant contrôlée par un seul gène, *myo1D*. La fonction de *myo1D*, la façon dont il peut induire une chiralité des tissus et le paradigme de sa conservation au cours de l'évolution seront analysés dans la prochaine partie.

I-5- Développement de l'asymétrie droite/gauche chez la drosophile et rôle de l'actomyosine

Dans tous les modèles revus précédemment, le plan de symétrie D/G s'établit séquentiellement à partir d'un évènement initial de cassure de la symétrie. De façon originale, chez la drosophile, les différents organes D/G semblent être capables de se latéraliser individuellement, grâce à la présence de plusieurs organisateurs D/G (Coutelis et al. 2013, Speder, Adam, and Noselli 2006, Gonzalez-Morales et al. 2015). De plus, au cours de la métamorphose, la plupart des organes latéralisés se renouvellent (Geminard et al. 2014). Chez la drosophile, la majorité des études sur l'asymétrie D/G ont été effectuées sur la latéralisation de deux organes à trois temps de développement différent. Premièrement, la torsion dextrale de l'intestin postérieur embryonnaire, ainsi qu'adulte, et deuxièmement la rotation dextrale à 360° du terminalia des mâles et la torsion associée du spermiducte au cours de la métamorphose (Coutelis et al. 2014). La dextralité d'un organe étant son orientation latéralisée majoritaire dans la population sauvage, s'opposant à la sinistralité. L'orientation dextrale de ces organes, et celle des autres organes asymétriques de la drosophile dépend de l'activité d'un seul gène, *myo1D* (Figure 14). De façon intrigante, quand l'activité de *myo1D* est absente, l'asymétrie des drosophiles est inversée, ce qui révèle également la présence d'une voie sinistrale, dont je discuterai plus en détail dans les parties suivantes (Speder, Adam, and Noselli 2006, Hozumi et al. 2006).

Dans le cadre de mon deuxième projet de thèse, je montre ici que la perte de *myo1D* chez le poisson-zèbre entraîne des défauts de symétrie de tous les organes latéralisés. De plus, il semble faire partie d'un réseau de myosines non-conventionnelles incluant *myo1G* et *myo1Cb* importants pour l'établissement de la latéralité. *myo1D* est essentiel à l'acquisition d'un flux fonctionnel dans l'organisateur D/G, et apparait comme interagissant fonctionnellement avec le gène PCP *vangl2* dans ce processus. Je présenterai donc ici la façon dont *myo1D* exerce son rôle dans l'asymétrie D/G chez la drosophile. Et plus généralement ensuite, la façon dont le cytosquelette d'actomyosine peut initier une chiralité des tissus par le biais de sa chiralité intrinsèque, et comment la signalisation PCP permet de transmettre ces biais à l'organisme.

I-5-a- Structure et mode d'action de Myo1D dans la latéralité

D'un point de vue moléculaire, le déterminant dextral *myo1D* est une myosine non-conventionnelle de type I, une protéine moteur monomérique basée sur l'actine, très conservé au cours de l'évolution (Speder, Adam, and Noselli 2006, Hozumi et al. 2006, Speder and Noselli 2007). Les myosines de type I se composent en N-terminal d'un domaine

moteur couplé à une queue C-terminale TH1 (Tail Homology 1) via un pont d'hélices alpha (Krendel and Mooseker 2005, Nambiar, McConnell, and Tyska 2010). Le domaine moteur se lie à l'actine et hydrolyse de l'ATP. Le pont d'hélices contient un certain nombre de domaines IQ et se lie à la chaîne légère agissant comme un levier, en transmettant les changements conformationnels qui se produisent dans le domaine moteur après l'hydrolyse de l'ATP (Barylko, Binns, and Albanesi 2000, Greenberg and Ostap 2013). Finalement, le domaine TH1 est supposé interagir avec le fret et se lier aux phospholipides membranaires à travers son domaine Pleckstrin homology, une région chargée positivement qui se lie aux lipides (Hokanson et al. 2006).

De façon intéressante, l'activité de *myo1D* est requise durant un laps de temps court pour introduire un biais dextral (Speder, Adam, and Noselli 2006). A ce jour, le mécanisme moléculaire d'action exact de *myo1D* demeure inconnu, mais le domaine de tête de liaison à l'actine semble central pour l'asymétrie D/G (Hozumi et al. 2008). De plus, dans les cellules de l'organisateur D/G, l'activité de *myo1D* requiert les composants des jonctions adhérentes *β-catenine* et *E-cadherine* ainsi qu'un cytosquelette d'actine cortical bien organisé pour induire un développement dextral (Speder, Adam, and Noselli 2006, Hozumi et al. 2006, Hozumi et al. 2008, Taniguchi et al. 2011, Petzoldt et al. 2012).

Il a été montré que *myo1D* induisait une torsion des membranes initiée à partir de l'organisateur D/G, par l'intermédiaire de l'E-cadherine, car les membranes des mutants pour ce gène ne se courbent pas (Taniguchi et al. 2011) (Figure 14). Ces données suggèrent que la morphogénèse D/G pourrait s'initier à partir de tensions membranaires asymétriques générées par le complexe Myo1D/E-Cadherine. De façon concordante, des simulations informatiques ont montré qu'une faible courbure des membranes dans chacune des cellules était suffisante pour induire une torsion dextrale de tout l'intestin postérieur embryonnaire (Taniguchi et al. 2011).

A l'inverse de la perte d'E-cadherine ou *β-catenine* pour lesquels une absence d'orientation est observée, les membranes des cellules de l'intestin postérieur embryonnaire se courbent toujours en l'absence de *myo1D*, mais cette fois en direction opposée (Taniguchi et al. 2011, Petzoldt et al. 2012). Ces observations suggèrent que le facteur sinistral, dont l'activité n'apparaît qu'en l'absence de *myo1D*, est aussi capable d'induire un biais dans l'orientation des membranes cellulaires.

De façon notable, une autre myosine non-conventionnelle de type 1, *myo1C*, antagonise la fonction de *myo1D*. La surexpression de *myo1C* entraîne les mêmes phénotypes que la perte de *myo1D*, avec une sinistralité des organes asymétriques (Hozumi et al. 2006, Petzoldt et al. 2012).

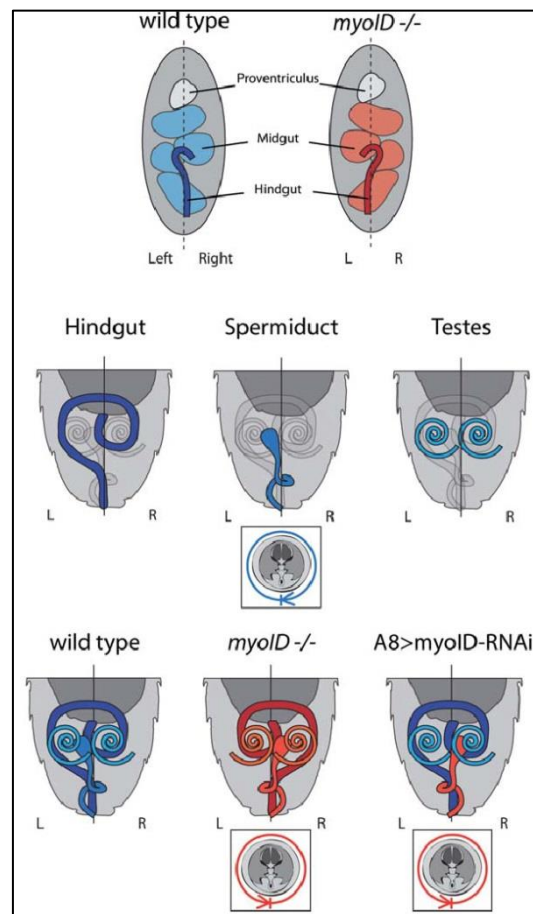


Figure 14 : La perte de fonction de *myo1D* chez la *Drosophile* entraîne une inversion de la latéralité. Schéma d'une vue dorsale d'un embryon de drosophile. Chez l'embryon sauvage, les trois parties de l'intestin embryonnaire, le proventricule, l'intestin médian, et l'intestin postérieur sont orientés vers la droite. Chez les mutants *myo1D*, les intestins médians et postérieurs sont inversés, et sont orientés vers la gauche, tandis que le proventricule conserve sa position. Chez les drosophiles adultes, l'intestin postérieur, le spermiducte et son association avec le génitalia, et les testicules sont latéralisés. Les mutants *myo1D* présentent une symétrie inverse pour tous ces organes, et sa déplétion spécifiquement dans l'organisateur A8 du terminalia entraîne seulement des défauts D/G dans cette région (Geminard et al. 2014).

I-5-b- Contrôle de l'activité de *myo1D* au cours du développement

En utilisant des outils génétiques de contrôle d'expression temporel et spatial, il a été montré que l'établissement du D/G de l'intestin postérieur embryonnaire et du terminalia étaient indépendants et se produisaient à des temps de développement différents (Speder, Adam, and Noselli 2006, Hozumi et al. 2006, Hozumi et al. 2008). Des analyses plus poussées de l'expression de *Myo1D* ont conduits à des observations surprenantes. En effet, *myo1D* est exprimé dans deux rangées distinctes de cellules au sein de l'organisateur D/G contrôlant la rotation du terminalia, (Speder, Adam, and Noselli 2006). De façon intéressante, ces deux domaines d'expression de *myo1D* correspondent à deux anneaux indépendants contribuant à la rotation à 360° du terminalia. La perte sélective de l'activité *myo1D* dans l'un, l'autre ou

les deux domaines montre que chacun des anneaux contribue à une rotation à 180°, et indique qu'ils se comportent comme deux organisateurs D/G génétiquement indépendants. En conséquence, quand l'activité de Myo1D est présente, les anneaux entrent en rotation dextrale de 180° et en rotation sinistrale de 180° quand l'activité Myo1D est absente. Ces données ouvrent des perspectives évolutives qui pourraient expliquer la diversité observée dans la rotation du terminalia chez les diptères, à travers l'apparition ou la duplication d'unité D/G de 180° (Suzanne et al. 2010).

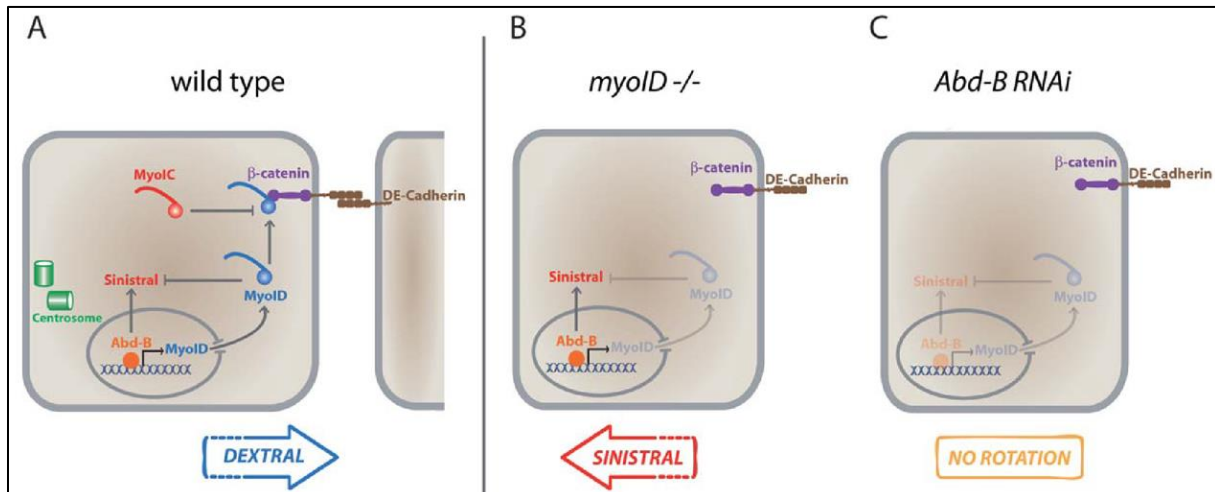


Figure 15 : Résumé des interactions moléculaires et génétiques prenant place dans les cellules de l'organisateur D/G. La protéine Abd-B appartenant à la famille des facteurs de transcription Hox active l'expression de *myo1D* dans les cellules de l'organisateur D/G. Myo1D se localise aux jonctions adhérentes à la suite de son interaction avec β -catenin et E-Cadherin. Cette localisation de Myo1D est essentielle à la détermination d'une asymétrie dextrale. La surexpression de *myo1C* empêche la localisation de Myo1D au niveau des jonctions adhérentes et antagonise sa fonction, mimant le phénotype de perte de *myo1D*. Les cellules adoptent une forme et une position des centrosomes orientée asymétrique. Chez les mutants *myo1D*, une asymétrie sinistrale récessive entraîne une inversion de la latéralité. Dans le cas de la perte de fonction *Abd-B*, aucune des voies sinistral et dextral ne sont actives, ce qui résulte en une absence de rotation (Geminard et al. 2014).

Dans cet exemple, Myo1D agit directement de façon autonome au niveau de l'organisateur initiateur de la rotation. Néanmoins, il a été montré récemment au niveau de l'intestin postérieur qu'il peut également présenter des modes d'actions alternatifs : il est requis dans ce cas au niveau d'un tissu qui participe de façon non autonome à l'acquisition de la latéralité par l'intermédiaire de la signalisation PCP (Gonzalez-Morales et al. 2015). Ce deuxième exemple sera traité plus en détail dans la partie suivante.

Le facteur de transcription Hox Abdominal-B (*Abd-B*) a été identifié en amont de la détermination de l'asymétrie D/G chez la drosophile. *Abd-B* et d'autres gènes Hox semblent être la clef de l'établissement d'une identité A/P (Maeda and Karch 2009), mais cette nouvelle fonction dans le D/G semble en être indépendante (Figure 15). Suite à la perte de l'activité de *Abd-B* dans l'intestin postérieur embryonnaire ou l'organisateur D/G du terminalia chez le mâle, une perte de l'expression de *myo1D* est observée (Coutelis et al. 2013). De

façon remarquable, une restauration de l'expression de *myo1D* est suffisante au sauvetage du phénotype, ce qui indique qu'*Abd-B* contrôle son expression. De plus, la déplétion de *Abd-B* dans un mutant *myo1D*, et donc sinistral, entraîne un développement symétrique, signifiant qu'une voie sinistrale est aussi sous le contrôle d'*Abd-B* (Coutelis et al. 2013) (Figure 15). Ces données suggèrent que des facteurs importants pour l'établissement du plan D/G pourraient également être capables de lire l'axe A/P.

I-5-c- Myo1D et signalisation PCP

Comme je l'ai mentionné précédemment, la polarité cellulaire planaire (PCP) est un processus de coordination des tissus dans un plan (Gray, Roszko, and Solnica-Krezel 2011, Wallingford 2012). Il se compose de deux voies principales : la polarité planaire cœur, ainsi que la globale.

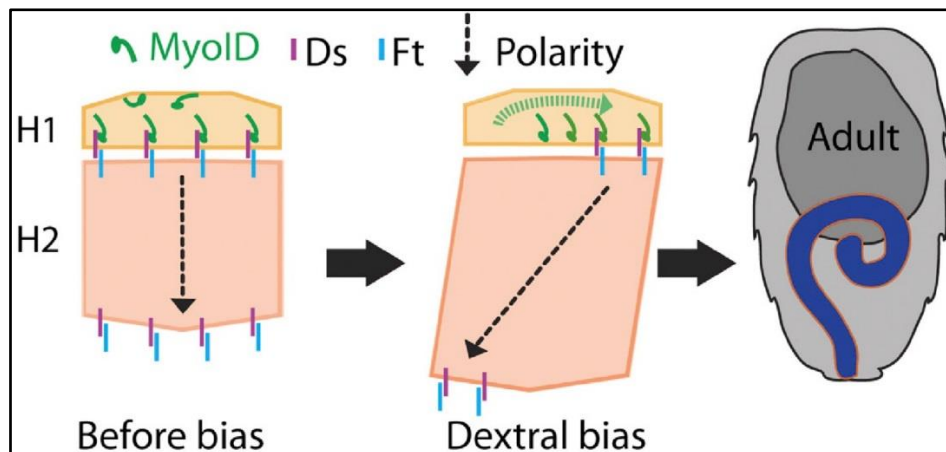


Figure 16 : Modèle récapitulant l'interaction entre Myo1D et Dachsous dans l'organisateur D/G H1. Myo1D induit un biais D/G sur la protéine Dachsous dans les cellules H1 (représenté par une localisation de Dachsous sur la droite). Le biais D/G est ensuite transféré aux cellules H2 par l'interaction Fat/Dachsous au niveau de la jonction H1/H2. A 10h, les cellules H2 se polarisent le long du plan D/G, initiant une morphogenèse de l'intestin postérieur et permettant son enroulement à 50h (Gonzalez-Morales et al. 2015).

Les deux systèmes reposent sur des interactions avec des protéines extracellulaires, et des rétrocontrôles pour permettre une polarisation des tissus (Axelrod 2009, Goodrich and Strutt 2011, Peng and Axelrod 2012). Aucune étude n'avait montré de liens entre le système global et l'asymétrie D/G jusqu'à récemment. Dans le disque imaginal d'intestin postérieur chez la drosophile, *myo1D* est exprimé spécifiquement dans un court segment, nommé H1, qui représente l'organisateur D/G pour cet organe. Myo1D interagit physiquement avec le domaine intracellulaire de Ds, appartenant à la PCP globale pour polariser dextralement les cellules du domaine H2, adjacent au H1, correspondant à des cellules précurseur de l'intestin postérieur (Figure 16). La polarisation est inversée (sinistrale) quand l'on perd

Myo1D, tandis qu'elle est absente quand Ds est spécifiquement retiré du domaine H1. De plus, *myo1D* et *Ds* interagissent génétiquement pour polariser les cellules H2. Ainsi, Ds est essentiel pour transmettre une information D/G dépendante de Myo1D aux cellules précurseurs de l'intestin postérieur voisines. Finalement, la polarité D/G à l'intérieur des cellules précurseur H2 semble dépendre à la fois de la PCP globale et cœur. Cela révèle un mécanisme permettant la transmission, de façon non cellule-autonome, de l'information de cassure de symétrie à partir d'un organisateur D/G aux organes précurseurs essentiels à la morphogenèse D/G (Gonzalez-Morales et al. 2015) (Figure 16).

L'intervention de la voie de signalisation PCP dans l'établissement de l'asymétrie D/G, avec l'implication du cytosquelette d'actomyosine semble ainsi être une caractéristique commune aux protostomes et deutérostomes. Dans le cas de la drosophile, la voie PCP est essentielle à la transmission d'un biais dextral, qui pourrait être fourni par l'actomyosine, à l'ensemble d'un tissu, l'intestin postérieur. Mais comment l'actomyosine peut-elle être en mesure de fournir un biais dextral, et comment cela peut-il être régulé au cours du développement ?

I-5-d- Actomyosine et chiralité des tissus

Dans de nombreux organismes, la symétrie D/G paraît être brisée au cours de processus chiraux faisant souvent intervenir le cytosquelette d'actine et/ou la myosine. Un objet ou un système est appelé chiral s'il constitue l'image miroir d'un autre objet ou système avec lequel il ne se confond pas. Un objet non chiral est dit achiral s'il est isomorphe à son miroir et partage avec lui les mêmes propriétés géométriques.

Ainsi, la mise en place de mouvements cellulaires chiraux dirigés par l'actine au cours de l'embryogenèse précoce guide la brisure de symétrie D/G chez de nombreux organismes.

Les tissus également présentent des asymétries chirales qui dépendent du cytosquelette d'actomyosine. De cette façon il a été révélé que la torsion chirale du cœur de poisson-zèbre était maintenue *ex vivo* en culture d'explants cardiaques et une diminution de l'activité actomyosine abolit ce comportement chiral (Noel et al. 2013). Il reste cependant à déterminer si l'actine ou l'actomyosine jouent un rôle direct dans la mise en place d'organes, et si cette fonction est conservée au cours de l'évolution. Dans ce contexte, le mutant *myo1D* représente une étape majeure à la compréhension des mécanismes gouvernant l'acquisition d'une asymétrie. De façon intéressante, il a été suggéré qu'une chiralité à l'échelle des tissus peut émerger d'une forme chirale et d'une polarité chirale de cellules individuelles (Taniguchi et al. 2011, Sato, Hiraiwa, and Shibata 2015, Gonzalez-Morales et al. 2015). Des comportements chiraux sont aussi observés dans des cultures de cellules à confluence (Chen et al. 2012, Wan et al. 2013, Segerer et al. 2015). Il a été montré que de nombreux types cellulaires, quand ils sont cultivés sur un milieu présentant des aspérités circulaires,

s'alignent soit de façon horaire (Figure 17), ou antihoraire. Lorsqu'ils sont exposés à des drogues interférant avec l'actine (Latrunculine A, Cytochalsin D, Jasplakinolide), les cellules qui présentent un alignement antihoraire tendent à renverser leur chiralité (Wan et al. 2013). Dans une autre étude (Chen et al. 2012), il a été montré que des cellules de muscles lisses vasculaires, lorsqu'elles sont poussées à confluence sur des aspérités en rayures s'alignaient de manière chirale, et que cela pouvait être aboli par des drogues ciblant les myosines non-musculaires de type II ou la signalisation Rho (Figure 17). Ces découvertes suggèrent que la chiralité à l'échelle des tissus émerge de l'activité de l'actomyosine dans des cellules individuelles interagissant avec les limites physiques imposées par les tissus environnants *in vivo*, ou par certaines aspérités *in vitro*.

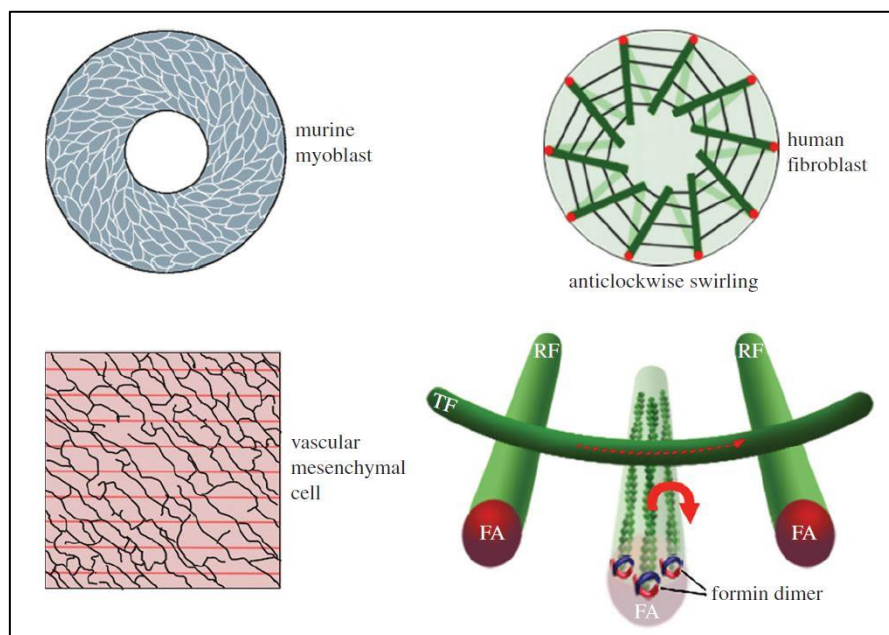


Figure 17 : Structures chirales et torsion en culture de cellules de mammifères. A gauche : culture de myoblastes murins et cellules mésenchymateuses vasculaires présentant une chiralité quand on les pousse sur des aspérités circulaires ou en rayures. A droite : fibroblastes humains déposés sur des aspérités présentant une chiralité antihoraire. Les fibres d'actines, initialement positionnées de façon radiale, se courbent légèrement vers la droite. La rotation horaire des filaments d'actine en fibres radiales générées par la formine est supposée entraîner la torsion vers la droite (Inaki, Liu, and Matsuno 2016).

I-5-e- Chiralité à l'échelle cellulaire

Les cellules individuelles ont déjà été étudiées pour présenter des asymétries chirales, qui dépendent de l'activité de l'actomyosine (Tamada et al. 2010, Tee et al. 2015, Hagmann 1993, Yamanaka and Kondo 2015). Une étude récente a montré que des fibroblastes poussant sur des aspérités présentant une surface ronde arboraient ensuite des réarrangements chiraux (Tee et al. 2015). Quand les fibroblastes se fixent sur ces aspérités, les cellules présentent des assemblages du cytosquelette d'actine chiraux avec des boucles

antihoraires, qui semblent être dépendantes d'une protéine de réticulation des filaments d'actine, l' α -Actinine. Les auteurs suggèrent que le comportement chiral est entraîné par des mouvements de rotation permis par la polymérisation de l'actine sous l'action de la Formine dans les zones d'adhésion focales périphériques (Figure 17). Finalement, une chiralité des cellules individuelles a également été observée dans le zygote de *C.Elegans* (Naganathan et al. 2014, Schonegg, Hyman, and Wood 2014). Au cours de la polarisation antéro-postérieure, un déplacement rotatoire de l'actomyosine peut être observé au niveau des cellules. De la même façon que pour la rotation à 4-6 cellules, l'accroissement de l'activité de l'actomyosine pourrait amplifier la chiralité. Ensembles, ces découvertes suggèrent que les dynamiques d'actomyosine intracellulaires pourraient entraîner des asymétries chirales de l'organisme, des tissus et des cellules.

I-5-f- Génération d'une chiralité à l'échelle moléculaire dans le cytosquelette d'actine

Les filaments d'actine sont des hélices polarisées pointant dans la même direction, vers une extrémité appelée (-), l'autre extrémité étant nommée (+) (Moore, Huxley, and DeRosier 1970). Leur chiralité intrinsèque est accentuée par la transduction d'une torsion à l'échelle moléculaire générée au cours de leur polymérisation, quand ils interagissent avec des molécules motrices, et quand ils se dépolymérisent. Des expériences *in vitro* ont montré que, quand on les immobilise sur une surface en verre, les Formines forcent les filaments d'actines à un mouvement de rotation (Mizuno et al. 2011) (Figure 18).

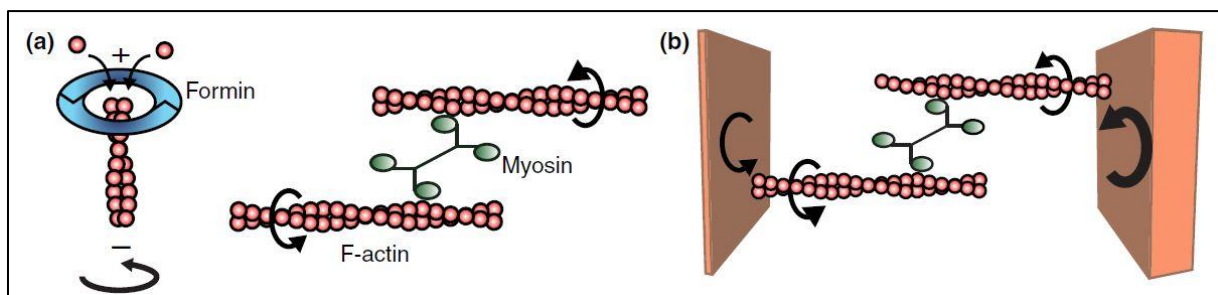


Figure 18 : Génération de torsion par le cytosquelette d'actine. La polymérisation de l'actine par des dimères de Formine résulte en une rotation du filament d'actine. Les filaments de myosine peuvent également générer des torsions, par exemple en tirant sur deux filaments d'actine orientés de façon opposée. Ainsi, un couple de filaments d'actines en contact avec des surfaces inégales comme le cytoplasme et la membrane, peut générer des torsions sous l'action de la myosine (Naganathan et al. 2016).

Des événements de torsion moléculaire prennent également forme suite à des interactions chirales entre protéines moteurs myosines, et filaments d'actines (Ali et al. 2002, Sase et al. 1997, Beausang et al. 2008, Pyrpassopoulos et al. 2012, Vilfan 2009, Nishizaka et al. 1993, Ali et al. 2004, Komori, Iwane, and Yanagida 2007). De plus, la myosine génère une tension

dans le réseau, qui entraîne la génération d'une torsion (De La Cruz and Sept 2010, Gore et al. 2006). Finalement, il a également été décrit que la protéine de dépolymérisation de l'actine Cofiline, quand elle se lie à des filaments d'actines modifie localement la boucle de l'hélice, ce qui pourrait générer des torsions (McGough et al. 1997, Ngo et al. 2015).

I-5-g- Génération d'une chiralité à une plus grande échelle

Plusieurs études obtenues grâce à des observations de myosines de type 1 et de la dynamique de l'actine sont favorables à l'idée que l'asymétrie D/G peut apparaitre de novo à partir de composants cellulaires basiques (Pyrpassopoulos et al. 2012). Les myosines de type 1, à laquelle Myo1D drosophile appartient, sont des membres de la superfamille de myosine à moteur basé sur l'actine, et sont trouvés dans la plupart des cellules eucaryotes (Kim and Flavell 2008, Richards and Cavalier-Smith 2005). Chez la souris, 8 types de myosin1 (a-h) sont trouvées, tandis qu'il n'y en a que deux chez la drosophile (myosin 1D et 1C) (Berg, Powell, and Cheney 2001, Tzolovsky et al. 2002). Chez le poisson-zèbre, la situation est un peu plus complexe, avec 10 types retrouvés (B, Ca, Cb, D, Ea, Eb, F, G, Ha, Hb), qui pourraient provenir de l'évènement de duplication du génome observé chez les poissons téléostéens, par rapport aux autres vertébrés (Glasauer and Neuhaus 2014).

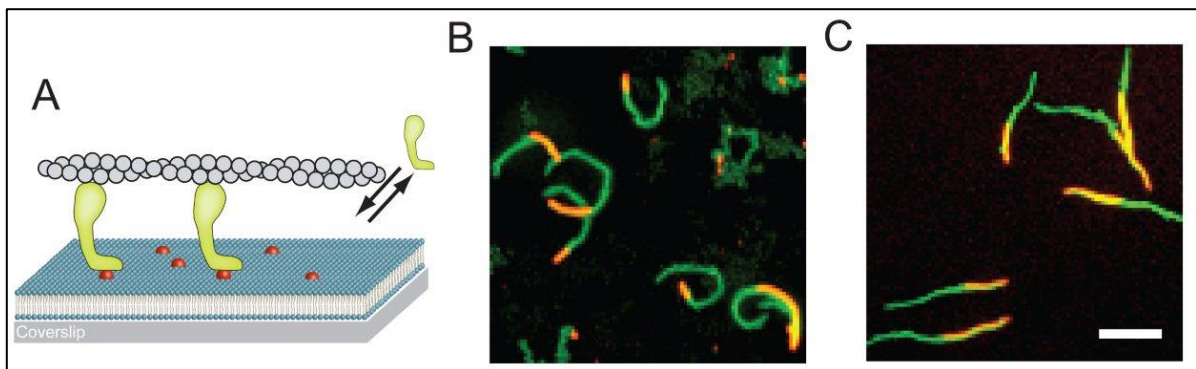


Figure 19 : Interaction *in vitro* entre filament d'actine et myosine. (a) Représentation schématique d'un filament d'actine (en gris) coulissant grâce à des protéines myosine1 (en vert) sur une bicouche lipidique contenant des PtdIns(4,5)P₂ (en rouge). La double flèche montre l'interaction dynamique entre la protéine myosine1 et la bicouche lipidique. (b) Projection maximum sur un temps de 10 minutes de la motilité de l'actine en interaction avec Myo1C de drosophile à 22°C. (c) Projection maximum sur un temps de 20 minutes de la motilité de l'actine en interaction avec Myo1A de souris à 22°C. Dans les deux cas, sont représentés en vert le trajet de l'actine et en rouge le filament d'actine en lui-même à T₀. Echelle de 5µm (Pyrpassopoulos et al. 2012).

Des travaux récents, utilisant une liaison *in vitro* entre Myo1C drosophile et l'actine, a révélé que Myo1C pouvait guider la motilité de l'actine de façon asymétrique, entraînant les filaments d'actine dans une torsion antihoraire (Pyrpassopoulos et al. 2012) (Figure 19). De façon importante, la génération d'une motilité asymétrique apparait comme une propriété de

Myo1C, mais pas comme une caractéristique universelle des moteurs myosin1, car aucun des Myo1A ou 1B de souris n'est capable de générer une asymétrie de mouvement de l'actine (Pyrpassopoulos et al. 2012). Bien que ça ne soit pas directement montré, la tête de la protéine semble être responsable de cette caractéristique, ce qui est cohérent avec le fait que, *in vivo*, l'activité D/G de Myo1D drosophile dépend aussi de la tête de la protéine (Hozumi et al. 2008).

I-5-h- De la chiralité moléculaire à l'établissement de l'asymétrie D/G chez les vertébrés

De nombreux auteurs semblent donc convaincus que l'intervention de l'actine, et de sa chiralité intrinsèque, puissent être à l'origine d'une cassure de symétrie. L'actine, qui s'assemble sous la forme de filaments, présente en effet un enroulement chiral, et est impliquée dans divers étapes de l'acquisition de la latéralité *in vitro* et *in vivo*. De la cassure de symétrie initiale, à la torsion d'organes latéralisés en aval. Diverses protéines vont jouer un rôle dans la régulation de la chiralité du cytosquelette d'actine comme la Rho-GTPase Formine, ou les myosines non-conventionnelles. De plus, le cytosquelette d'actomyosine a été montré comme permettant l'interaction avec la voie de signalisation PCP chez des organismes modèles protostomes et deutérostomes. J'ai donc étudié la conservation de la fonction de Myo1D chez le poisson-zèbre. Myo1D, qui entraîne chez la drosophile une inversion de l'axe de symétrie, et qui interagit avec le cytosquelette d'actine, est-il également responsable de la cassure de symétrie chez un organisme modèle vertébré ?

II- Résultats

II-1- Projet 1 : Etude du rôle d'ESCRT et de la dynamique de transport de vésicules dans la latéralité

Au cours du développement de l'asymétrie D/G chez les vertébrés, une question majeure qui reste en suspens est la façon dont les organismes présentant un flux nodal cassent leur symétrie. Deux modèles non-mutuellement exclusifs sont ici en débat, et ont été résumés dans l'introduction de ce manuscrit : une chimiosensation ou une mécanosensation du flux. Nous apportons ici des évidences favorisant une chimiosensation du flux, avec l'étude de vésicules présentes dans la lumière de la KV chez le poisson-zèbre.

Ce projet trouve son origine dans la recherche de potentiels rôles du complexe ESCRT au cours du développement. Nous avons procédé à l'inhibition de différentes protéines du complexe ESCRT, grâce à des approches transitoires en utilisant des morpholinos, ou par le biais de mutants génétiques générés par Crispr/Cas9. Nous avons ainsi identifié plusieurs acteurs du complexe ESCRT jouant un rôle dans l'asymétrie D/G, et dans la biogenèse de vésicules dans l'organisateur D/G.

Ce projet nous a conduit à étudier plus en détail les paramètres biophysiques du flux, et la façon dont des vésicules présentes dans la lumière de la KV peuvent être transportées afin d'initier une cassure de symétrie potentielle. Cette approche plurielle du flux nodal chez le poisson-zèbre, d'un point de vue biochimique par l'intermédiaire d'ESCRT, et biophysique par l'étude du flux lui-même, nous a conduits à plusieurs interrogations :

- Comment le complexe ESCRT joue-t-il un rôle dans l'asymétrie D/G ?
- Les vésicules positives pour un membre du complexe ESCRT présentes dans la lumière peuvent-elles être importantes au transport d'une information de latéralité ?
- Comment des vésicules contenues dans un flux circulaire pourraient-elles conduire à une cassure de symétrie ?

Les résultats de ce projet seront présentés dans cette partie selon deux axes. Premièrement, nous nous sommes concentrés sur l'étude du rôle du complexe ESCRT dans l'établissement de la latéralité. Deuxièmement, sur le mode de transport par le flux de la KV, d'un point de vue mécanistique, de vésicules présentes dans la lumière.

II-1-a- Des vésicules Chmp1b-positives sont présentes dans la lumière de la vésicule de Kupffer

La mise en place d'une chimiosensation du flux de la KV suppose la présence d'une molécule de signalisation et de potentiels transporteurs du signal dans le milieu extracellulaire. Dans ce contexte, nous avons identifié la présence de vésicules extracellulaires positives pour le composant ESCRT Chmp1b au niveau de la KV en immunomarquage (Figure 20a-c). Ces vésicules sont majoritairement trouvées désolidarisées de la membrane de la KV, s'agitant de manière libre dans la lumière de l'organe. En tissus fixés, les vésicules Chmp1b présentes dans la lumière s'agitent selon un mouvement brownien observable en l'absence de flux directionnel, tandis que les vésicules Chmp1b au niveau de la membrane ou dans les cellules adjacentes demeurent immobiles (Figure 20d, e). La nature et l'origine de ces vésicules reste néanmoins inconnue.

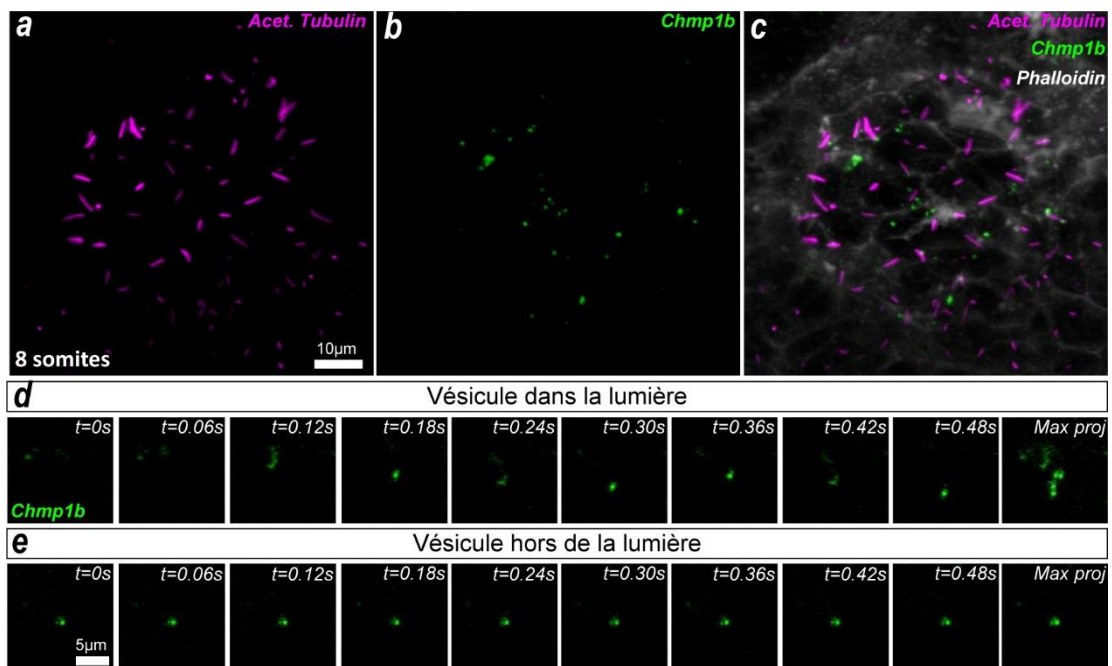


Figure 20: Chmp1b est présent dans la lumière de la KV sur des vésicules. (a-c) Immunomarquage de la KV à 8 somites contre la tubuline acétylée qui marque les cils, Chmp1b présent sur des vésicules, et Phalloïdine qui marque les tissus environnants. Représentation de la projection maximum d'un z-stack à travers la KV le long de l'axe dorso-ventral. (d-e) Suivi d'une vésicule isolée dans la lumière et hors de la lumière de la KV sur 0.48s. La projection maximale sur ces 0.48s illustre le mouvement brownien que subit la vésicule dans la lumière de la KV, à l'inverse de la vésicule hors de la lumière.

La protéine Chmp1 a été montrée précédemment comme cruciale au transport du morphogène Hedgehog chez la drosophile, et colocalise avec celui-ci dans l'espace extracellulaire des disques d'ailes. De plus, Chmp1 est spécifiquement requis pour l'activation des cibles à longue distance d'Hedgehog (Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014) ; Chmp1 peut ainsi être responsable du transport extracellulaire de molécules de signalisation

au cours du développement. En outre, des exovésicules présents dans l'organisateur D/G de la souris ont déjà été supposées jouer un rôle dans la latéralité (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005).

On s'est donc intéressé au rôle des vésicules Chmp1b chez le poisson-zèbre dans l'acquisition de la latéralité, et au rôle du complexe ESCRT de manière plus générale dans la mise en place de l'asymétrie D/G.

II-1-b- Des protéines ESCRT sont requises pour la latéralité d'organes asymétriques

Afin d'étudier le rôle du complexe ESCRT dans la latéralité, nous avons dans un premier temps ciblé le complexe Vps4. Il s'agit d'un composant essentiel au fonctionnement du complexe ESCRT, en permettant le recyclage de la spirale ESCRT-III après une boucle de régulation, mais également en favorisant son remodelage à des stades plus précoces (Adell et al. 2014). Nous avons dans un premier temps observé les effets d'injections de morpholinos antisens inhibant la traduction sur le positionnement du cœur à 26h. Le ciblage des ARN des gènes *vps4a* et *vps4b* entraîne des défauts de positionnement du cœur, de façon centrée ou sur la droite, par rapport à la position sauvage sur la gauche (Figure 21i-j). Les morpholinos sont cependant depuis récemment la cibles de débats sur la spécificité des phénotypes qu'ils induisent (Kok et al. 2015), et un certains nombres de contrôles sont requis afin d'optimiser l'interprétation des résultats qu'ils apportent. Parmi ceux-là, un des contrôles consiste à co-injecter le morpholino contre *p53*. Ce morpholino est connu comme supprimant les effets apoptotiques induits par d'autres morpholinos, et n'affecte pas les effets de morts cellulaires spécifiquement causé par le morpholino en question (Robu et al. 2007). Dans le cas de *vps4a* et *vps4b*, l'utilisation du morpholino *p53* n'affecte pas le pourcentage de phénotype de défaut de latéralité observé (Figure 21m), ce qui signifie que ce phénotype n'est pas associé à une mort cellulaire aspécifique induite par le morpholino. Un deuxième contrôle consiste en la co-injection des morpholinos avec des ARN codant pour les gènes cibles, ne possédant néanmoins pas le site de liaison au morpholino, afin de réaliser un sauvetage du phénotype. Pour *vps4b*, le phénotype du morpholino peut être sauvé par une version de l'ARN de *vps4b* ne possédant pas le 5'UTR, où se fixe le morpholino (Figure 21m). Cela signifie que le morpholino contre *vps4b* le cible spécifiquement. Finalement, l'injection d'une version dominant négative de Vps4b, inhibant son activité AAA-ATPase (Lin et al. 2005), conduit aux mêmes défauts de latéralité.

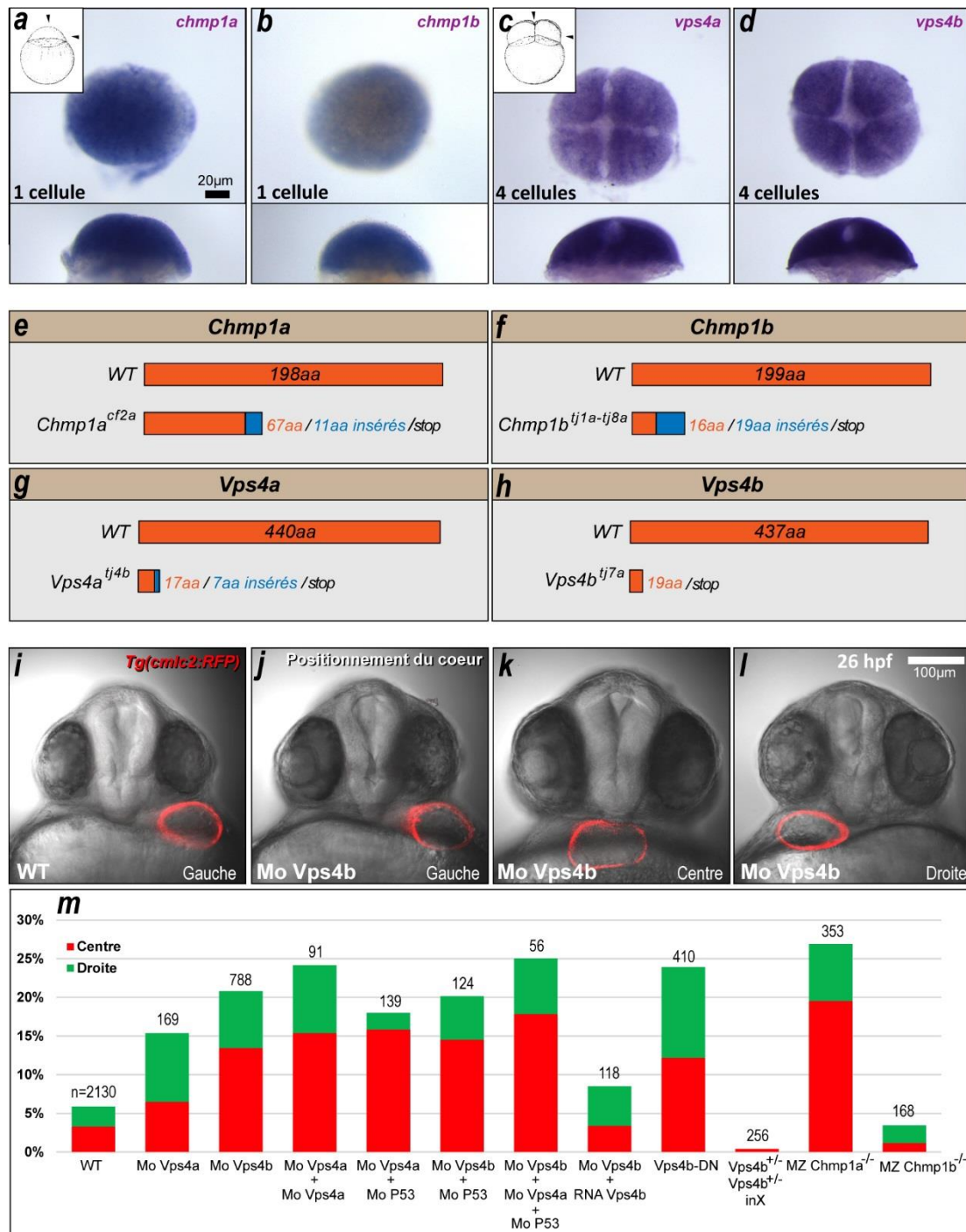


Figure 21 : Vps4a/b et Chmp1a sont importants pour la latéralité du cœur. (a-b) Hybridation in situ à 1 cellule contre *chmp1a* et *chmp1b* montre une contribution maternelle pour ces deux gènes, avant l'activation du génome zygotique. (c-d) Hybridation in situ à 4 cellules contre *vps4a* et *vps4b* montre également une contribution maternelle pour ces deux gènes. (e-h) Mutagenèse Crispr/Cas9 contre les gènes *chmp1a*, *chmp1b*, *vps4a* et *vps4b*. Représentation de la traduction virtuelle de l'allèle conservé. (i-l) Positionnement du cœur à gauche à 26h visualisé grâce à la lignée transgénique *Tg(cmlc2:RFP)*. En condition pathologique, il peut être localisé de façon centrée ou à droite. (m) Quantification des défauts de symétrie du cœur illustrés en i-l. Les pertes de *Vps4a*, *Vps4b* et *Chmp1a* entraînent des défauts de latéralité du cœur à 26h.

Afin de confirmer ces phénotypes, j'ai réalisé par le biais du système Crispr/Cas9 des mutants pour les gènes *vps4a* et *vps4b* (Figure 21g,h). Les mutants générés consistent en

un indel précoce afin d'entraîner un décalage du cadre de lecture, et l'apparition d'un codon stop qui tronque la protéine. Les deux mutations sont létales au cours du développement, et seul le phénotype zygotique peut donc être observé dans un premier temps par l'intermédiaire du croisement de poissons hétérozygotes. Les embryons provenant du croisement de doubles hétérozygotes *vps4a/vps4b* ne présentent cependant pas de défauts de positionnement du cœur (Figure 21m). Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence d'ARN maternels de *vps4a* et *vps4b* au stade de clivage précoce (Figure 21c,d), qui sont ciblés par les morpholinos inhibant la traduction, mais toujours présents dans les mutants zygotiques. Des mutants maternels-zygotiques seront donc requis dans ce cas.

Nous avons également étudié le rôle de notre marqueur de vésicule dans la KV, *chmp1b*, et de son paralogue *chmp1a* dans la mise en place de l'asymétrie D/G. J'ai ainsi réalisé des mutants Crispr/Cas9 pour ces deux gènes, de la même façon que pour *vps4a* et *vps4b* dans un premier temps (Figure 21e,f). La situation est cependant légèrement différente pour *chmp1b*, car le locus contient une mutation initiale entraînant un décalage du cadre de lecture précoce ; et de façon additionnelle une délétion de toute la deuxième moitié de la région génomique par l'utilisation de deux ARN guide. Cette deuxième série de mutagenèse sur *chmp1b* a été motivée par l'étude du phénotype associé au morpholino *chmp1b* qui entraîne des défauts de latéralité massifs, mais qui n'étaient pas récapitulés par le mutant généré. J'ai donc réalisé la délétion de la majeure partie du locus afin de m'assurer que le mutant était null. Les deux mutations de *chmp1a* et *chmp1b* ne sont pas létales, et l'on peut obtenir des individus homozygotes adultes capables de se reproduire. Il est donc possible de visualiser les effets de la perte de la contribution maternelle de *chmp1a* et *chmp1b*, présente dans les deux cas (Figure 21a,b). Il n'est cependant pas possible de générer des doubles mutants homozygotes adultes, la double combinaison étant létale. Les mutants provenant du croisement de deux individus homozygotes, nommés maternels zygotiques (MZ), pour *chmp1a* présentent des défauts de latéralité du cœur. Les mutants MZ *chmp1b* ne présentent néanmoins pas de défauts D/G notables (Figure 21m). Ainsi, si les exovésicules Chmp1b sont importantes dans l'établissement de la latéralité, la présence de Chmp1b à leur surface semble dispensable à leur signalisation.

Les protéines ESCRT Vps4a, Vps4b et Chmp1a semblent donc être importantes pour l'établissement de la position latéralisée normale du cœur. Ces défauts d'asymétrie D/G dans le cas de Vps4b ne sont pas seulement restreints à cet organe, et peuvent également être observés dans d'autres organes asymétriques comme les viscères. Les viscères, qui comprennent notamment le foie du côté gauche, le pancréas du côté droit, et dont la torsion de l'intestin est visible à 48h (Figure 22a), présentent suite à l'injection du morpholino ciblant *vps4b* des dispositions en miroir (Inversus), ou des décoordinations de la latéralité de certains organes (Ambiguus) (Figure 22b-d).

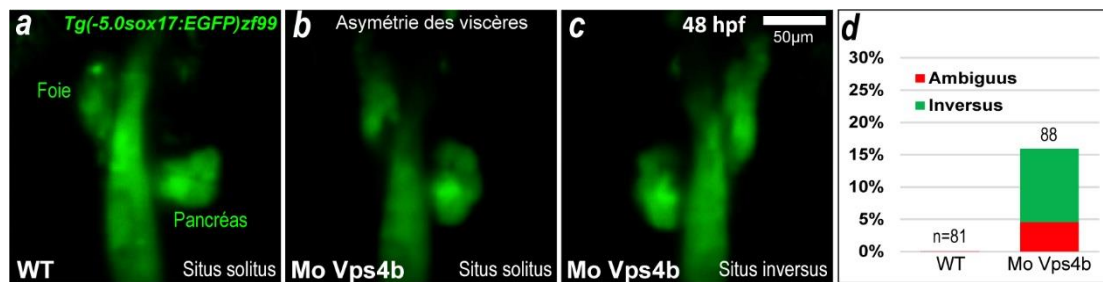


Figure 22 : La perte de *vps4b* entraîne des défauts de latéralité des viscères. (a-c) Positionnement des viscères à 48h visualisé grâce à la lignée transgénique Tg(-5.0sox17:EGFP)zf99, avec le foie localisé sur la gauche, le pancréas sur la droite, et la courbure de l'intestin visible. En condition pathologique, les viscères peuvent être localisés en miroir (Inversus), ou avec des décoordination de la latéralité des organes précédemment décrits (Ambiguus). (d) Quantification des défauts de symétrie des viscères illustrés en a-c. Les viscères présentent des défauts de placement en inversus et ambiguus chez les morphants *Vps4b*.

Ces observations permettent de présenter *vps4b* comme un régulateur général de la latéralité chez le poisson-zèbre, et *vps4a* ainsi que *chmp1a* comme important pour l'établissement de l'asymétrie D/G. Mais les phénotypes observés sont-ils dus à des effets directement au niveau des organes asymétriques, ou plus en amont de la signalisation de latéralité? Pour répondre à cela, nous avons observés les effets exercés par la perte de *vps4a* et *chmp1a* sur l'expression de gènes asymétriques précoces.

II-1-c- ESCRT est requis pour l'activité de l'organisateur droite/gauche

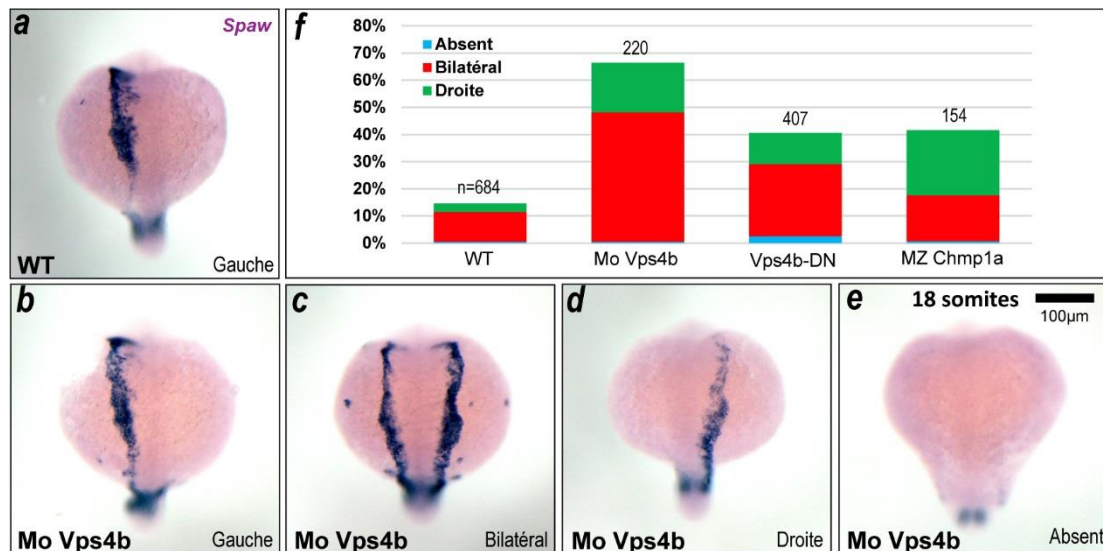


Figure 23 : Les pertes de *Vps4b* et *Chmp1a* entraînent des défauts de latéralité de *spaw* dans le LPM. (a-e) Hybridation in situ illustrant le positionnement de *Spaw* à 18 somites, avec un signal restreint à la gauche en condition WT. En condition pathologique, *spaw* peut être retrouvé de façon bilatérale, sur la droite, ou absent. (d) Quantification des défauts de symétrie de *spaw* illustrés en a-e. *spaw* présente des défauts de latéralité dans les cas de perte de *Vps4b* et *Chmp1a*.

Un des gènes latéralisés le plus précocement chez le poisson-zèbre est le TGF- β *spaw*, apparenté à la famille Nodal, très conservé au cours de l'évolution. Au stade 18 somites, il se trouve majoritairement restreint dans le mésoderme latéral gauche (Figure 23a). Il va induire l'expression de *pitx2* dans les primordia d'organe du cerveau, du cœur et des viscères, et transmet le signal de latéralité du bourgeon de queue, jusqu'à l'extrémité antérieure du corps. Son expression n'est plus restreinte du côté gauche dans tous les cas où la fonction de la KV est altérée, et représente un marqueur fiable de défauts de l'organisateur. Ainsi, chez les embryons injectés avec le morpholino dirigé contre *vps4b* ou le dominant négatif *Vps4b*, ainsi que chez les mutants MZ *chmp1a*, l'expression de *spaw* peut être observée de façon ectopique des deux côtés de l'embryon (Bilatéral) ou seulement du côté droit avec une fréquence supérieure au contrôle (Figure 23b-f). Ces observations soutiennent l'hypothèse d'un rôle précoce de *vps4b* et *chmp1a* dans l'établissement de la latéralité.

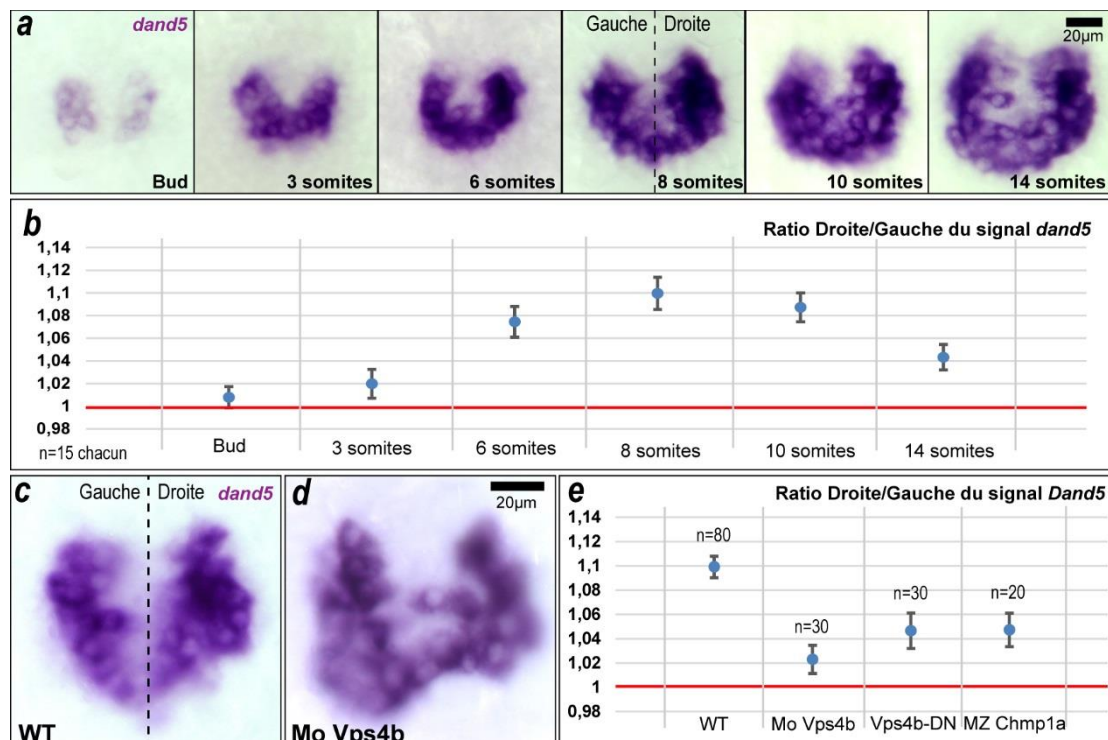


Figure 24 : Les pertes de *vps4b* et *chmp1a* entraînent des défauts de latéralité de *dand5* dans la KV. (a-b) Hybridation in situ illustrant le niveau d'expression de *dand5* à différents stades de développement en condition WT et quantification du signal en mesurant le ratio des niveaux de gris entre la partie droite et gauche du signal *dand5*. (c-d) Hybridation in situ contre *dand5* à 8 somites, qui représente son pic de latéralité. En condition de perte de fonction, l'enrichissement à droite de *spaw* est réduit. (e) Quantification des défauts de symétrie de *dand5* illustrés en a-b. Le ratio D/G du signal *dand5* est réduit dans les cas de perte de *vps4b* et *chmp1a*.

Un autre gène exprimé précocement de façon latéralisée est *dand5*, un antagoniste des TGF- β , retrouvé préférentiellement du côté droit de l'embryon à un stade plus précoce que *spaw* (8 somites) (Figure 24a). Contrairement à *spaw*, qui se retrouve latéralisé dans le mésoderme, *dand5* est lui latéralisé dans les cellules de la KV. Il indique donc de façon plus

spécifique des défauts de latéralité dus à des perturbations de l'organisateur. Il antagonise *spaw* du côté droit, et entraîne la restriction de son expression du côté gauche (Hashimoto et al. 2004). Son expression est connue comme étant asymétrique à 8 somites, néanmoins aucune quantification de cette latéralité n'avait été faite auparavant sur le temps de développement de la KV. Nous avons pour cela fixé des embryons à différents temps de développement, et quantifié l'asymétrie de *dand5* en mesurant le ratio de niveaux de gris entre la partie droite et gauche du signal de *dand5* en hybridation in situ (Figure 24a,b). Le ratio apparaît comme étant maximal à 8 somites, mais montre déjà une latéralité entre 3 et 6 somites, contrairement à ce qui avait été suggéré précédemment (Lopes et al. 2010). A 8 somites, le ratio se situe à 1.1 (Le signal de *dand5* est 10% plus intense/étendu du côté droit que du côté gauche), nous avons donc utilisé ce stade pour nos analyses.

Dans le cas des embryons injectés avec le morpholino dirigé contre *vps4b* ou le dominant négatif Vps4b, ainsi que chez les mutants MZ *chmp1a*, le ratio droite/gauche de *dand5* est diminué. Il se retrouve proche de 1, ce qui signifie que le signal de *dand5* est moins latéralisé (Figure 24c-e).

L'expression de *dand5*, en dehors des signaux calciques, est l'information latéralisée la plus précoce observée chez le poisson-zèbre. *Vps4b* et *chmp1a* semblent donc être important pour la fonction de l'organisateur D/G. On ignore cependant si ces gènes sont requis spécifiquement au niveau de la KV et de ses précurseurs pour permettre la mise en place de la latéralité, ou dans les tissus adjacents.

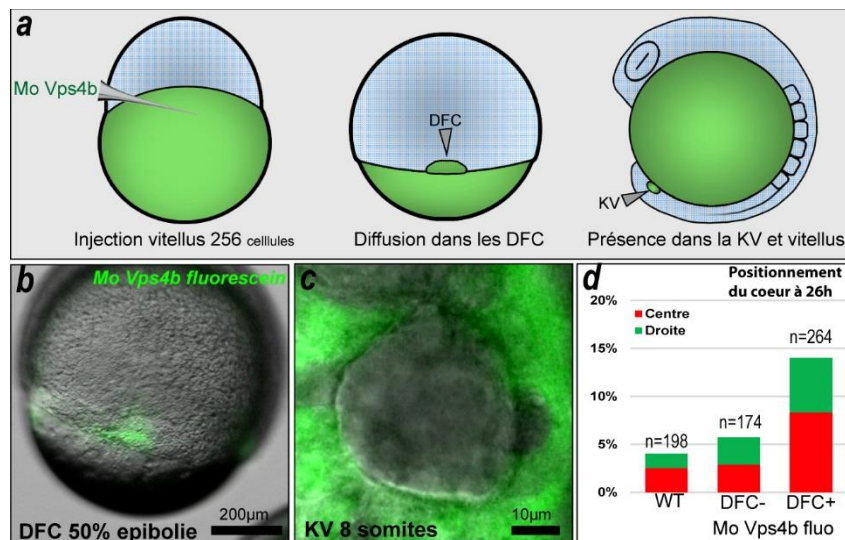


Figure 25 : *Vps4b* est spécifiquement requis dans la KV. (a-c) Illustration du processus d'injection spécifique dans les DFC. Le morpholino *Vps4b* couplé à la fluorescéine est injecté au stade 256 cellules dans le vitellus. La présence de ponts cytoplasmiques persistants entre le vitellus et les DFC à ce stade permettent l'adressage du morpholino seulement dans ces cellules. A 8 somites, le morpholino est donc seulement retrouvé dans la KV et le vitellus. (d) Quantification des défauts de symétrie du cœur à 26h. Le cœur présente des défauts latéralité chez les morphants *Vps4b* avec un signal fluorescent positif seulement dans les DFC.

Pour tester cela, nous avons pris avantage d'une particularité des cellules précurseurs de la KV, les DFC, qui présentent des ponts cellulaires persistant avec le vitellus à un stade avancé, à l'inverse des autres cellules. Ainsi, si l'on injecte une version couplée à la fluorescéine du morpholino Vps4b dans le vitellus à 256 cellules, il sera adressé spécifiquement aux DFC, et non aux autres cellules grâce aux ponts cellulaires (Figure 25a-c). Cette technique permet donc de cibler le morpholino Vps4b spécifiquement aux cellules formant la KV, et d'étudier son impact sur la latéralité. Les embryons injectés à 256 cellules ne présentent cependant pas tous un signal fluorescent dans les DFC, et un tri est effectué à 50% épibolie entre ceux ayant un signal dans les DFC et les autres. Ainsi, les embryons ayant reçu le morpholino Vps4b seulement dans les DFC présentent des défauts de latéralité du cœur à 26h, à l'inverse de ceux ne l'ayant pas reçu et des embryons contrôles (Figure 25d).

Vps4b semble donc être requis spécifiquement au niveau de l'organisateur D/G pour permettre la mise en place d'une bonne latéralité. Cependant, de multiples paramètres au niveau de l'organisateur sont susceptibles de conduire à des défauts d'asymétrie s'ils sont altérés. Les plus fréquents sont des défauts de motilité des cils dus à des problèmes de ciliogenèse, et des ralentissements du flux directionnel engendré par les cils. Nous avons donc observés ces paramètres dans les conditions de perte de fonction de *vps4b* et *chmp1a*.

II-1-d- La perte de protéines ESCRT ne perturbe pas la motilité des cils et le flux de la KV

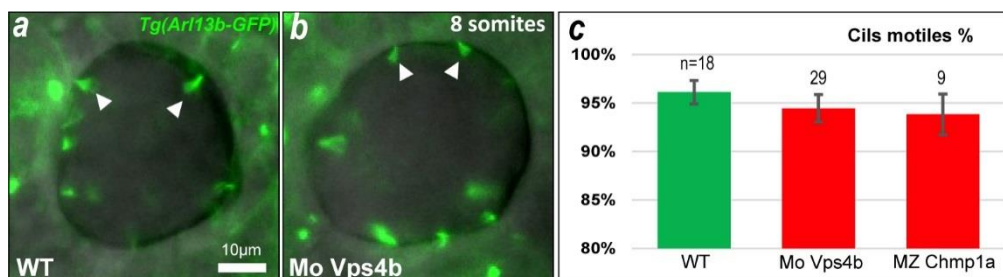


Figure 26 : La présence des cils motiles n'est pas perturbée par les pertes de *vps4b* et *chmp1a*. (a-b) Visualisation d'un plan équatorial de la KV à 8 somites grâce à la lignée transgénique Tg(Arl13b-GFP) permettant d'observer le mouvement des cils motiles. En exposition longue, les cils motiles présentent une forme conique qui représente leur battement, tandis que les cils immotiles conservent leur forme rectiligne. (c) Quantification du nombre de cils motiles par rapport au nombre total de cils visualisé dans la KV. Les pertes de *vps4b* et *chmp1a* n'entraînent pas de diminution du pourcentage de cils motiles

Le mouvement des cils de la KV peut être observé par l'utilisation de marqueurs fluorescents des cils comme Arl13b-GFP. Un z-stack à travers la KV permet de comptabiliser le nombre de cils motiles par rapport au nombre total de cils. Dans les cas de perte de fonction de

composants importants pour l'activité ciliaires comme *Irrc50*, leur immotilité entraîne en effet des défauts de latéralité (Baker & Burdine 2008).

Dans des embryons contrôles, le pourcentage de cils motiles est très fortement majoritaire, avec 95% de cils motiles (Figure 26a). Dans les embryons injectés avec le morpholino dirigé contre *vps4b* et chez les mutants MZ *chmp1a*, le pourcentage de cils motiles ne décroît pas et reste à un taux aux alentours de 95% (Figure 26b, e). Cela indique que *vps4b* et *chmp1a* ne semblent pas requis pour l'acquisition de la motilité des cils de la KV. De plus, la forme et la taille générale des KV de ces deux conditions n'apparaissent pas comme affectées (non quantifié).

Cependant, la mise en place d'une motilité des cils de la KV n'est pas forcément synonyme d'une bonne mise en place du flux (Borovina et al. 2010). Additionnellement, la mise en place d'un flux normal est également représentatif de l'absence de problème majeurs en amont de la formation de la KV. Nous nous sommes donc intéressés dans un deuxième temps à l'acquisition par la KV d'un flux efficace.

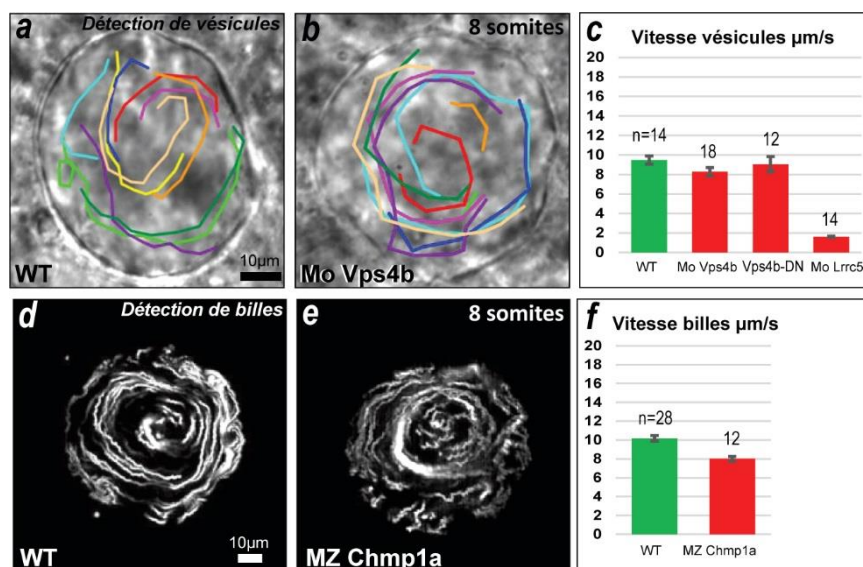


Figure 27 : Le flux de la KV n'est pas perturbé par les pertes de *vps4b* et *chmp1a*. (a-b) Détection de vésicules endogènes dans la lumière de la KV à 8 somites. (c) Quantification de la vitesse de déplacement des vésicules endogènes en µm/s. La perte de *vps4* n'entraîne pas de diminution de la vitesse moyenne des vésicules, à l'inverse de *Irrc50*. (d-e) Projection maximale du déplacement de billes fluorescentes injectées dans la lumière de la KV à 8 somites, et détectées automatiquement. (f) Quantification de la vitesse de déplacement des billes fluorescentes en µm/s. La perte de *chmp1a* n'entraîne pas de défauts majeurs de déplacement du flux.

On trouve dans la lumière de la KV de façon endogène des vésicules de tailles variable et d'origine inconnue. Elles constituent la manière la moins invasive de visualiser le flux de la KV et de mesurer son efficacité. Le flux présente un caractère circulaire, et le suivi manuel des vésicules endogènes montre que sa vitesse moyenne se situe aux alentours de 9µm/s (Figure 7a, c). La vitesse moyenne ne semble pas perturbée dans des embryons injectés

avec le morpholino dirigé contre *vps4b* ou le dominant négatif Vps4b (Figure 27b, c), avec des vitesses restants autour de 8-9 μ m/s.

Une deuxième façon de visualiser le flux consiste en l'injection de billes fluorescentes dans la lumière de la KV. Cette deuxième approche est plus invasive, mais beaucoup plus efficace en terme de nombre de détection sur un temps court. Une fois correctement mise au point, l'injection de billes dans la KV d'embryons contrôle n'entraîne pas de défauts D/G (non montré) (Figure 27d). Cette deuxième approche a donc été préférée dans un deuxième temps au cours de la thèse pour visualiser le flux des embryons MZ *chmp1a*. Une détection automatisée des billes d'embryons MZ *chmp1a* montre une faible diminution de la vitesse moyenne (8 μ m/s), sans atteindre des niveaux comparable à des flux observés lors de l'inactivation de composants ciliaires comme *Irrc50* (Figure 27c, e, f). L'impact de cette faible diminution de la vitesse moyenne sur la latéralité devra être étudié plus en détail.

Ainsi, la ciliogenèse de la KV, l'acquisition de la motilité des cils, et la mise en place d'un flux efficace semblent peu ou pas affectés dans le cas de perte de fonction *vps4a* et *chmp1a*, tandis que les effets sur la latéralité de gènes asymétriques précoces apparaissent élevés (Figure 23, 24). Qu'est ce qui peut donc expliquer les défauts de latéralité observés dans les pertes de fonction ESCRT ?

II-1-e- La perte de Vps4b diminue le nombre de vésicules Chmp1b-positives dans la KV

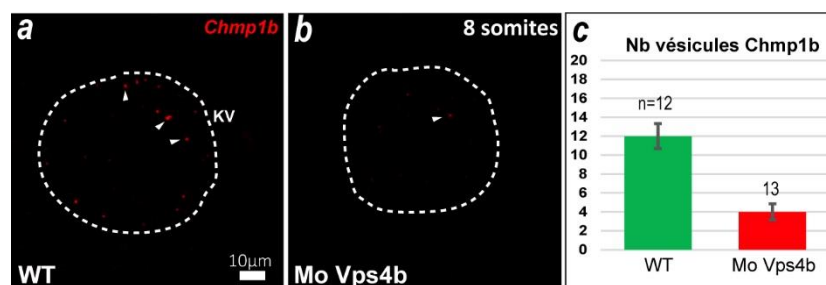


Figure 28 : La perte de *vps4* entraîne une diminution du nombre de vésicules Chmp1b dans la KV. (a-b) Immunomarquage de la KV à 8 somites contre Chmp1b présent sur des vésicules. Visualisation d'un plan équatorial de la KV. (c) Quantification du nombre de vésicules Chmp1b retrouvées dans la lumière de la KV à travers un z-stack. La perte de *vps4b* entraîne une diminution de leur nombre.

ESCRT, bien qu'il soit important pour le chargement de cargo sur des vésicules intraluminales sécrétées dans le milieu extérieur, ainsi que sur des ectosomes, joue également un rôle dans leur relargage. On s'est donc intéressé aux effets de la perte de fonction de *vps4b*, un composant particulièrement conservé dans les différentes fonctions ESCRT, sur les vésicules positives pour Chmp1b présentes dans la lumière de la KV. L'observation de ces exovésicules dans le cas de la perte de fonction de *vps4b* permet de

noter que leur nombre est réduit (Figure 28a, b, c). Ainsi, associés aux effets de la perte de fonction *vps4b* sur la latéralité, cela suggère que de telles exovésicules pourraient jouer un rôle dans la mise en place de l'asymétrie.

Cependant, comment des exovésicules circulant dans le flux de la KV seraient-elles capables de transporter ou d'induire une information latéralisée ? Chez la souris, la situation semble ici plus simple à rationaliser, avec un courant dans le flux principalement dirigé vers le côté gauche de l'embryon. Des courants dirigés vers la droite sont également présents, mais de beaucoup plus faible intensité (Hirokawa, Tanaka, and Okada 2009), et les exovésicules NVP dans le nœud ont été observées se désintégrant du côté gauche préférentiellement. Chez le poisson-zèbre, le KV étant une cavité fermée, le flux est circulaire et le courant est dirigé vers la gauche à l'antérieur, mais également dirigé vers la droite au postérieur. La question d'un transport latéralisé de matériel comme des vésicules au niveau de la KV est donc une question en suspens. Est-il possible de transporter de façon asymétrique des vésicules dans la KV ? Quels sont les mécanismes qui peuvent rentrer en jeu au cours de ce processus ?

II-1-f- Des vésicules extracellulaires sont transportées de façon asymétrique dans la KV

Afin d'étudier la dynamique de transport de vésicules dans le flux de la KV, nous avons suivi manuellement le transport des vésicules intraluminales endogènes présentes dans la KV (Figure 29a), comme décrit précédemment (Figure 27). En les marquant à un intervalle de temps régulier, nous disposons ainsi d'une carte de présence sur le temps du film de ces vésicules (Figure 29b). Nous avons ensuite segmenté les KV grâce à un système de coordonnées polaires en 24 secteurs de 15 degrés (Figure 29c). Les KV sont orientées selon la position relative de la notochorde à l'antérieur. Le centre de la KV est situé à mi-distance entre l'extrémité postérieure de la KV, et le centre de l'indentation présent à la jonction avec la notochorde (Figure 29c). La distribution des vésicules est représentée en pourcentage de présence dans chaque quadrant du système de coordonnées polaires.

Ainsi, les vésicules sont enrichies du côté gauche de la KV par rapport au côté droit, ainsi qu'au postérieur par rapport au postérieur (Figure 29e). Il y a donc une cassure de symétrie dans le transport de matériel extracellulaire dans la KV à 8 somites. De plus, une analyse plus détaillée des zones de présence des vésicules montre qu'elles s'accumulent principalement au niveau du postérieur gauche, et qu'elles sont particulièrement peu présentes à l'antérieur droit (Figure 29f, g).

Nous nous sommes ensuite demandé ce qui pouvait expliquer cette inhomogénéité dans la présence des vésicules de la KV. Deux hypothèses sont ici en concurrence pour tenter de répondre à cette question. La première est le fait que ces vésicules pourraient être sécrétées

ou réceptionnées de façon préférentielle dans certaines parties de la KV. La deuxième serait la préexistence d'asymétries dans la forme du flux, qui conduiraient préférentiellement les vésicules dans certaines parties de la KV. Ces deux hypothèses supposent la présence d'un paramètre déjà asymétrique, et ne permettent donc pas d'expliquer son origine intrinsèque, mais apportent des réponses sur le mode de transmission de leur asymétrie aux vésicules.

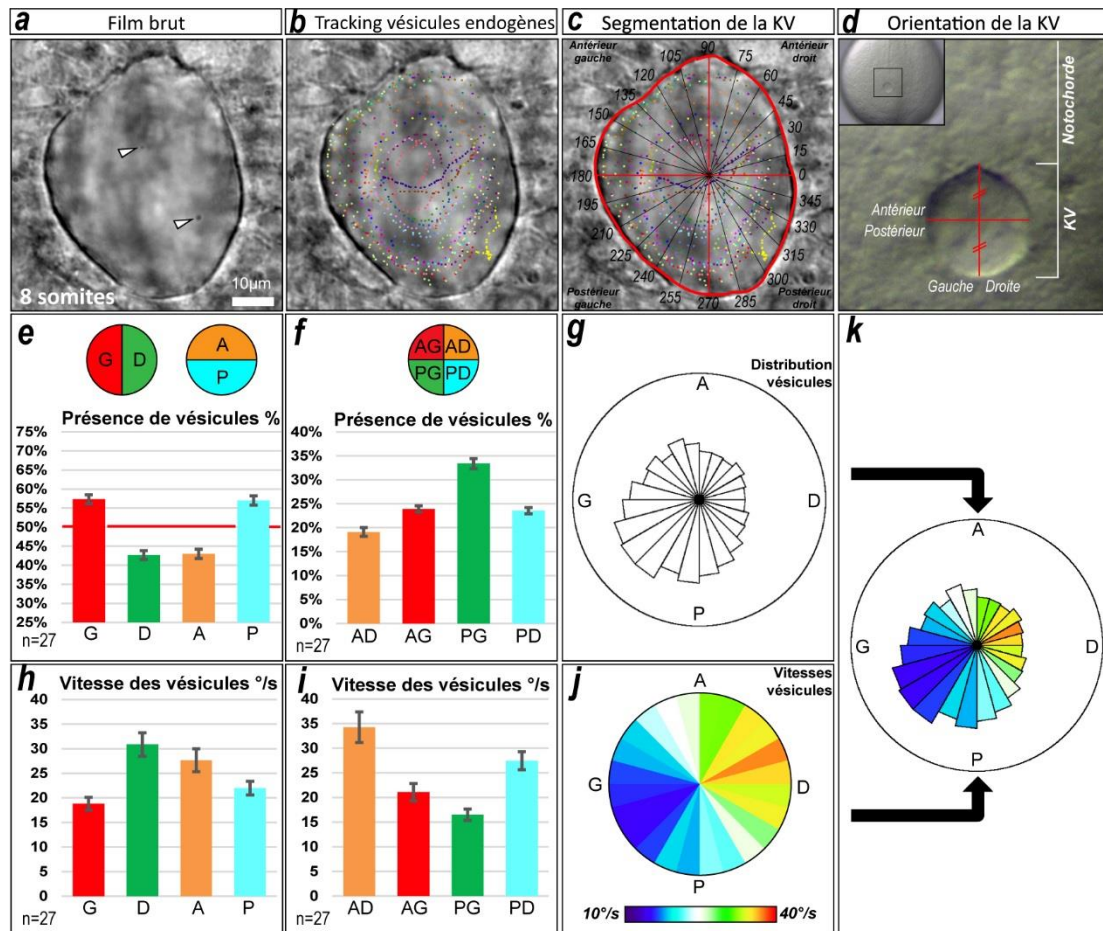


Figure 29 : Les vésicules endogènes de la KV se distribuent et présentent des vitesses latéralisées. (a-d) Méthode de détection et quantification des vésicules endogènes dans la KV. Les vésicules sont suivies manuellement, puis la KV est segmentée en secteurs de 15° afin d'extraire des informations de localisation précises. Les KV sont orientées selon la position relative de la notochorde à l'antérieur. La séparation A/P correspond à la moitié de la distance entre l'extrémité antérieure de l'indentation que présente la KV et l'extrémité postérieure. La séparation L/R est définie par la localisation de l'indentation. (e-g) Quantification de la localisation des vésicules selon l'axe A/P, et le plan D/G, et rose plot de distribution. Les vésicules s'accumulent principalement au postérieur gauche, et sont absentes à l'antérieur droit. (h-j) Quantification de la vitesse angulaire des vésicules selon l'axe A/P, et le plan D/G, et heat map de distribution. Le centre de la KV est défini comme le point de coupure entre l'A/P et le D/G précédemment décrit. Les vitesses sont le plus élevées à l'antérieur droit, et plus basses au postérieur gauche. (k) Fusion de la représentation en rose plot de la distribution des vésicules, avec la heat map de vitesse. Les zones de hautes vitesses sont celles où l'on trouve le moins de vésicules, et celles de basses vitesses sont celles où l'on en trouve le plus.

La deuxième hypothèse constitue pour nous la plus aisée à étudier car nous disposons déjà des paramètres de suivi des vésicules dans la lumière de la KV, leur mouvement découlant de la forme du flux. Nous avons donc extrait les paramètres de vitesse angulaire des

vésicules. Le choix de ce type de vitesse s'est fait suite à l'observation du caractère circulaire du flux. Ainsi, la vitesse angulaire en $^{\circ}/s$ est extraite relativement au centre de la KV comme décrit précédemment (Figure 29d).

On observe que les vitesses angulaires sont également distribuées de façon inhomogène, mais cette fois avec une augmentation de la vitesse du côté droit par rapport au gauche, et à l'antérieur par rapport au postérieur (Figure 29h). Ici, le schéma semble être inverse par rapport à la présence des vésicules. Cela reste vrai lorsque l'on regarde plus en détail la distribution des vitesses, avec la plus forte accélération à l'antérieur droit, et la plus forte décélération au postérieur gauche (Figure 29i, j). Il y a donc également une asymétrie D/G dans la distribution des vitesses angulaire de la KV. De plus, Les zones de hautes vitesses correspondent à des zones de faible présence de vésicules, tandis que les zones de basses vitesses correspondent à des zones de forte présence de vésicules. Une visualisation à la fois de la carte de distribution des vésicules, fusionnée avec la carte des vitesses angulaires dans la KV confirme cette observation (Figure 29k).

Y-a-t-il une relation de cause à effet entre ces deux paramètres de vitesses et de distribution de vésicules ? Pour amener des éléments de réponses à cette question, nous avons réalisé une simulation informatique du déplacement de vésicules dans la KV.

II-1-g- Simulation du transport de vésicules dans l'organisateur droite/gauche

Afin d'étudier le rôle joué par la distribution de vitesse angulaire asymétrique observée dans la KV dans la distribution asymétrique de vésicules, nous avons utilisé les paramètres de vitesse mesurés dans les 24 secteurs de la KV décrits précédemment (Figure 30a). Nous avons ensuite conçu une simulation informatique qui nous autorise à faire apparaître un nombre contrôlé de vésicules de façon aléatoire dans un organe simulé circulaire. Ces vésicules se déplacent ensuite avec la vitesse angulaire qu'on l'on a observé dans chacun des secteurs avec une trajectoire circulaire uniforme. Une vitesse angulaire positive étant un mouvement dans le sens antihoraire, et une vitesse angulaire négative dans le sens horaire (Figure 30b).

A la suite de la simulation, la distribution des vésicules simulées est ensuite mesurée dans les 24 secteurs présentés précédemment. De plus, les valeurs génériques de présence dans la partie gauche, droite, ou à l'antérieur et au postérieur sont également récupérés. Un nombre arbitraire de 1000 vésicules a été choisi pour être introduit dans la simulation, car il permet de façon robuste de récapituler la même distribution d'un essai à l'autre. Les vésicules simulées tournent ensuite selon un temps de vie de 12.5 secondes. Cette durée de vie a été choisie de façon arbitraire également car nous ne sommes pas parvenus à la

mesurer *in vivo*, et elle permet *in silico* de récapituler efficacement nos observations. Le choix de ces variables sera discuté par la suite.

On peut observer que la présence des vésicules simulées est également inhomogène dans la KV virtuelle. Comparé aux vésicules observées, les vésicules simulées s'accumulent également à gauche par rapport à la droite, et au postérieur par rapport à l'antérieur (Figure 30c,d). Pareillement, l'observation plus en détail des zones de présence des vésicules simulées montre qu'elles s'accumulent au postérieur gauche, et qu'elles sont particulièrement absentes à l'antérieur droit (Figure 30e-h).

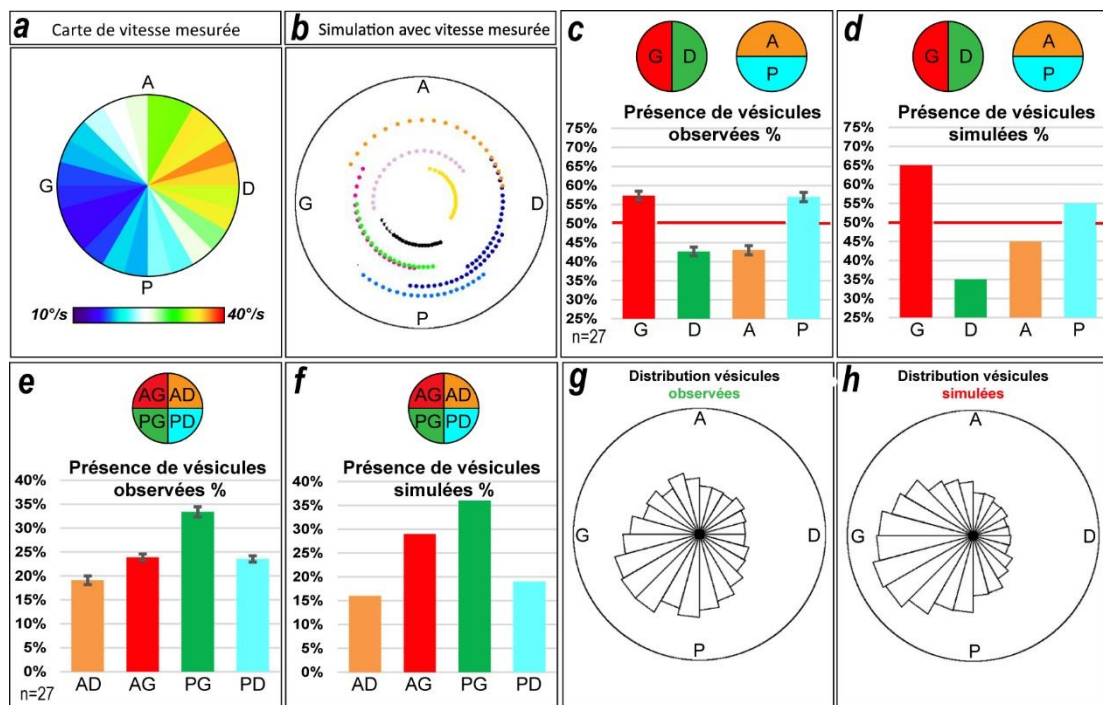


Figure 30 : Une simulation informatique établit une corrélation entre vitesse angulaire observée et distribution latéralisée. (a-d) Méthode de mise en place de la simulation. Les paramètres de vitesses angulaires mesurées sont extraits. 1000 Vésicules sont mises en mouvement de façon circulaire uniforme dans une forme en disque, avec un temps de vie de 12.5s. Les vésicules simulées acquièrent la vitesse angulaire mesurée dans le secteur où elles se trouvent à un temps donné. Ces vésicules apparaissent de façon aléatoire et leur distribution est ensuite quantifiée, les paramètres de présences en fonctions des 15 secteurs décrits précédemment sont extraits. (e-h) Quantification de la localisation des vésicules simulées selon l'axe A/P et le plan D/G, et rose plot de distribution. En comparaison des vésicules telles qu'elles ont été observées *in vivo*, les vésicules simulées présentent la même distribution avec une accumulation au postérieur gauche, et une raréfaction à l'antérieur droit.

Cette simulation indique qu'il est possible de reproduire la distribution de vésicules observées en se servant simplement du paramètre de vitesse angulaire mesurée. Cela suggère que la distribution de vitesse angulaire inhomogène dans la KV est responsable de la distribution asymétrique de vésicules.

Si cette interprétation est exacte, du matériel extracellulaire dans le flux qui ne peut pas être sécrété ou réceptionné doit se déplacer en fonction de la forme du flux, et présenter la même

distribution que les vésicules endogènes. Pour étudier cette question, nous avons injecté des billes fluorescentes de latex dans la lumière de l'organe de la même façon que précédemment décrit (Figure 8), car elles sont supposées être biologiquement inactives et ne pas répondre à d'autres stimuli que le flux en lui-même, en subissant son action.

II-1-h- La dynamique du flux de la KV permet le transport asymétrique de matériel extracellulaire

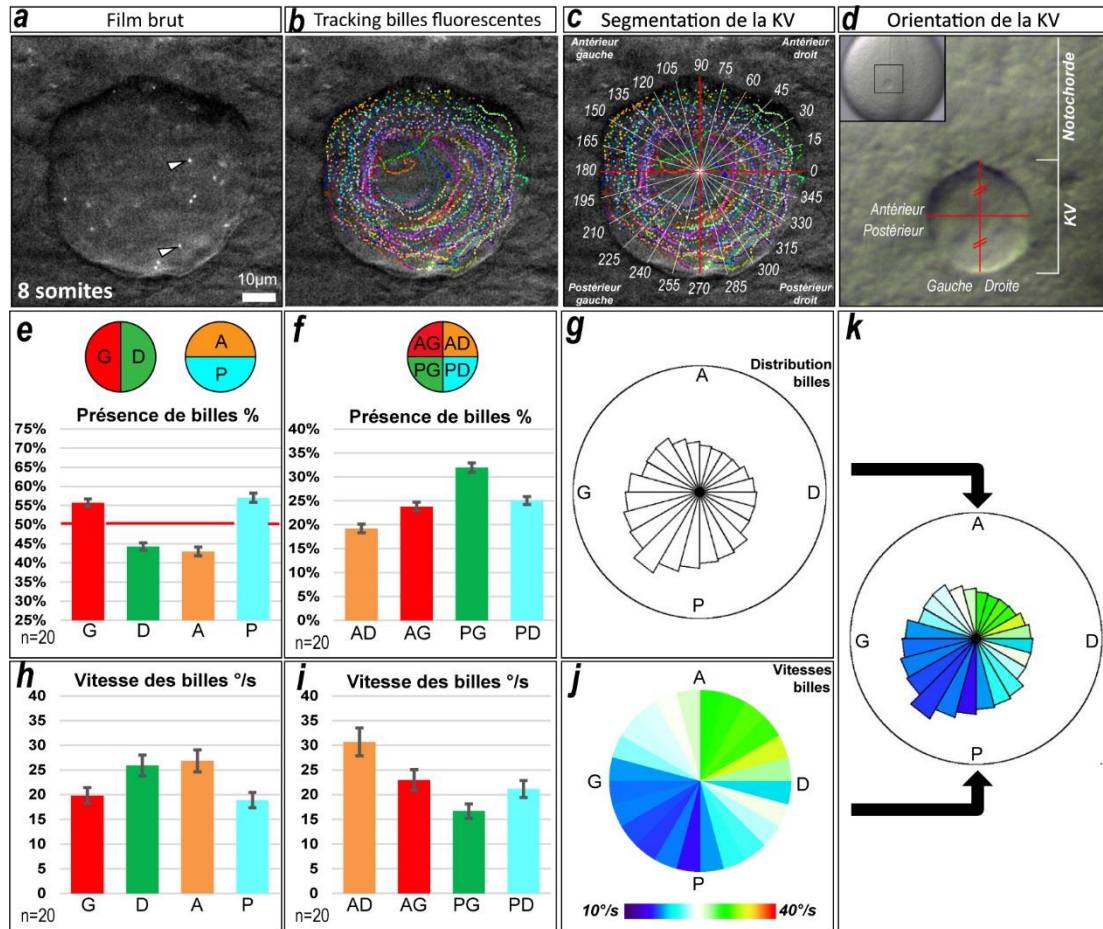


Figure 31 : Des billes fluorescentes présentent les mêmes profils de distribution et de vitesse que les vésicules endogènes. (a-d) Méthode de détection et quantification des billes fluorescentes dans la KV. Les billes sont suivies manuellement, puis la KV est segmentée en secteurs de 15° afin d'extraire des informations de localisation précis. Les KV sont orientées selon le procédé précédemment décrit. (e-g) Quantification de la localisation des billes selon l'axe A/P, et le plan D/G, et rose plot de distribution. Les billes s'accumulent principalement au postérieur gauche, et sont absentes à l'antérieur droit. (h-j) Quantification de la vitesse angulaire des vésicules selon l'axe A/P et le plan D/G, et heat map de distribution. Le centre de la KV est défini comme le point de coupure entre l'A/P et le D/G précédemment décrit. Les vitesses sont le plus élevées à l'antérieur droit, et plus basses au postérieur gauche. (k) Fusion de la représentation en rose plot de la distribution des vésicules, avec la heat map de vitesse. Les zones de hautes vitesses sont celles où l'on trouve le moins de billes, et celles de basses vitesses sont celles où l'on en trouve le plus.

Nous avons donc manuellement marqué le trajet des billes fluorescentes dans la lumière de la KV de la même façon que pour les vésicules endogènes (Figure 31a, b). Nous avons

également segmenté la KV de la même façon que précédemment (Figure 31c). De plus, les KV restent orientées de la façon qu'il a précédemment été décrit pour les vésicules endogènes (Figure 31c, d), et le centre de KV est déterminé par le même biais.

Les billes sont retrouvées particulièrement sur la gauche par rapport à la droite, et au postérieur par rapport à l'antérieur (Figure 31e). De plus, la dissection plus détaillée de la présence des billes montre également que celles-ci sont enrichies au postérieur gauche, et absent à l'antérieur droit, similairement aux vésicules endogènes (Figure 31f, g).

Il y a un donc de façon intrinsèque une asymétrie de déplacement de matériel extracellulaire dans la KV, similairement à ce qui a pu être observé chez la souris avec les NVP. Mais ce déplacement asymétrique de bille corrèle-t-il également de façon négative à la distribution de leur vitesse ?

De même, la vitesse de déplacement angulaire des billes suit le même schéma que les vésicules. Il y a une asymétrie de déplacement avec des vitesses plus élevées à droite par rapport à la gauche, mais également à l'antérieur par rapport au postérieur (Figure 31h). De plus, l'antérieur gauche présente les plus hautes vitesses, tandis que le postérieur gauche présente les plus basses (Figure 31i, j). Les dispositions de vitesses et de présence des billes suivent donc le même schéma que les vésicules endogènes, et ces deux paramètres sont également en anti corrélation comme le suggère la représentation fusionnée des vitesses et des présences (Figure 31k).

Cette expérience renforce donc les observations précédentes qu'une distribution asymétrique de matériel peut être observée dans la KV, sans faire appel à des sécrétions ou réceptions localisées. L'hypothèse stipulant que des formes du flux inhomogènes pouvaient expliquer la distribution asymétrique de vésicules semble donc suffisante, sans exclure cependant totalement la seconde hypothèse de sécrétion/réception qui pourrait également jouer un rôle.

II-2- Projet 2 : Myo1D est un déterminant essentiel à la latéralité conservé au cours de l'évolution.

La question de la conservation des mécanismes de mise en place de la latéralité occupe une place importante dans le domaine d'étude de l'asymétrie chez les bilatériens.

Ce projet part du constat, résumé dans l'introduction du manuscrit de thèse, qu'une des fonctions cellulaires le plus souvent retrouvée comme impliquée dans la mise en place de la latéralité, à différents stades, est la capacité à présenter un squelette d'actomyosine fonctionnel. Notre compréhension de la façon dont l'actomyosine transmet ensuite *in vivo* l'information de la latéralité aux tissus, et les molécules importantes dans ce complexe est cependant encore évasive. Dans ce contexte, un modèle où ces questions ont été bien étudiées d'un point de vue cellulaire, est la drosophile. Il a été montré qu'une myosine non-conventionnelle de type 1, Myo1D, régule la latéralité des organes asymétriques à partir d'organiseurs D/G indépendants. Myo1D interagit avec le cytosquelette d'actine, des molécules de jonctions adhérentes, et des protéines de la voie de signalisation de polarité planaire afin de transmettre aux tissus un biais dextral.

Ce projet a donc été initié afin d'étudier la conservation de la fonction de Myo1D chez un organisme modèle vertébré, le poisson-zèbre. Grâce à cette approche, nous cherchons ainsi à répondre aux questions suivantes:

- Myo1D est-il également impliqué dans la mise en place de la latéralité dans ce modèle ?
- S'il est impliqué, à quel niveau joue-t-il un rôle ? De façon très précoce, aux stades clivage ? Au niveau de l'organisateur D/G, la KV ? A des stades plus tardifs directement au niveau des tissus des organes latéralisés ?
- S'il est impliqué, par quel moyen remplit-il ce rôle ? Les voies de signalisation PCP, ou les jonctions adhérentes sont-elles engagées dans la conservation de la fonction ?

Les résultats de ce projet sont présentés ici sous la forme d'un article actuellement soumis pour publication. Par souci de clarté, la bibliographie de cet article reste à sa suite, et est indépendante de la bibliographie de la thèse, qui se situe à la fin du manuscrit.

Title: Myosin1D is an evolutionarily conserved determinant of animal Left/Right asymmetry

Authors: Thomas Juan¹, Charles Géminard¹, Jean-Baptiste Coutelis¹, Delphine Cerezo¹, Sophie Polès¹, Stéphane Noselli^{1*} and Maximilian Fürthauer^{1*}

Affiliations:

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, Institut de Biologie Valrose, Nice, France.

*Correspondence to: noselli@unice.fr (S.N.); furthauer@unice.fr (M.F.)

Abstract: The establishment of Left/Right (LR) asymmetry is fundamental to animal development, but the identification of a unifying mechanism establishing laterality across different phyla has remained elusive. A cilia-driven, directional fluid flow is important for symmetry breaking in numerous vertebrates, including zebrafish. Alternatively, LR asymmetry can be established independently of cilia, notably through the intrinsic chirality of the acto-myosin cytoskeleton. We show that Myosin1D (Myo1D), which has been previously identified as a determinant of LR asymmetry in *Drosophila*, is essential for the formation and the function of the zebrafish LR Organizer (LRO). Myo1D controls the polarity of LRO cilia and interacts functionally with the Planar Cell Polarity (PCP) gene *VanGogh-like2* (*Vangl2*), to shape a productive LRO flow. Our findings identify Myo1D as a unique, evolutionarily conserved determinant of LR asymmetry, and show that functional interactions between Myo1D and PCP are central to the establishment of animal LR asymmetry.

One Sentence Summary: Myosin1D interacts with the Planar Cell Polarity protein *VanGogh-like2* to control the formation and function of the zebrafish Left/Right organizer.

Main Text:

The molecular pathways governing antero-posterior and dorso-ventral patterning have been extensively conserved throughout evolution. In contrast, the mechanisms that control LR asymmetry have been found to be quite diverse across, but also within different phyla. (1-5), Processes that have been involved in symmetry breaking range from cilia-driven fluid flows (6-10) and localized ion flows (7, 11, 12) to cellular rearrangements dependent on cytoskeletal polarity (13-15). Body laterality can even be subject to distinct regulations in a single organism (16, 17). This apparent diversity raises the question whether a unifying mechanism underlying the establishment of LR asymmetry still remains to be identified?

An attractive hypothesis is that the chirality of actin filaments may provide a template for LR asymmetry (2, 18). Actin-binding proteins govern molecular (19) and cellular chirality (20) and actin-dependent processes regulate invertebrate and vertebrate laterality (2, 16, 21-23). Studies in *Drosophila* have identified the actin-based molecular motor Myosin1D (Myo1D, a.k.a. Myosin31DF) as a major determinant of LR asymmetry (21, 22). Here, we use zebrafish to study the contribution of this factor to vertebrate laterality.

We first determined whether zebrafish and *Drosophila* Myo1D have conserved activities by testing the ability of fish *myo1D* to rescue the laterality defects of *myo1D*-depleted flies. The two orthologous proteins show 69% sequence similarity. Expressing zebrafish *myo1D* in *Drosophila* fully restored the chirality of genitalia rotation (Fig. 1A), indicating that zebrafish Myo1D can direct chiral morphogenesis.

To study zebrafish *myo1D*, we generated frameshift mutations that disrupt the P-loop required for Myo1D motor activity and delete the actin- and cargo-binding domains (fig. S1A). Homozygous mutants lacking zygotic *myo1D* function developed normally and gave rise to fertile adults (fig. S1B). In addition to their zygotic expression, *myo1D* transcripts are maternally provided (fig. S1C). We therefore used homozygous mutant females to generate embryos lacking either maternal (M) or maternal and zygotic (MZ) *myo1D* activities. M and MZ *myo1D* mutants displayed LR asymmetry defects at the level of the heart (Fig. 1, B and C), viscera (Fig. 1D) and brain (fig. S2, A and B). Two distinct mutant alleles yielded identical phenotypes (Fig. 1, B and C), and similar defects were generated when a morpholino blocking the translation of both maternally deposited and zygotically transcribed *myo1D* RNA was injected in wild-type embryos (fig. S2, C to E). These experiments identify Myo1D as a conserved regulator of LR asymmetry.

Drosophila Myosin1C (Myo1C, a.k.a. Myo61F) is an antagonist of the essential LR determinant Myo1D, with *myo1C* overexpression phenocopying *myo1D* loss-of-function. *Drosophila* *myo1C* is, however, itself dispensable for LR asymmetry (24). Zebrafish has two *myo1C* homologues, *myosin1Ca* and *myosin1Cb* (*myo1Ca* & *b*). Like in *Drosophila*, zygotic *myo1Ca* mutants and MZ *myo1Cb* mutants did not display LR defects (not shown). However, *Myo1Cb* overexpression elicited laterality defects (Fig. 1E), as observed in flies (24).

Overexpression of zebrafish *myo1Cb* enhanced MZ *myo1D* mutant LR defects (Fig. 1E), raising the question whether additional Myo1D-like activities might regulate LR asymmetry. Zebrafish Myosin1G (Myo1G) is closely related to Myo1D (79% similar amino acids). While *myo1G* knock-down through morpholino or Crispr/Cas9 nuclease injection elicited modest laterality defects, the injection of these reagents into MZ *myo1D* mutants increased the frequency of LR defects to a level equivalent to the one observed upon *myo1Cb* overexpression (Fig. 1E). These findings suggest that Myo1D/G agonists and their antagonist Myo1Cb form a conserved pathway controlling LR asymmetry.

The observation that *myo1D* governs the laterality of multiple organs suggests that it may be required for the function of the central zebrafish LRO, Kupffer's Vesicle (KV) (10, 25). LRO activity induces the expression of the Nodal ligand *southpaw* (*spaw*) and the transcription factor *pitx2* in the left lateral plate mesoderm (26, 27). *myo1D* loss-of-function disrupted the asymmetric expression of both genes (Fig. 2, A and B). To further test the importance of Myo1D for LRO function, we analyzed the asymmetric expression of the TGF β antagonist *chiron/dand5*, which is the earliest known transcriptional response to KV flow (9). While weak symmetric *dand5* expression is initiated prior to the establishment of a functional KV, *dand5* asymmetry arises as the LRO matures, peaks by the 8-somite stage and decreases again during later development (Fig. 2, C and D) (Same as Project 1 figure 24a,b). In accordance with a dysfunction of the LRO, *dand5* asymmetry was reduced in MZ *myo1D* mutants and completely lost in MZ *myo1D* mutants injected with *myo1Cb* RNA or *myo1G* morpholino (Fig. 2, E and F). Myo1D is therefore required prior to the first morphological manifestations of LR asymmetry for the LRO-dependent induction of asymmetric gene expressions.

To further dissect the role of *myo1D* in zebrafish LR asymmetry, we analyzed its contribution to the formation and function of the KV. While *myo1D* is dispensable for the specification and migration of KV precursor cells (fig. S3), average KV size and cilia number were reduced in MZ *myo1D* mutants (Fig. 3, A, B, D). While LRO function requires a minimal size and number of cilia (9, 28), we could not observe any correlation between KV size, cilia number and the appearance of laterality defects in MZ *myo1D* mutants (Fig. 3B and fig. S4A). Accordingly, treatment with IBMX and Forskolin, which promote KV lumen inflation (29), rescued KV size but not laterality defects in mutant embryos (Fig. 3, B and C). While the loss of *myo1D* caused a modest reduction of cilia size (Fig. 3D), it had no incidence on their motility or their anterior clustering, two factors known to be required for LRO flow (fig. S4, B and C)(30).

To characterize the LRO flow, we tracked fluorescent microspheres in the KV lumen. While wild-type controls displayed mostly circular trajectories, MZ *myo1D* mutants often presented aberrant flow patterns (Fig. 3E). The dynamics of the LRO flow were quantitatively assessed by determining its mean angular velocity. Importantly, these measurements revealed that LR asymmetry defects in MZ *myo1D* mutants correlate with pronounced reductions in flow velocity (Fig. 3E). In contrast, treatment of wild-type embryos with Ouabain to pharmacologically reduce KV size increased flow velocity without inducing LR defects (fig. S5). Myo1D therefore controls LRO flow independently of KV size.

How then does Myo1D govern KV flow? Embryos with no, or immotile, cilia lack a detectable flow (9, 10). In MZ *myo1D* mutants, cilia were motile but the flow was erratic, similar to mutants for the Planar Cell Polarity (PCP) pathway component *vangl2* (Fig. 4A)(31, 32). The establishment of LR asymmetry requires the generation of peak flow velocities in the anterior

KV (9, 30). Both MZ *myo1D* and *vangl2* mutants displayed a reduction in overall angular flow velocity as well as a disruption of antero-posterior flow velocity patterns (Fig. 4B). While *myo1D* and *vangl2* mutants had similar flow phenotypes, removal of one copy of *vangl2* reduced the penetrance of LR defects in M or MZ *myo1D* embryos (Fig. 4C, see Methods), suggesting that the two genes affect the LRO in opposite ways.

PCP signaling controls the posterior positioning of the ciliary basal body and the orientation of the ciliary rotation cone to promote LRO flow (13, 31, 33, 34). Rat *myo1D* has moreover been shown to control cilia orientation in multiciliated epithelia (35). We therefore imaged cilia in live embryos and found that zebrafish *myo1D* and *vangl2* both affect cilia orientation: While *vangl2* mutants presented an excess of anteriorly pointing cilia in the anterior KV, the loss of *myo1D* increased the number of posteriorly pointing cilia in the posterior KV (Fig. 4, D and E, and fig. S6). Additionally, the inactivation of either *myo1D* or *vangl2* caused an anterior displacement of the basal body (Fig. 4, F and G). The positioning of the basal body was however partially restored when one copy of *vangl2* was removed in MZ *myo1D* mutants (Fig. 4, F and G). These data suggest that *myo1D* and *vangl2* affect PCP-dependent KV cyto-architecture, but do so in opposite ways, consistent with our genetic interaction data (Fig. 4C). In accordance with this model, the removal of one copy of *vangl2* partially rescued KV flow pattern and velocity in MZ *myo1D* mutants (Fig. 4B).

In conclusion, our data show that Myo1D is essential for the formation and function of the zebrafish LRO, identifying this conserved Myosin as a unifying determinant of LR asymmetry that is common to vertebrates and invertebrates. Remarkably, zebrafish Myo1D establishes a productive LRO flow and body laterality through functional interaction with PCP (Fig. 4H), reminiscent of recent work showing a functional link between Myo1D and PCP pathways in *Drosophila* (15). We thus propose that the coupling between Myo1D and PCP represents an evolutionarily conserved genetic framework for the control of animal LR asymmetry.

References and Notes:

1. M. Blum, A. Schweickert, P. Vick, C. V. Wright, M. V. Danilchik, Symmetry breakage in the vertebrate embryo: when does it happen and how does it work? *Dev Biol* 393, 109-123 (2014).
2. J. B. Coutelis, N. González-Morales, C. Géminard, S. Noselli, Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa. *EMBO Rep* 15, 926-937 (2014).
3. M. E. Halpern, O. Hobert, C. V. Wright, Left-right asymmetry: advances and enigmas. *Genesis* 52, 451-454 (2014).
4. M. L. Concha, R. D. Burdine, C. Russell, A. F. Schier, S. W. Wilson, A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* 28, 399-409 (2000).
5. D. T. Grimes, R. D. Burdine, Left-Right Patterning: Breaking Symmetry to Asymmetric Morphogenesis. *Trends Genet* 33, 616-628 (2017).
6. Y. Okada, S. Takeda, Y. Tanaka, J. C. Izpisua Belmonte, N. Hirokawa, Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633-644 (2005).
7. S. Yuan, L. Zhao, M. Brueckner, Z. Sun, Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry. *Curr Biol* 25, 556-567 (2015).
8. R. R. Ferreira, A. Vilfan, F. Jülicher, W. Supatto, J. Vermot, Physical limits of flow sensing in the left-right organizer. *Elife* 6, (2017).
9. P. Sampaio et al., Left-right organizer flow dynamics: how much cilia activity reliably yields laterality? *Dev Cell* 29, 716-728 (2014).
10. A. G. Kramer-Zucker et al., Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 132, 1907-1921 (2005).
11. M. Levin, T. Thorlin, K. R. Robinson, T. Nogi, M. Mercola, Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111, 77-89 (2002).
12. D. P. Norris, Cilia, calcium and the basis of left-right asymmetry. *BMC Biol* 10, 102 (2012).
13. K. Minegishi et al., A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking. *Dev Cell* 40, 439-452.e434 (2017).
14. J. Gros, K. Feistel, C. Viebahn, M. Blum, C. J. Tabin, Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick. *Science* 324, 941-944 (2009).
15. N. González-Morales et al., The Atypical Cadherin Dachous Controls Left-Right Asymmetry in *Drosophila*. *Dev Cell* 33, 675-689 (2015).
16. E. S. Noël et al., A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nat Commun* 4, 2754 (2013).

17. O. Hobert, Development of left/right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* nervous system: from zygote to postmitotic neuron. *Genesis* 52, 528-543 (2014).
18. S. R. Naganathan, T. C. Middelkoop, S. Fürthauer, S. W. Grill, Actomyosin-driven left-right asymmetry: from molecular torques to chiral self organization. *Curr Opin Cell Biol* 38, 24-30 (2016).
19. S. Pyrpasopoulos, E. A. Feeser, J. N. Mazerik, M. J. Tyska, E. M. Ostap, Membrane-bound myo1c powers asymmetric motility of actin filaments. *Curr Biol* 22, 1688-1692 (2012).
20. Y. H. Tee et al., Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 17, 445-457 (2015).
21. S. Hozumi et al., An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs. *Nature* 440, 798-802 (2006).
22. P. Spéder, G. Adám, S. Noselli, Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*. *Nature* 440, 803-807 (2006).
23. A. Davison et al., Formin Is Associated with Left-Right Asymmetry in the Pond Snail and the Frog. *Curr Biol* 26, 654-660 (2016).
24. A. G. Petzoldt et al., DE-Cadherin regulates unconventional Myosin ID and Myosin IC in *Drosophila* left-right asymmetry establishment. *Development* 139, 1874-1884 (2012).
25. P. Oteíza, M. Köppen, M. L. Concha, C. P. Heisenberg, Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish. *Development* 135, 2807-2813 (2008).
26. S. Long, N. Ahmad, M. Rebagliati, The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development* 130, 2303-2316 (2003).
27. J. J. Essner, W. W. Branford, J. Zhang, H. J. Yost, Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by pitx2 isoforms. *Development* 127, 1081-1093 (2000).
28. J. J. Gokey, Y. Ji, H. G. Tay, B. Litts, J. D. Amack, Kupffer's vesicle size threshold for robust left-right patterning of the zebrafish embryo. *Dev Dyn* 245, 22-33 (2016).
29. A. Navis, L. Marjoram, M. Bagnat, Cfr controls lumen expansion and function of Kupffer's vesicle in zebrafish. *Development* 140, 1703-1712 (2013).
30. G. Wang et al., The Rho kinase Rock2b establishes anteroposterior asymmetry of the ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish. *Development* 138, 45-54 (2011).
31. A. Borovina, S. Superina, D. Voskas, B. Ciruna, Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nat Cell Biol* 12, 407-412 (2010).
32. H. L. May-Simera et al., Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol* 345, 215-225 (2010).
33. D. Antic et al., Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One* 5, e8999 (2010).
34. H. Song et al., Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature* 466, 378-382 (2010).
35. P. S. Hegan, E. Ostertag, A. M. Geurts, M. S. Mooseker, Myosin Id is required for planar cell polarity in ciliated tracheal and ependymal epithelial cells. *Cytoskeleton (Hoboken)*, (2015).

36. J. B. Coutelis et al., *Drosophila* left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene abdominal-B. *Dev Cell* 24, 89-97 (2013).
37. C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310 (1995).
38. L. E. Jao, S. R. Wentz, W. Chen, Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13904-13909 (2013).
39. A. Hruscha et al., Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development* 140, 4982-4987 (2013).
40. T. Mizoguchi, H. Verkade, J. K. Heath, A. Kuroiwa, Y. Kikuchi, Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. *Development* 135, 2521-2529 (2008).
41. J. D. Mably, M. A. Mohideen, C. G. Burns, J. N. Chen, M. C. Fishman, heart of glass regulates the concentric growth of the heart in zebrafish. *Curr Biol* 13, 2138-2147 (2003).
42. L. Solnica-Krezel et al., Mutations affecting cell fates and cellular rearrangements during gastrulation in zebrafish. *Development* 123, 67-80 (1996).
43. B. Gao et al., Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 20, 163-176 (2011).
44. C. Thisse, B. Thisse, High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3, 59-69 (2008).
45. W. Rottbauer et al., Cardiac myosin light chain-2: a novel essential component of thick-myofilament assembly and contractility of the heart. *Circ Res* 99, 323-331 (2006).
46. J. Odenthal, C. Nüsslein-Volhard, fork head domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol* 208, 245-258 (1998).
47. C. Thisse, B. Thisse, Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* 126, 229-240 (1999).
48. M. Faucourt, E. Houlston, L. Besnardeau, D. Kimelman, T. Lepage, The pitx2 homeobox protein is required early for endoderm formation and nodal signaling. *Dev Biol* 229, 287-306 (2001).
49. J. Alexander, D. Y. Stainier, A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol* 9, 1147-1157 (1999).
50. H. Hashimoto et al., The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development* 131, 1741-1753 (2004).
51. G. Wang, M. L. Manning, J. D. Amack, Regional cell shape changes control form and function of Kupffer's vesicle in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 370, 52-62 (2012).
52. S. Superina, A. Borovina, B. Ciruna, Analysis of maternal-zygotic *ugdh* mutants reveals divergent roles for HSPGs in vertebrate embryogenesis and provides new insight into the initiation of left-right asymmetry. *Dev Biol* 387, 154-166 (2014).

Acknowledgments:

This work was supported by the ANR grants DRO-ASY (ANR-13-BSV2-006, S.N.) and DroZeMyo (M.F., S.N.). M.F. was supported by a CNRS/INSERM ATIP/Avenir 2010 grant and an HFSP Career Development Award (00036/2010). T.J. benefited from a PhD fellowship from INSERM/Région PACA/Cancéropôle PACA and the Labex SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01). We thank S.Lopes, B.Ciruna and T.Lepage for the sharing of reagents and R.Rebillard for excellent fish care. Confocal microscopy and imaging of the KV flow were performed at the iBV PRISM imaging platform with help from Magali Mondin.

The genetic analysis of zebrafish MyosinI function was performed by T.J. J.B.C. performed initial morpholino knock-downs of zMyo1D and zMyo1G. S.P. cloned zMyo1D and G, analyzed Myo1D expression and performed Myo1D morpholino knock-down and Myo1Cb overexpression experiments together with T.J. D.C. generated zMyo1D-transgenic flies. C.G. rescued fly Myo1D mutants with zMyo1D. S.N. and M.F. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript.

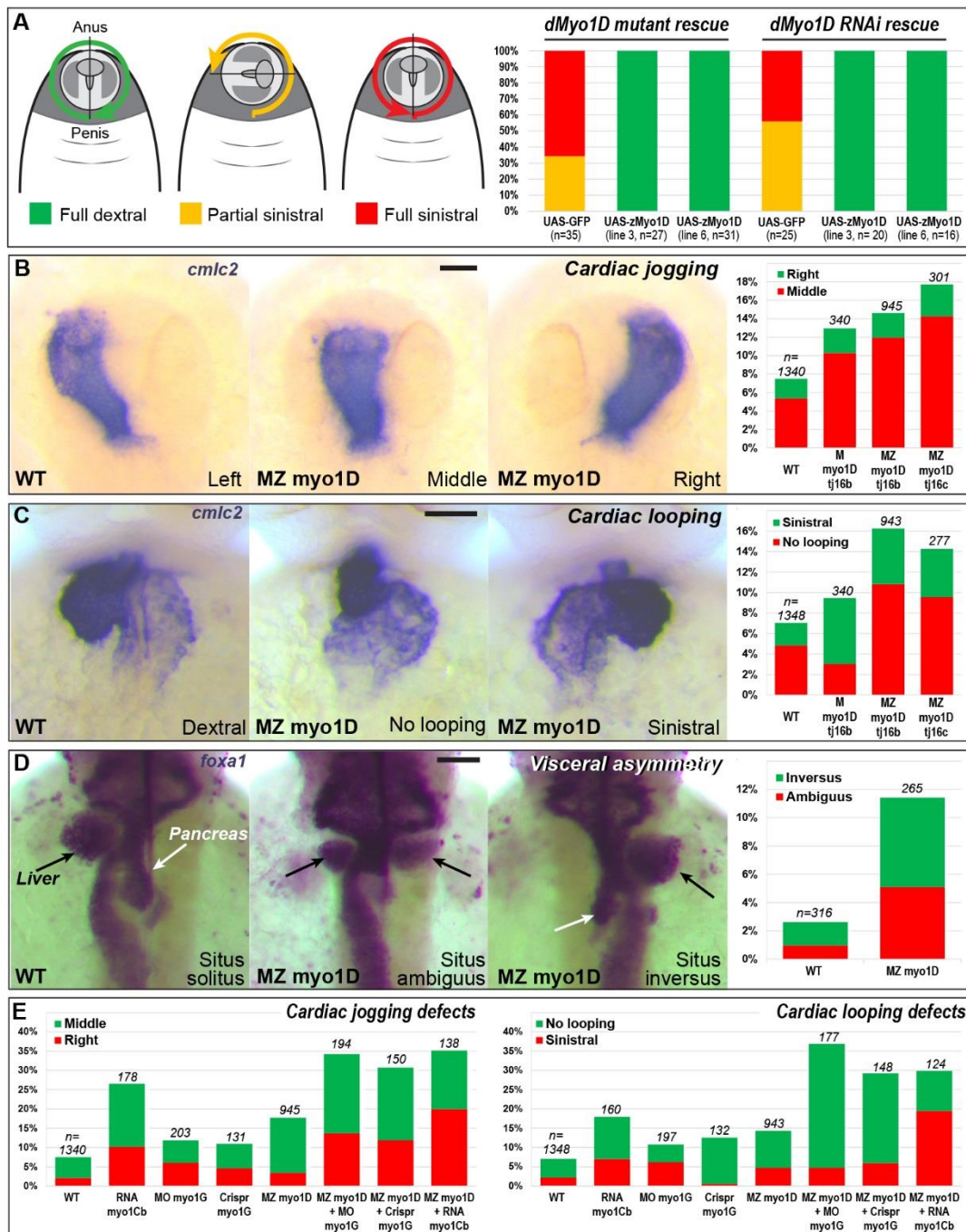


Figure 1: *myo1D* controls zebrafish Left/right asymmetry. (A) Transgenic expression of zebrafish *myo1D* (*zmyo1D*) restores the laterality of genitalia rotation in drosophila *myo1D* (*dmyo1D*) mutant or RNAi flies. Lines 3 and 6 are independent transgenes. (B) Dorsal views of the 26 hpf heart (*cmlc2*, anterior up) reveal cardiac jogging defects in zebrafish maternal (M) and maternal zygotic (MZ) *myo1D* mutants. (C) Frontal views of the 48 hpf heart (*cmlc2*, dorsal up) show that loss of *myo1D* affects the chirality of cardiac looping. (D) Asymmetric development of the *foxa1*-expressing liver (black arrow) and pancreas (white arrow) is perturbed in MZ *myo1D* mutants (dorsal views, anterior up, 48 hpf). (E) Overexpression of zebrafish *myo1Cb* RNA or knock-down of *myo1G* by Morpholino (MO) or Crispr/Cas9 nuclease (Crispr) impair cardiac laterality. An increased frequency of defects is observed when these reagents are injected into MZ *myo1D* mutants. Scale bars: 30 μ m.

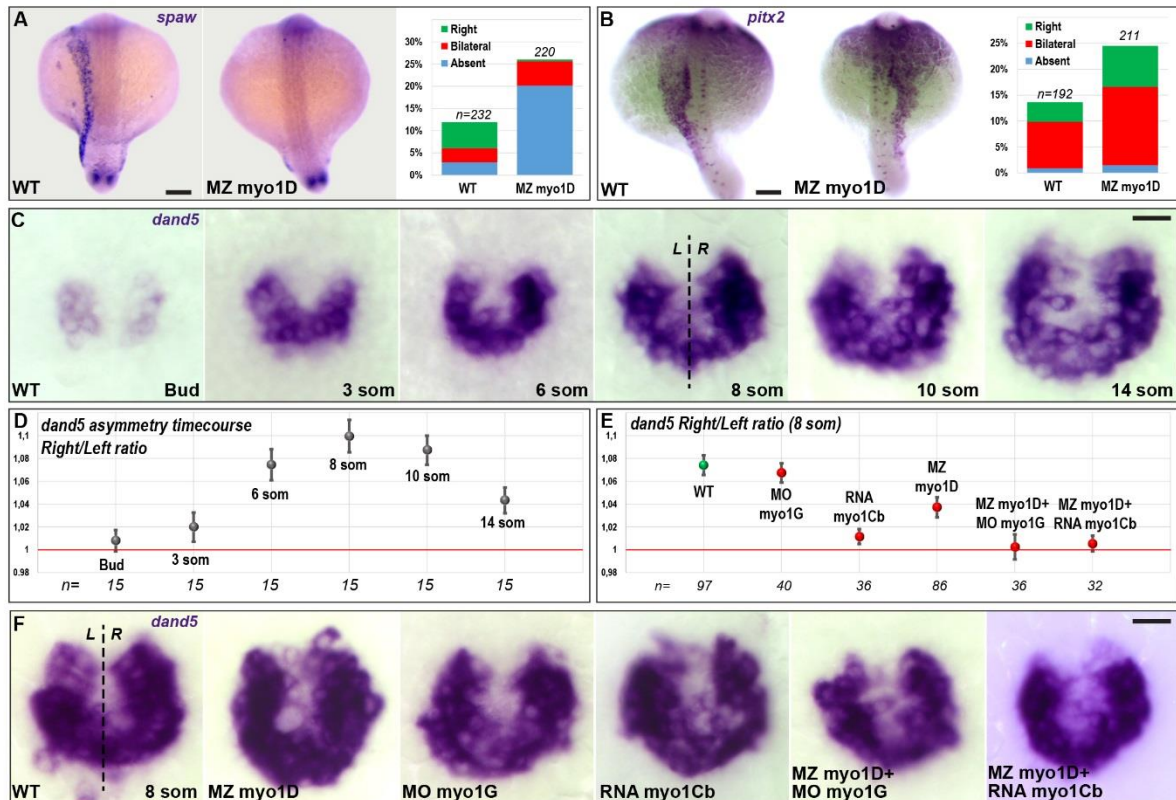


Figure 2: *myo1D* is required for Left/Right Organizer function. (A and B) Expression of *southpaw* (*spaw*) and *pitx2* in the left lateral plate mesoderm is impaired in MZ *myo1D* mutants (dorsal views, 18-somite stage, anterior up). (C) Evolution of *dand5* expression between the end of gastrulation (Bud) and 14 somites (dorsal view of the LRO, anterior up) (Same as Project 1 figure 24a). (D) Quantifications of the relative abundance of *dand5* transcripts on the left and right side of wild-type embryos reveal a peak of asymmetry at 8 somites (Same as Project 1 figure 24b). (E and F) *dand5* asymmetry is reduced in MZ *myo1D* mutants and abolished upon additional morpholino knock-down of *myo1G* (MO *myo1G*) or overexpression of *myo1Cb* (RNA *myo1Cb*). (F) Dorsal views of the LRO, anterior up. Error bars indicate SEM. Scale bars: (A and B) 50 μ m. (C and F) 20 μ m.

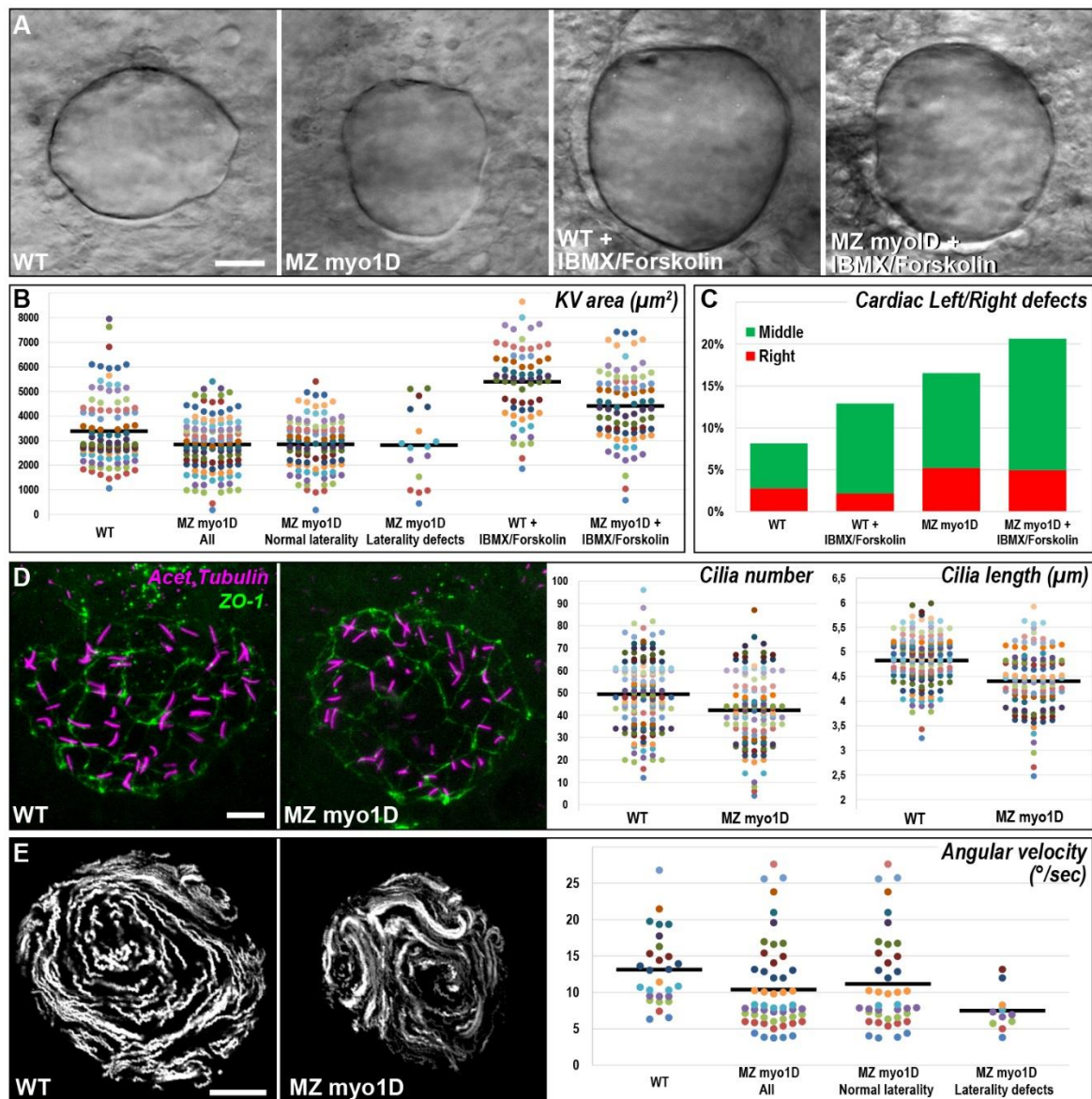


Figure 3: *myo1D* controls Left/Right Organizer flow. (A) MZ *myo1D* mutants (n=118) present a reduced KV size (WT n=104). Treatment with IBMX/Forskolin increases organ size in WT (n=66) and MZ *myo1D* mutants (n=85). (B) Dot plots of KV size in individual embryos. MZ *myo1D* mutant laterality defects occur independently of KV size. Horizontal bars represent mean values. (C) IBMX/Forskolin treatment does not rescue laterality in MZ *myo1D* mutants. (D) The number and size of cilia (acetylated tubulin) in the KV (ZO-1 positive cells) are reduced in MZ *myo1D* mutants. Dot plots represent number and average length of cilia in individual embryos (WT 141 embryos/6967 cilia; mutant 117/4939). (E) Trajectories of fluorescent microspheres in the KV reveal LRO flow defects in MZ *myo1D* mutants (n=53; WT n=28). Laterality defects correlate with pronounced reductions in angular flow velocity. (A, D, E) Dorsal views, anterior up, 8-somite stage. Scale bars: (A and E) 20 μm . (D) 10 μm .

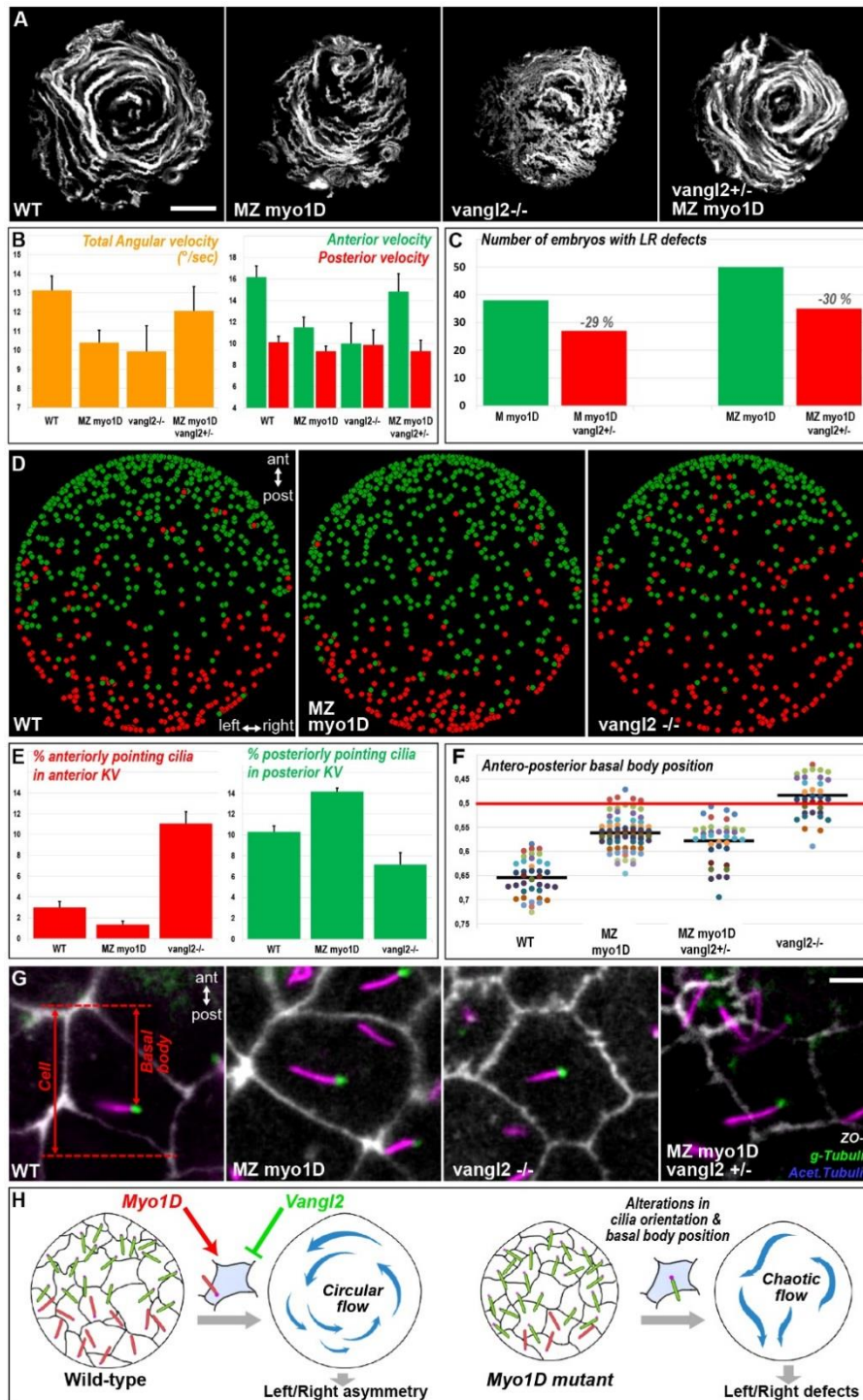


Figure 4: *myo1D* interacts with *vangl2* to control KV function. (A and B) MZ *myo1D* (n=53) and *vangl2* (n=21) mutants present a similar impairment of LRO flow (WT n=28). Flow pattern is partially restored in MZ *myo1D*; *vangl2*^{+/-} (n=20). (C) Removing one copy of *vangl2* reduces LR defects in *myo1D* mutants. (D) Positioning of cilia pointing to the anterior (red) or posterior (green) in WT, MZ *myo1D* and *vangl2* mutants. (E) *vangl2* mutants present an excess of anteriorly pointing cilia, while more posteriorly pointing cilia are present in MZ *myo1D*. (F) Dot plot of average basal body positions in individual embryos. Compared to WT (40 embryos/744 basal bodies), basal bodies are displaced anteriorly in MZ *myo1D* (74/1521) and *vangl2* (36/526) mutants, but partially restored to their posterior position in MZ *myo1D*; *vangl2*^{+/-} (37/826). Grey bars represent mean values. (G) KV cells with cilia (acetylated tubulin) and basal bodies (γ-Tubulin). (H) Schematic representation of Myo1D function in the KV. All data collected at 8 somites, anterior is up in all pictures. Error bars indicate SEM. Scale bars: (A) 20 μm. (G) 5 μm.

Materials and Methods

Fly strains and genetics

Flies were grown according to standard procedures. For inter-specific rescue experiments, the *UAS::zMyo1D* transgene (Zebrafish Myo1D ORF cloned into pUAST vector) was expressed either in *myo1D* depleted flies (*w¹¹¹⁸*; *ptc::GAL4*, *myo1D^{K1}*; *UAS::dmyo1D-RNAi* (22)) or in a *myo1D^{K2}* (22) null mutant background (*da::GAL4*; *myo1D^{K2}*)(*da::GAL4*, Bloomington Drosophila Stock Center #55851).

Rotation of the male genitalia was scored as previously described (36). Briefly, male genital plates are scored according to the angle made between the dorso-ventral and anus-penis axes when viewed from the posterior. Full dextral/clockwise (+360°) corresponding to the wild-type situation; partial sinistral/counterclockwise rotation (from -1 to -359°); full sinistral/counterclockwise rotation (-360°).

Zebrafish strains and embryo maintenance

Embryos were raised in 0.3x Danieau medium (17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.12 mM MgSO₄, 0.18 mM Ca(NO₃)₂, 1.5 mM Hepes, pH 7.6) at 28,5°C, and staged according to standard criteria (37). If necessary, 1-phenyl-2-thiourea (Sigma) was added at 30 mg/l to prevent pigmentation.

Crispr/Cas9 Mutagenesis

Crispr/Cas9 mutagenesis of zebrafish *myo1D* (Ensembl gene ENSDARG00000036863) was performed in a wild-type Tü background. gRNA design and *in vitro* transcription of Cas9 RNA were performed according to reported protocols (38). gRNA was transcribed from a template oligo as previously described (39). The sequence of the selected Crisp target site was 5'-GAGTGGAGCTGGAAAAACAG**AGG**-3' (bold lettering indicates the PAM motif). The efficiency of Crispr/Cas9-induced mutagenesis was monitored at 24 hpf using a T7 endonuclease assay (38) on a PCR amplicon comprising the Crispr target region (Forward primer: 5'-TCTTCACTGACACTGGTATG-3', Reverse primer: 5'-CCATCACTGCAGCAGAAATGAGAG-3'). Adult F0 fish were outcrossed to AB wild-type fish and DNA extracted from F1 progeny. Mutations were identified through direct sequencing of the same PCR amplicon that was used in the T7 endonuclease assay.

Zebrafish *myo1G* (Ensembl gene ENSDARG00000036104) was inactivated through Crispr/Cas9 mutagenesis at the target site 5'-GATGTCATTGAGGACTACAG**GGG**-3'. A pre-assembled complex of purified Cas9 protein (NEB, 954 ng/μl) and *myo1G* gRNA (200 ng/μl) was injected into one cell stage embryos and the cutting efficiency monitored using a T7 endonuclease assay on a *myo1G* PCR amplicon (Forward primer: 5'-GGAGAAGTAGTGGTGTCCGTTAAC-3', Reverse primer: 5'-CTCACTTTTGGGCTAACAGCTC-3').

Fish strains and molecular genotyping

The following lines were used for this work: Tg(-5.0*sox17*:EGFP)zf99 (40), Tg(*cm1c2*:RFP) (41), *vangl2^{m209}* (42).

Wild-type and mutant alleles of *myo1D* were identified through allele-specific PCRs. The allele-specific forward primers 5'-TGGAGCTGGAAAAAGGCTCGT-3' (*myo1D^{ij16b}*) and 5'-GTGGAGCTGGAAAAAGGCTATAC-3' (*myo1D^{ij16c}*) were used together with the generic reverse primer 5'-CCATCACTGCAGCAGAAATGAGAG-3' to genotype for the presence of different *myo1D* mutant alleles. PCR amplicon size was 133 bp for *myo1D^{ij16b}* and 145 bp for *myo1D^{ij16c}*. The wild-type *myo1D* allele was amplified using the forward primer 5'-AGAGTGGAGCTGGAAAAACAGA-3' and the reverse primer 5'-CCCATCCCTCGTGTGAAACTAAATCAC-3' to yield a 339 bp amplicon. PCR amplification with GoTagG2 polymerase (Promega) was performed using the following cycling conditions: Initial denaturation 2min 95°C; 10 cycles [30s 95°C, 30s 65°C first to 55°C last cycle, 30s 72°C]; 20 cycles [30s 95°C, 30s 55°C, 30s 72°C]; final extension 5min 72°C.

To generate maternal zygotic *myo1D* mutants (MZ *myo1D*^{ij16b/tj16b} or MZ *myo1D*^{ij16c/tj16c}), *myo1D* heterozygous fish were incrossed and the progeny raised to adulthood. PCR genotyping of these animals allowed identifying homozygous mutant as well as homozygous wild-type fish which were then used to produce MZ *myo1D*^{ij16b/tj16b} or MZ *myo1D*^{ij16c/tj16c} mutant embryos, as well as wild-type *myo1D*^{+/+} control embryos. *myo1D*^{ij16b} or *myo1D*^{ij16c} homozygous mutant animals presented similar laterality defects (Fig. 1, B and C). Unless mentioned otherwise, experiments were performed using the *myo1D*^{ij16b} allele.

For the genetic interaction experiment displayed in Fig. 4C, *myo1D*^{ij16b} homozygous mutant females were crossed with *myo1D*^{ij16b/+}; *vangl2*^{m209/+} males. A total of 912 embryos derived from 6 independent crosses were scored and molecular genotyping performed for all embryos presenting cardiac laterality defects. Genotyping for the *vangl2*^{m209} mutant allele was performed as previously described (43).

Plasmid generation

The *myo1Cb* ORF was amplified from a mixed stage pool of cDNAs using the primers: 5'-**GATCCCATCGATTTCGACGGAATCCGGGTCATGATG**-3' and 5'-**AGGCTCGAGAGGCCTTGGTCACGACTCGTCCATC**-3' and cloned into the pCS2+ vector. Bold letterings indicate primer overhangs that are also present in the pCS2+ sequence and were used to recombine insert and vector using Gibson assembly (NEB). A similar strategy was used to clone the *myo1D* ORF into pCS2+ using the primers 5'-**GATCCCATCGATTTCGACAGCTTATTATGGCAGAACACG**-3' and 5'-**AGGCTCGAGAGGCCTTAAATGGGATCCTGGTCCTCTAG**-3'.

RNA and morpholino injections

myo1Cb-pCS2+ was linearized with KpnI, *myo1Cb* RNA *in vitro* synthesized using the mMessage mMachine SP6 transcription kit (Ambion) and the resulting RNA injected at 50ng/μl. RNA encoding Arl13b-GFP was made as previously described (31) and injected at 20ng/μl. Two translations-blocking morpholinos (Gene Tools) were used: Myo1D, 5'-ACTTTCGTGTTCTGCCATAATAAGC-3' (injected at 750 μM); Myo1G, 5'-CCTCCAGCTCCGCCATCCCTGCAAC-3' (62.5 μM). All reagents were injected at the one cell stage at a volume of 0.88 pl together with 0.2% phenol red.

RNA in situ hybridizations

Whole mount RNA in situ hybridizations were performed as previously described (44). The following probes have been previously described: *cmhc2* (45), *foxa1/fkd7* (46), *lefty1* (47), *pitx2* (48), *sox17* (49), *southpaw* (26), *dand5/charon* (50). To generate a *myo1D* probe, *myo1D* was amplified from *myo1D*-pCS2+ using the following primers 5'-**CGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTCTAGAGGCTCGAGAGG**-3' and 5'-**GGCAAGACCAAAGTTTTTCATCCGC**-3'. The in situ probe was then synthesized directly from the PCR product using the incorporated T7 promoter (bold lettering). In situ hybridizations were documented using a Leica M205FA stereomicroscope equipped with an Infinity2-5C color CCD (Lumenera).

Immunohistochemistry

Dechorionated embryos were fixed overnight at 4°C in PEM (80 mM Sodium-Pipes, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) - 4% PFA - 0.2% TritonX100. After washing 2 x 5 min in PEMT (PEM - 0.2% TritonX100), 10 min in PEM - 50 mM NH₄Cl, 2 x 5 min in PEMT and blocking in PEMT - 2%BSA, embryos were incubated 2 hrs at room temperature with primary antibodies. Following incubation, embryos were washed during 5, 10, 15 and 20 min in PEMT, blocked in PEMT - 2%BSA, and incubated again with secondary antibodies for 2 hrs. Embryos were again washed during 5, 10, 15 and 20 min in PEMT, mounted in PEM-0,75% LMP-Agarose and analyzed on a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope. The following primary antibodies were used in this study: Mouse@ZO-1 (1:250, Invitrogen 33-9100), Mouse@Acetylated Tubulin (1:2000, Sigma T7451) and Rabbit@γTubulin (1:250, Sigma T5192). The secondary antibodies Goat@MouseIlgG1-Alexa568, Goat@MouseIlgG2b-

Alexa647 and Goat@Rabbit-Alexa488 were all obtained from Invitrogen and used at a dilution of 1:500.

Pharmacological treatments

Stock solutions of IBMX (100mM, Sigma) and Forskolin (10mM, Sigma) were prepared in DMSO. Ouabain (1mM, Sigma) was prepared in distilled water. Embryos were treated from bud stage onwards with 10 μ M Forskolin/40 μ M IBMX, or 5 μ M Ouabain, (all diluted in 0.3x Danieau). After imaging at the 8-somite stage, reagents were again washed off in Danieau medium.

Microinjection and tracking of fluorescent beads in the Left/Right Organizer

Fluoresbrite Polychromatic Red Microspheres 0.5 μ m (Polysciences) were manually injected into the KV lumen. The movement of fluorescent beads was imaged on a wide field Zeiss Axio Observer Z1 microscope with a 40X EC Plan-Neofluar PH/DCII NA 0.75 dry objective using an Andor Neo sCMOS camera and a DsRed filter. In this setup we obtained images with a pixel width of 0.1625 μ m and recorded the KV flow for 2 minutes with a frame interval of 0.04s. Automated tracking of fluorescent beads was performed using a custom-made ImageJ script (available on request). The macro generates an automated tracking file that is compatible with the ImageJ MTrackJ plugin. Following automated detection, tracks were manually curated using MTrackJ to correct for any errors of the tracking algorithm and the tracking parameters exported in a .CSV datasheet for further analysis. Using this procedure, an average of 41624 tracking points were obtained per embryo. KV images were oriented precisely along the antero-posterior axis based on the position of the notochord as well as the characteristic indentation that is found at the anterior pole of the KV in the region where cells are most closely packed (51). The center of the KV was defined as the point lying midway between the anterior and the posterior extremity of the KV on a line that extends posteriorly from the anterior pole of the KV. The angular flow velocities displayed in Figs. 3 and 4 were calculated using the center of the KV as the point of origin of a polar coordinate system.

Quantification of ciliary orientation

KV motile cilia were labeled using Arl13b-GFP RNA microinjection and imaged on a Zeiss710 laser scanning confocal microscope. The entire KV was scanned with z-sections distant by 0,2 μ m and a time interval of 0.48s between two consecutive planes. Movies were then treated in ImageJ with a Mean 3D filter (x radius=1, y radius=1, z radius=10) to visualize the ciliary rotation cone and be able to orient it from base to tip (center of the cone). Each cilium was drawn on the KV using the ImageJ arrow tool. Cilia positions and angles were then extracted from the arrow ROIs using a custom-made ImageJ script. To compare the position and orientation of cilia in different embryos as shown in Fig. 4D and fig. S6, the relative positions of different cilia were normalized in the common space of a circular virtual KV. Each cilium was placed on the virtual KV according to its relative radial position with respect to the organ border. ImageJ scripts are available on request.

Quantification of the antero-posterior positioning of the ciliary basal body

Confocal Z-stacks of the entire KV were acquired with a distance of 0,6 μ m between two consecutive planes. The KV was oriented along the antero-posterior axis based on the position of the notochord. Basal bodies were identified as γ -Tubulin positive spots that are located at the base of an acetylated tubulin-positive ciliary axoneme. The junctional marker ZO-1 was used to outline KV cells and determine the antero-posterior extent of each cell. We restrained our analysis to cells for which the entire outline could be unambiguously identified in the ZO-1 channel. As the KV is an ellipsoid structure, this applies essentially to the cells of the dorsal roof and ventral floor of the KV. Based on this criterium, we were able to determine the antero-posterior position of an average of 19.4 basal bodies per embryo. The antero-posterior location of the basal body was quantified by calculating the ratio between the distance of the basal body from the anterior-most limit of the ZO-1 signal and the full

antero-posterior length of the cell inferred from the ZO-1 signal. According to this convention, a value of 0 would indicate a basal body that is located at the anterior extremity of the cell, while a value of 1 would correspond to an extreme posterior location.

***dand5/charon* quantification**

dand5/charon in situ hybridization pictures were analyzed with ImageJ. A bounding rectangle was fit on the *dand5* expression domain and the mean grey levels of the left and right part of the rectangle measured. Dand5 Right/Left enrichment was determined as the ratio between right and left mean grey levels as previously described (52). The temporal evolution of *dand5* asymmetry displayed in Fig. 2C was determined in an ABTÜ wild-type control background.

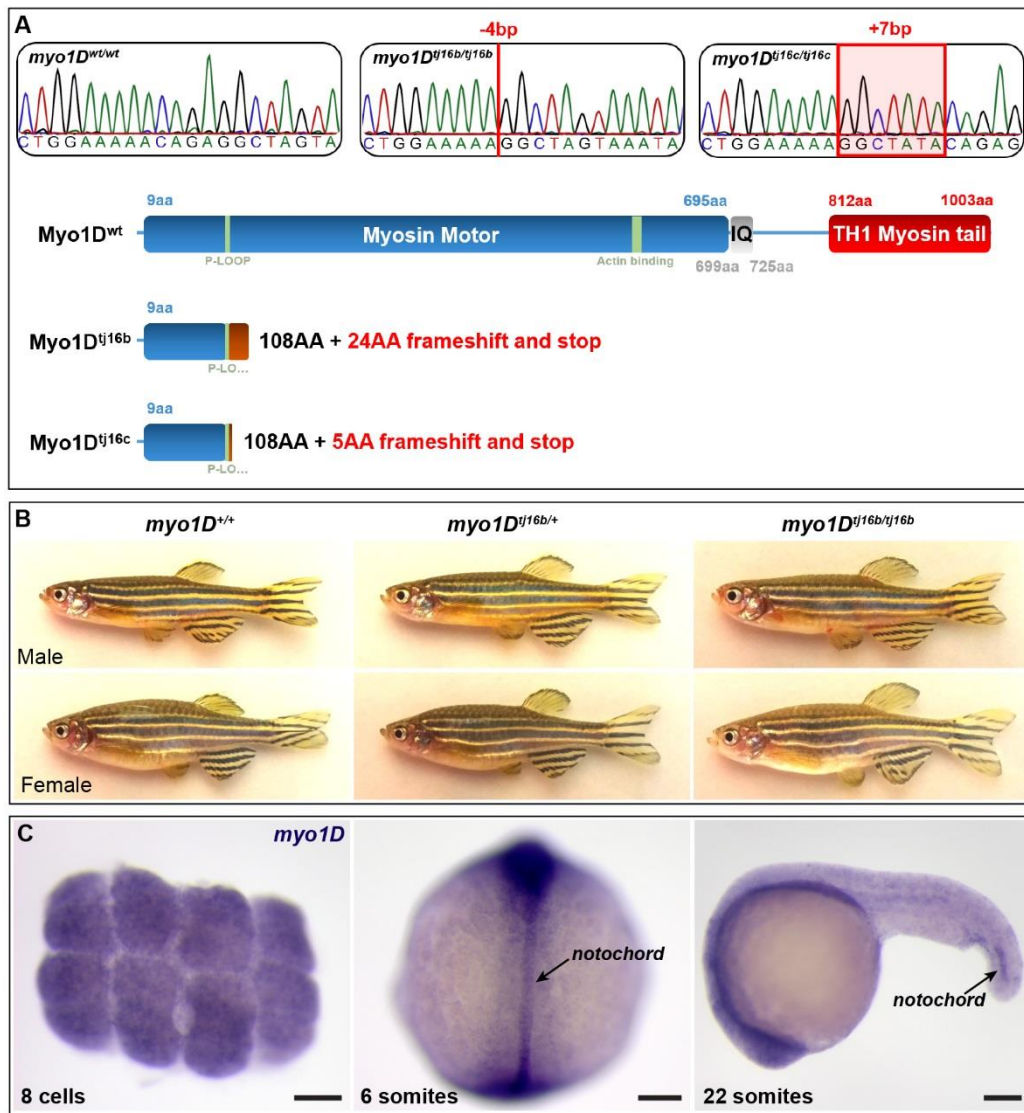


Figure S1: Genetic inactivation of zebrafish *myo1D*. (A) Sequence chromatograms and schematic representation of protein products of *myo1D* mutants generated by Crispr/Cas9 mutagenesis. (B) *myo1D* homozygous mutant adult fish are indistinguishable from heterozygous or homozygous wild-type siblings. (C) Whole-mount *in situ* hybridization reveals that *myo1D* transcripts are maternally supplied and can be detected at the 8-cell stage (animal pole view), well before the activation of the zygotic genome. Zygotic *myo1D* transcripts are present at low levels throughout the embryo. At the 6-somite stage, increased transcript levels are moreover detected in the notochord (dorsal view, anterior up). At the 22-somite stage the notochordal expression becomes restricted to the posterior part of the organ (lateral view, anterior to the left). Scale bars: 100 μ m.

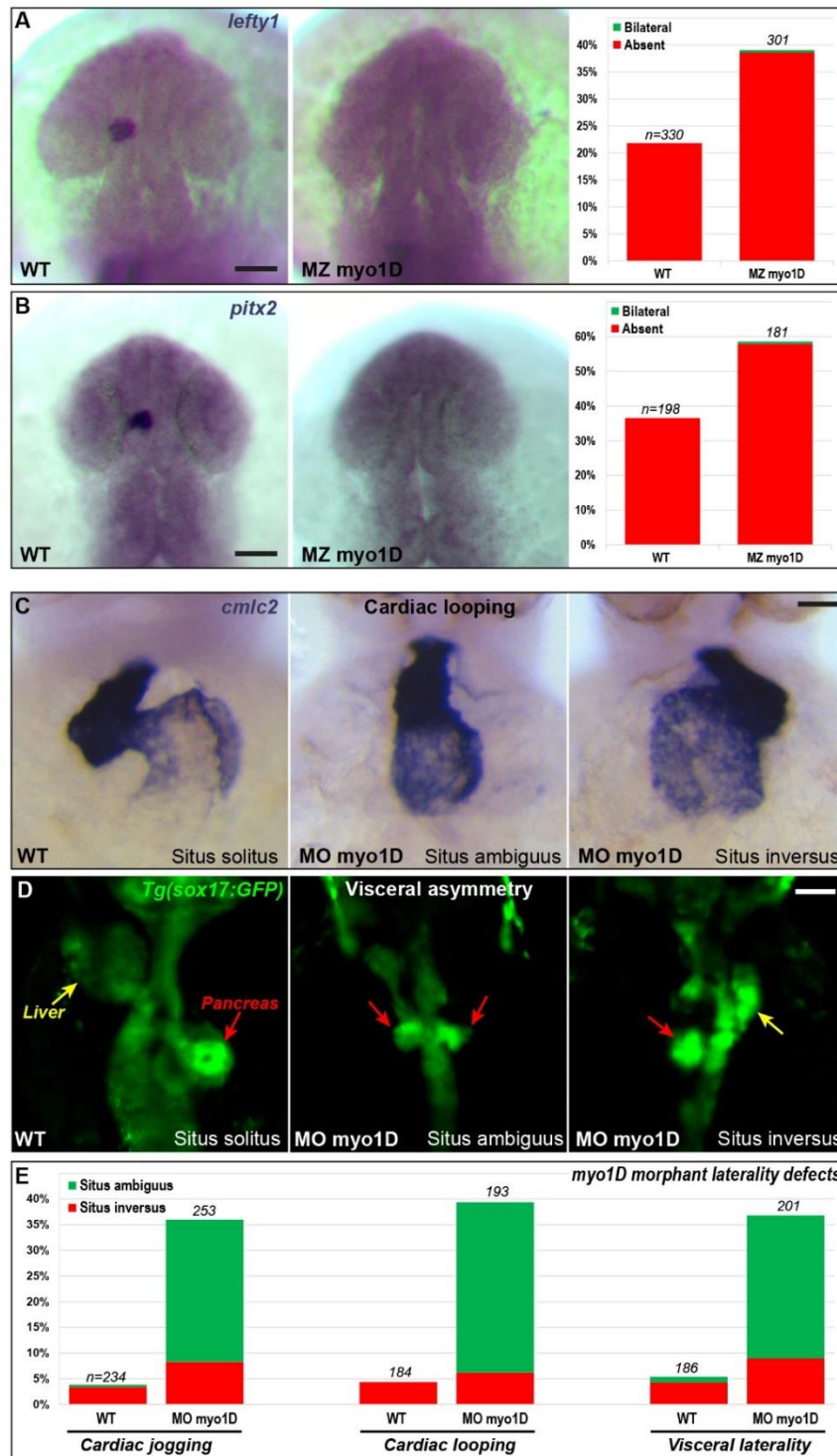


Figure S2: Zebrafish *myo1D* controls Left/Right asymmetry in the brain, heart and viscera. (A and B) Asymmetric expression of *lefty1* and *pitx2* is impaired in the brain of MZ *myo1D* mutant animals. (A) Dorsal views (anterior up) of *lefty1* (22-somite stage) and (B) *pitx2* (25-somite stage) expression. (C to E) Morpholino knock-down of *myo1D* elicits laterality defects at the level of the heart and viscera. (C) Frontal views of the *cmc2*-expressing heart at 48 hpf, dorsal up. (D) Dorsal views (anterior up) of visceral organs highlighted by a *sox17:GFP* transgene. *myo1D* knock-down impairs the leftward looping of the gut as well as the lateralized development of the liver (yellow arrow) and pancreas (red arrow). Scale bars: (A and B) 30 μ m. (C) 20 μ m. (D) 50 μ m.

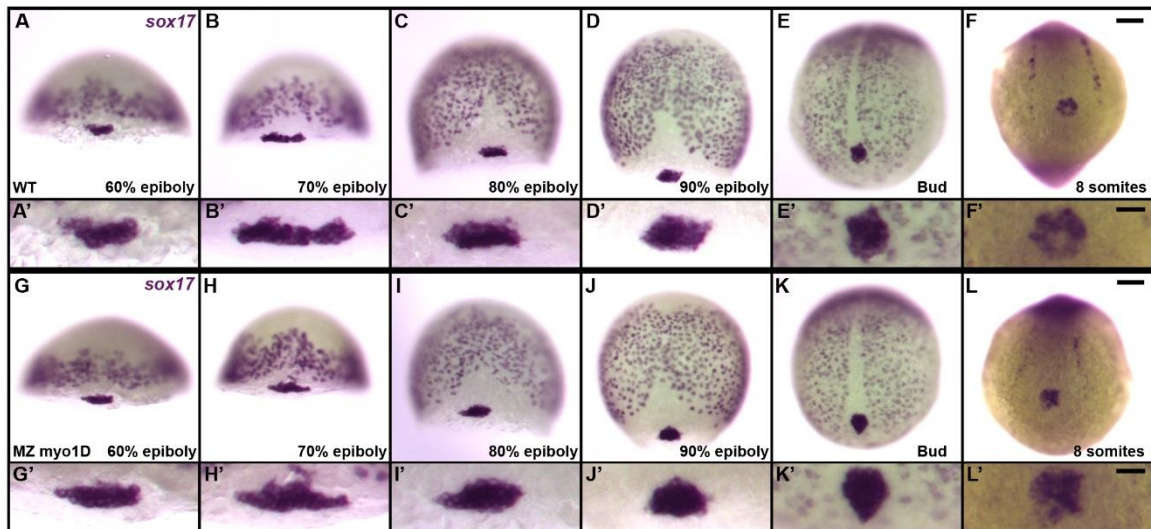


Figure S3: Zebrafish *myo1D* is not required for the specification and migration of Left/Right organizer precursor cells. (A to L) *sox17* in situ hybridization marks scattered endodermal cells as well as the posterior cluster of dorsal forerunner cells that give rise to Kupffer's Vesicle (KV). The upper pictures represent low magnification views of the whole embryo. The lower panels show high magnification views of the KV precursor cells. Comparison of WT and MZ *myo1D* mutant embryos reveals no differences in the number and behavior of KV precursor cells. (A to D, G to J) Dorsal views, anterior up. (E, F, K, L) Vegetal views of the tail bud region at the end of gastrulation (bud stage) and the 8-somite stage, anterior up. Scale bars: (A to L) 50 μm . (A' to L') 20 μm .

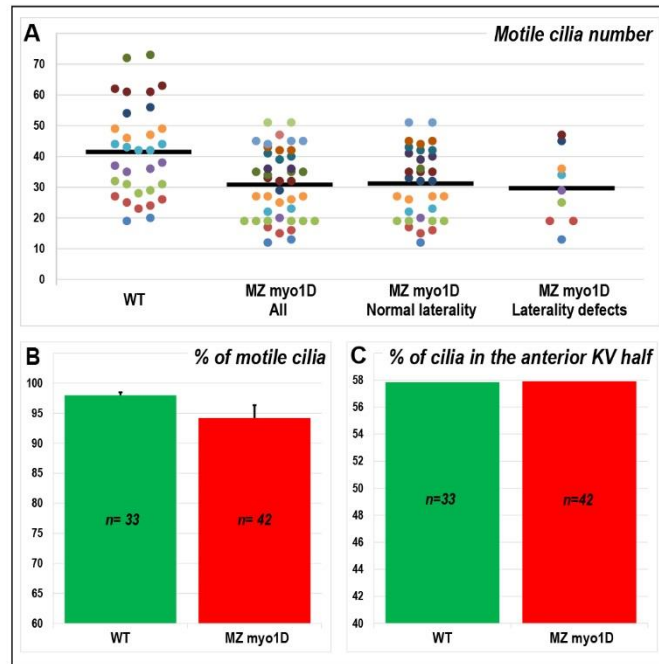


Figure S4: Zebrafish *myo1D* is dispensable for ciliary motility. (A to C) High speed confocal imaging of Arl13b-GFP labelled cilia was used to analyze the number, motility and positioning of Kupffer's Vesicle (KV) cilia. (A) Dot plot representing the number of motile cilia in individual embryos. MZ *myo1D* mutants display a lower cilia number, but this decrease does not correlate with the occurrence of laterality defects. Horizontal grey bars indicate mean values for different data sets. (B) *myo1D* loss of function does not impair ciliary motility. Error bars indicate SEM. (C) In both WT and MZ *myo1D* mutant animals, the majority of cilia are located in the anterior half of the KV. All data were collected at the 8-somite stage.

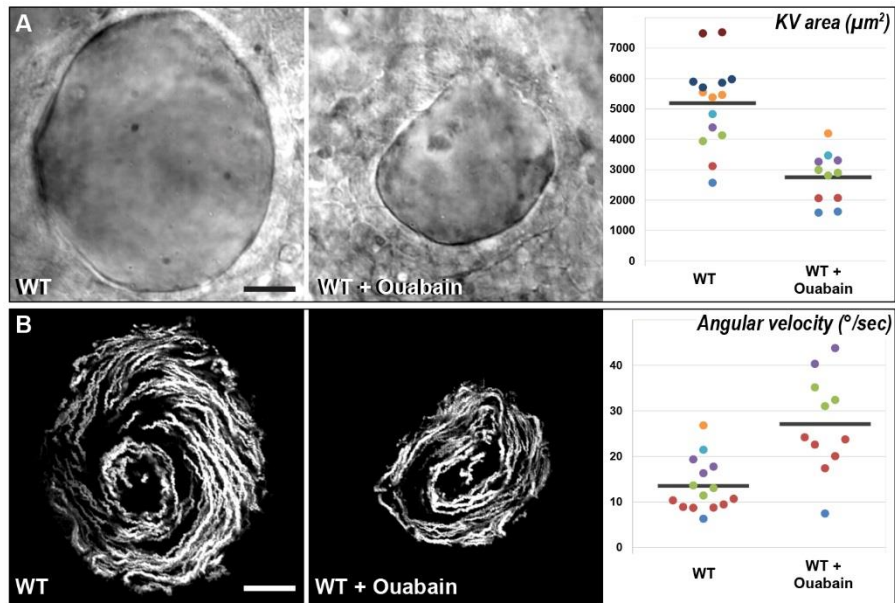


Figure S5: The velocity of the zebrafish Left/Right Organizer flow increases upon pharmacological reduction of organ size. (A) Ouabain treatment of WT embryos inhibits lumen inflation of Kupffer's Vesicle (KV) and thereby reduces organ size. Brightfield images of the equatorial plane of control (n=15) and Ouabain-treated embryos (n=11). The dot plot represents the KV equatorial surface area for individual embryos. Horizontal grey bars represent mean values. (B) Temporal projections of the trajectories of fluorescent microspheres in the KV lumen of the embryos displayed in (A). Both WT control and Ouabain-treated embryos display a circular flow pattern. The angular velocity of the KV flow is increased upon Ouabain treatment. All pictures are dorsal views of 8-somite stage KVs, anterior up. The WT control embryos displayed in this figure are part of the data set that is also used in Fig. 3E. Scale bars: 20 μm .

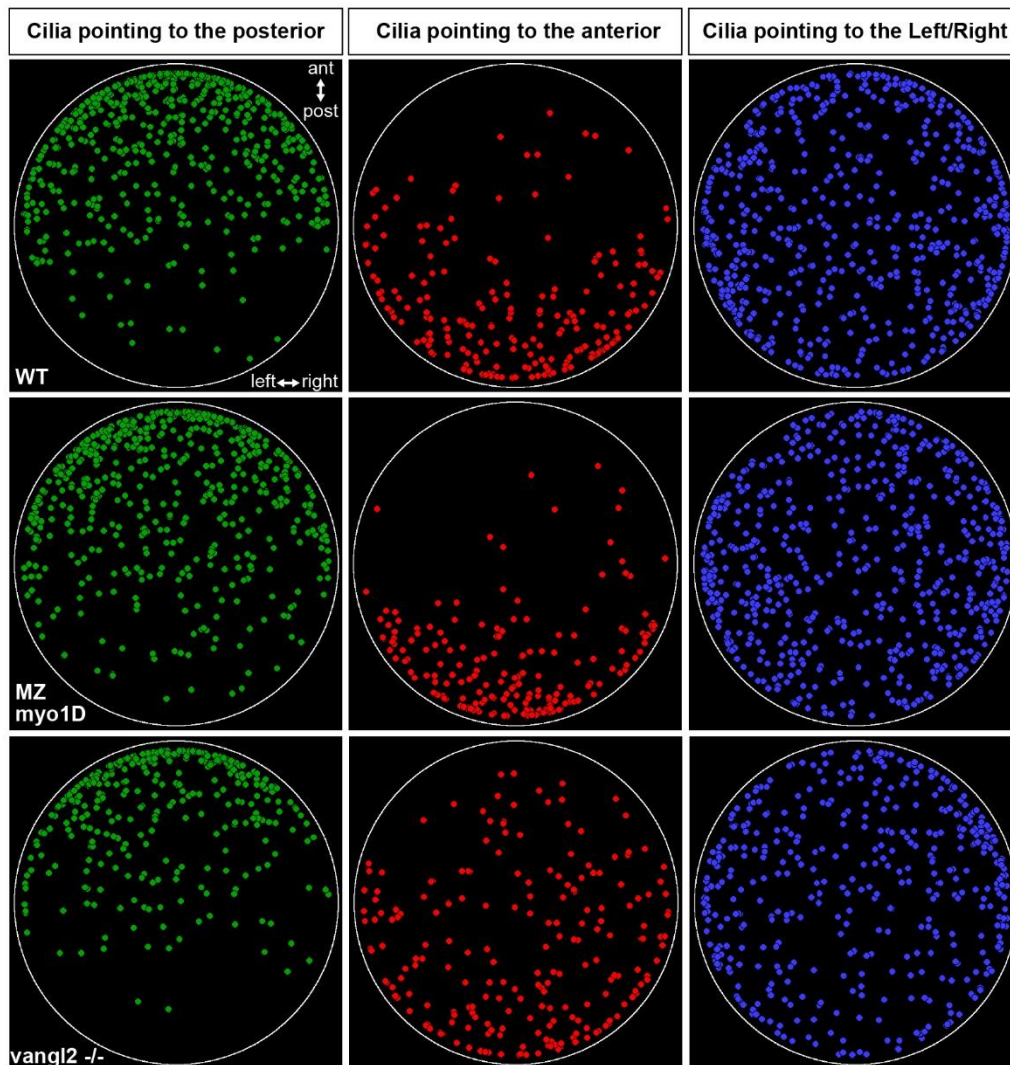


Figure S6: Zebrafish *myo1D* and *vangl2* have opposite effects on cilia orientation in the Left/Right Organizer. The orientation of ciliary rotation cones in Kupffer's Vesicle (KV) was determined using high-speed confocal imaging of Ar113b-GFP labelled embryos. Plots indicate the position of cilia within the KV of WT (n=33 embryos/1369 cilia), MZ *myo1D* (n=42/1296) and *vangl2* (n=31/966) mutant embryos. Cilia were categorized according to their orientation: Green dots indicate cilia that point towards the posterior side of the KV with a deviation from the antero-posterior axis of no more than 45°. Red dots indicate cilia that point towards the anterior side of the KV with a deviation of no more than 45° from the antero-posterior axis. All other cilia are indicated by blue dots. Each plot is a cumulative representation all the cilia of a given genotype in the space of a normalized virtual KV. Note that posteriorly pointing cilia invade the posterior KV in MZ *myo1D* mutants, while an excess of anteriorly pointing cilia is present in the anterior KV of *vangl2* mutants. The embryos in this figure correspond to the data set that is also displayed in Fig. 4, D and E.

III- Discussion et perspectives

III-1- Projet 1 : Etude du rôle d'ESCRT et de la dynamique de transport de vésicules dans la latéralité

III-1-a- ESCRT et asymétrie droite/gauche chez le poisson-zèbre

- *Organisateur droite/gauche et vésicules Chmp1b-positives*

Nous avons montré que des vésicules positives pour le composant ESCRT Chmp1b étaient présentes dans la lumière de l'organisateur D/G. Cette découverte nous a fait nous interroger sur le rôle de telles vésicules dans l'établissement de l'asymétrie D/G. En effet des vésicules extracellulaires ont déjà été supposées jouer un rôle dans l'asymétrie D/G chez la souris (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005). Dans ce cas, il est possible de visualiser les vésicules *in vivo*, par l'intermédiaire d'un marqueur fluorescent lipophile. Ces vésicules sont donc bien constituées d'une membrane lipidique, et peuvent être par conséquent être qualifiées d'exovésicules. Dans la KV, nous n'avons pas encore été capables de visualiser ces vésicules avec des marqueurs membranaires, et cela demeure une piste à suivre si nous voulons les rapprocher de ce qui peut être trouvé chez la souris. Si ce sont bien des exovésicules, il serait judicieux de tenter de visualiser des marqueurs exovésiculaires connus comme les tétraspanines CD9, CD63 ou CD81, ou d'autres membres du complexe ESCRT comme Tsg101 ou Alix, à leur surface (Baietti et al. 2012). Pour l'heure, nous ne disposons pas non plus de moyens de visualiser le déplacement des vésicules Chmp1b *in vivo*. Notre tentative pour créer une protéine de fusion Chmp1bGFP est restée infructueuse, avec un signal GFP ne récapitulant pas le signal de l'anticorps Chmp1b. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la GFP serait délétère à la fonction ou au repliement de Chmp1b, et d'autres tentatives seront nécessaires pour créer une protéine de fusion fonctionnelle. La visualisation du déplacement de ces vésicules *in vivo* est essentielle à l'étude de la dynamique de leur sécrétion et leur réception. Chez la souris, les NVP sont sécrétées de façon aléatoire sur toute la surface du nœud, mais réceptionnées avec un biais latéralisé à gauche. Cela est-il également le cas chez le poisson-zèbre ?

Une autre de nos interrogations, si les vésicules Chmp1b ont un rôle dans l'établissement de la latéralité, est la nature de l'information qu'elles transportent. Chez la drosophile, notre équipe a récemment collaboré à la démonstration du fait que le complexe ESCRT pouvait être responsable du transport extracellulaire du morphogène Hedgehog (Matusek, Wendler, Poles, et al. 2014). Chmp1 est retrouvé colocalisant avec Hedgehog dans l'espace extracellulaire des disques d'ailes, et participe à l'activation de ses cibles à longue distance.

Le complexe ESCRT peut donc être responsable du transport extracellulaire de molécules de signalisation au cours du développement. Une autre piste à suivre serait donc de cribler des molécules susceptibles d'être transportées dans le milieu extracellulaire au niveau de l'organisateur D/G afin de briser la symétrie. Dans ce contexte, plusieurs candidats potentiels ont déjà été liés à l'établissement de l'asymétrie D/G. Le premier et plus évident est la voie de signalisation Hedgehog, dont les ligands ont été montrés au niveau des NVP chez la souris. L'injection de protéines de fusion chez le poisson-zèbre pour les ligands Shha/b et Ihhb, ainsi que des hybridations in situ pour des cibles d'Hh comme *patched*, pourraient nous en apprendre davantage. Une deuxième voie potentielle serait celle de la signalisation polycystin, et notamment *pkd2*. *Pkd2* est essentiel à l'acquisition d'une asymétrie D/G chez le poisson-zèbre (Yuan et al. 2015), et a été montré que comme présent sur des exovésicules chez le *C.Elegans* (Wang et al. 2015). L'utilisation de protéines de fusion et d'anticorps contre *Pkd2* serait ici utile. Une troisième voie est la signalisation Delta/Notch, qui a également été liée à l'asymétrie D/G chez le poisson-zèbre (Sampaio et al. 2014). Deux ligands de cette voie (*deltaD* et *C*) notamment sont retrouvés exprimés dans la région de la KV. Les mutations pour ces deux gènes ne sont pas létales, et peuvent donc être utilisés dans un contexte maternel-zygotique. Quatrièmement, la signalisation FGF, qui a été montrée chez la souris pour être responsable du relargage des NVP. Son blocage par des inhibiteurs pharmacologique (SU5402) ou des dominant-négatifs et l'impact au niveau des vésicules *Chmp1b* serait d'un intérêt particulier. Finalement, la signalisation TGF- β , et notamment le ligand *dand5*. Il s'agit du transcrit latéralisé le plus précoce, et présente dans un premier temps une expression bilatérale, qui se latéralise ensuite (Lopes et al. 2010). Nous avons montré que la protéine *Dand5* était essentielle à sa propre expression latéralisée par l'utilisation d'un morpholino inhibant la traduction (non montré dans ce manuscrit). Il serait ainsi intéressant de visualiser la présence de la protéine *Dand5* dans le flux par le biais ici aussi de protéines de fusion.

- *Perte de protéines ESCRT et latéralité des organes.*

Afin d'étudier plus en détail le rôle du complexe ESCRT dans l'établissement de l'asymétrie D/G, je me suis intéressé aux effets de perte de fonction de certains de ses composants comme *vps4a*, *vps4b*, *chmp1a* et *chmp1b*. Les pertes de *vps4a*, *vps4b* et *chmp1a* entraînent des défauts de latéralité tandis que ce n'est pas le cas de *chmp1b*. Une des questions que l'on peut se poser est l'efficacité de la mutation de *chmp1b*, le mutant est-il null ou seulement hypomorphe ? Le mutant MZ *chmp1b* est déplété de la deuxième moitié du locus, en plus de présenter une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture précoce. De plus les mutants MZ *chmp1b* présentent des phénotypes de pigmentation, et ne survivent que jusqu'à un âge maximum d'environ 1 an, en comparaison de poissons sauvages qui

survivent 2 à 2 ans et demi (non montré dans le manuscrit). Il est donc probable que dans ces poissons, la fonction de Chmp1b ait bien été supprimée. On peut donc en conclure que, bien que Chmp1b se trouve sur des vésicules dans la KV, si celles-ci sont effectivement impliquées dans l'établissement de l'asymétrie D/G, Chmp1b est dispensable à leur fonction. Dans le cas du double mutant zygotique pour *vps4a/vps4b* qui ne présente pas de défauts de latéralité, la situation est différente. Nous avons montré que *vps4a* et *vps4b* étaient pourvu maternellement, et les outils utilisés pour supprimer leur fonction ont été contrôlés à de nombreux niveaux, avec un sauvetage du phénotype du morpholino, et l'utilisation d'un outil indépendant, un dominant-négatif, montrant les mêmes défauts. Les deux mutants sont homozygote létaux au cours du développement. Les mutants *vps4a* meurent à un stade indéterminé durant la période juvénile, il n'est simplement pas possible de récupérer des homozygotes après 3 mois lorsque les poissons sont adultes. Les mutants *vps4b* meurent entre 60 et 72h, l'embryon se nécrosant très rapidement dans son ensemble (non montré dans le manuscrit). Différentes solutions peuvent être envisagées afin de réaliser des mutants maternels zygotique dans ce cas. La première est par la transplantation de cellules germinales mutantes dans des embryons sauvages (Ciruna et al. 2002). La deuxième par l'utilisation d'une version de Cas9 traduite seulement dans les cellules germinales, grâce à une fusion avec le 3'UTR de *nanos* (Moreno-Mateos et al. 2015). La dernière consiste en un sauvetage du phénotype précoce de mort en injection l'ARN codant pour le gène absent (Grimes et al. 2016). Cependant, ces techniques ne sont efficaces que si les cellules germinales mutées survivent. Compte tenu du phénotype de mort cellulaire généralisé visualisé pour le mutant *Vps4b*, ces techniques restent donc très indécises. Pour avoir l'espoir de créer un mutant maternel zygotique pour ces gènes, il faudra donc par exemple injecter un ARN GFP couplé au 3'UTR de *nanos* afin de visualiser si les cellules germinales sont toujours présentes.

De plus, compte tenu de la variété des mécanismes cellulaires contrôlés par la machinerie ESCRT, il est possible que le phénotype de latéralité que l'on visualise ne puisse être que partiel, car les morpholinos et dominant-négatifs *Vps4b* n'ont été injectés qu'à une dose contrôlée. Dans ce contexte, la création d'une lignée transgénique exprimant le dominant-négatif de *Vps4b* de façon inductible par choc thermique peut être envisagé. Cela constituerait le premier outil génétique de contrôle temporel de l'activité ESCRT chez un organisme modèle vertébré.

J'ai eu finalement l'occasion au cours de ma thèse de réaliser des mutants pour d'autres gènes du complexe ESCRT, comme *tsg101a* et *alix*. L'analyse précise de leur phénotype n'a pas encore été réalisée, mais cela sera d'intérêt majeur compte tenu du rôle de ces protéines de manière générale dans la biosynthèse d'exovésicules. En outre, des combinaisons de perte de fonction d'autres composants ESCRT dans un fond mutant

chmp1a ou *chmp1b*, qui ne sont pas létaux homozygotes individuellement au cours du développement peuvent être envisagés.

- *Perte de fonction ESCRT et signaux précoces de latéralité.*

Les protéines ESCRT Vps4a, Vps4b et Chmp1a peuvent donc être impliqués dans le développement d'organes latéralisés. Mais sont-ils requis de façon tardive dans ces processus, ou plus précocement de façon dépendante de l'organisateur D/G ? Dans un premier temps, nous avons regardé l'impact de la perte de *vps4b* et *chmp1a* dans la latéralité de *spaw*, exprimé dans le mésoderme latéral, en aval de l'organisateur et en amont des organes latéralisés. Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisés sur la latéralité de *dand5*, exprimé directement dans les cellules de la KV. La latéralité de ces deux gènes est perturbée lorsque l'on inhibe *vps4b* ou *chmp1a*. Le transfert de l'information des cellules de la KV jusqu'au mésoderme latéral ne semble donc pas être responsable des phénotypes de latéralité des organes observés. De plus, *vps4b* apparaît comme étant requis spécifiquement dans les cellules de la KV pour assurer sa fonction dans la latéralité.

Un niveau de transfert d'information manque toutefois à l'analyse, car n'est pas encore tout à fait compris. Il s'agit du transfert de l'information du flux vers le gène *dand5*, qui est en débat actuellement. Il a été montré que *dand5* devient latéralisé après les premiers signaux calciques asymétriques (Yuan et al. 2015). Néanmoins une relation de cause à effet entre ces deux facteurs reste encore à déterminer. Il serait donc intéressant dans les cas de perte de *vps4b* et *chmp1a* de s'intéresser aux premiers événements calciques asymétriques pouvant être observés, les oscillations calciques à 3 somites visualisables dans les cils.

Dans un autre registre, la possibilité d'injection de morpholinos ou d'ARN spécifiquement dans les cellules précurseurs de la KV peut être utilisée pour étudier plus en détail l'activité d'autres protéines du complexe ESCRT dans la latéralité. Il pourrait également être envisagé d'utiliser le système UAS-Gal4 afin de surexprimer des versions dominantes-négatives de protéines ESCRT spécifiquement dans les cellules de la KV et ses précurseurs grâce à des promoteurs spécifiques comme *sox17*.

- *Ciliogenèse des cils motiles et flux de la KV en condition de déplétion ESCRT.*

Après avoir montré que l'activité de Vps4b et Chmp1a était requise au niveau des cellules de la KV ou en amont pour permettre la mise en place d'une bonne latéralité, nous nous sommes intéressés à la fonction de l'organisateur D/G. Si la perte de fonction de *vps4b* et *chmp1a* entraîne des défauts en amont de la KV, ou directement au niveau de celle-ci, cela doit se traduire dans la plupart des cas en défauts de flux dans la lumière. De plus, une des causes les plus fréquentes de perturbation du flux est un défaut de formation de cils dans la KV. Nous avons donc observé les effets de la perte de Vps4b et Chmp1a dans la mise en

place du flux, ainsi que sur la formation de cils motiles fonctionnels dans la KV. Le pourcentage de cils motiles dans la KV à 8 somites ne semble pas affecté par la déplétion de *vps4b* et *chmp1a*. De plus, les KV n'apparaissent pas comme présentant une taille réduite ou avec des défauts de formes, qui sont des paramètres pouvant entraîner des défauts de latéralité (Gokey et al. 2016, Wang et al. 2011). En ce qui concerne les cils, d'autres paramètres pourraient également être observés comme leur taille et leur nombre, qui sont également connus comme générant des défauts d'asymétrie s'ils sont réduits.

Les cils motiles de la KV sont donc présents en proportion normale à 8 somites. Mais qu'en est-il à des stades plus précoces ? A 3 somites, quand les premiers signaux calciques commencent à être asymétriques, les cils de la KV sont principalement immotiles (Yuan et al. 2015). Mais il ne s'agit pas d'une population de cil particulier, qui serait ensuite remplacé par des cils motiles afin de renforcer le flux. Ce sont les mêmes cils, qui acquièrent ensuite la motilité (Tavares et al. 2017). En outre, l'importance spécifique des cils immotiles précoces dans la latéralité n'est toujours pas déterminée chez le poisson-zèbre. Il serait donc intéressant de vérifier si en condition de perte de fonction *vps4b* et *chmp1a*, le ratio plus précoce motile/immotile n'est pas perturbé.

Un impact de la perte de *vps4b* et *chmp1a* sur les cils de la KV ou des événements plus précoces auraient des conséquences sur le flux de liquide. Celui-ci n'est cependant pas affecté en termes de vitesse globale, au contraire de l'utilisation du morpholino contre *Irrc50* qui entraîne une immotilité ciliaire et une diminution de la vitesse. Le flux ne présente néanmoins pas une vitesse uniforme, et une accélération antérieure peut être observée (Wang et al. 2011). Lorsque celle-ci est absente, la vitesse générale du flux de la KV en est affectée, mais le mouvement circulaire est toujours présent. Il serait ainsi important de consolider cette donnée en s'intéressant plus en détail aux paramètres de vitesse angulaire chez les morphants *vps4b* et les mutants MZ *chmp1a*, et notamment l'accélération antérieure.

- *ESCRT et vésicule Chmp1b dans la KV.*

Le flux de la KV présente donc une vitesse normale, tandis que les signaux asymétriques précoces comme *dand5* sont perturbés. Que se passe-t-il entre l'interprétation du signal du flux et l'initiation d'une asymétrie pour les embryons déplétés pour *vps4b* ou *chmp1a* ? Nous avons observé que les vésicules positives pour Chmp1b présentes dans la lumière de la KV étaient diminuées en nombre suite à la perte de *vps4b*. L'expérience n'ayant pas encore été réalisée avec les mutants MZ *chmp1a*. En l'absence d'autres défauts majeurs constatés dans le fonctionnement de l'organisateur, cela suggère que les vésicules Chmp1b pourraient jouer un rôle dans la latéralité. Les vésicules Chmp1b sont non seulement moins présentes dans la lumière de l'organe, mais on n'observe pas non plus d'accumulation de vésicules

Chmp1b au niveau de la membrane, qui pourraient être bloquées. On ne peut donc pas tirer de conclusion précise sur le rôle de Vps4b dans la biogenèse ou la sécrétion de ces vésicules. De plus, comme on ne dispose pas de deuxième marqueur pour ces vésicules, on ignore si elles sont toujours présentes sans présenter Chmp1b, ou si elles sont absentes. L'absence de phénotype observé chez le mutant MZ *chmp1b* tendrait à favoriser une hypothèse stipulant que ces vésicules peuvent être présentes dans le flux, sans la protéine Chmp1b, mais cela reste à démontrer.

Dans le modèle de la drosophile, la perte de fonction ESCRT entraîne une accumulation de Hedgehog au niveau de la membrane (Matusek, Wendler, Polès, et al. 2014). ESCRT est important pour la sécrétion ectosomale de Hedgehog, mais pas pour l'adressage du cargo à la membrane. Chez le poisson-zèbre, il serait ainsi intéressant de visualiser la rétention potentielle d'autres composants ESCRT ou des molécules de signalisation citées précédemment au niveau de la membrane de la KV en l'absence de *vps4b*.

III-1-b- Flux de la vésicule de Kupffer et transport asymétrique de matériel extracellulaire

- *Transport asymétrique de vésicules dans la KV.*

Bien que l'on ne puisse pas suivre *in vivo* la trajectoire des vésicules Chmp1b dans la KV, il est toutefois possible d'étudier le transport extracellulaire de matériel dans le flux. Des vésicules sont présentes de manière endogène dans la lumière et se déplacent avec le liquide. Elles sont d'origine inconnue et pourraient être des débris de membrane ou des morceaux de cils qui se détachent dans le milieu. On peut ainsi observer de manière anecdotique dans la lignée présentant des cils fluorescents Arl13bGFP des débris positifs pour la GFP en suspension dans le liquide (non montré dans le manuscrit). Ces débris de cils ne sont cependant présents qu'en faible nombre en comparaison des vésicules Chmp1b. En suivant les vésicules/particules endogènes visualisables dans la lumière, on s'est aperçu qu'elles se trouvent enrichies du côté gauche de l'organisateur, et plus particulièrement au postérieur gauche. De manière surprenante, les vitesses angulaires des vésicules que l'on suit présentent une dynamique inverse : dans les zones de hautes vitesses, on trouve moins de vésicules, et dans les zones de basses vitesses, les vésicules s'accumulent.

La présence de vitesses asymétriques dans la KV a déjà été observée, avec une accélération à gauche (Sampaio et al. 2014, Tavares et al. 2017). Néanmoins, la direction de l'asymétrie est toujours discutée, avec un autre modèle prédisant plutôt des accélérations du côté droit préférentiellement (Ferreira et al. 2017). Dans notre cas, nous ne mesurons pas les mêmes paramètres de vitesses. Ils s'intéressent à la vitesse globale en $\mu\text{m/s}$, et nous l'interprétons en vitesse angulaire en $^\circ/\text{s}$. En plus d'être impactée par des changements de vitesse globale, la vitesse angulaire l'est également par des changements de direction des

vésicules. Nos mesures ne nous permettent donc pas de faire le point sur ce débat précis, mais soulèvent des questions concernant de potentielles directions de déplacement latéralisées dans la KV.

Le point que nous faisons se situe dans la corrélation inverse entre vitesse angulaire de déplacement et présence de vésicules. Il a été montré précédemment que des perturbations de l'inclinaison des cils pouvaient conduire à des défauts de directionnalité du flux (Borovina et al. 2010, May-Simera et al. 2010). Il serait intéressant dans cette condition de déterminer si cela peut avoir un impact sur la localisation des vésicules endogènes. Et si c'est le cas, de déterminer dans quelle mesure des défauts de localisation des vésicules précis peuvent permettre de prédire des défauts de latéralité. L'initiation d'une vitesse asymétrique du flux de la KV reste dans tous les cas mystère auquel nous n'apportons pas de réponse dans ce manuscrit.

- *Simulation informatique du flux de la KV.*

Afin de déterminer dans quelle mesure la distribution de vitesse angulaire asymétrique est suffisante pour expliquer la présence latéralisée de vésicules dans la KV, nous avons construit une simulation informatique. Elle nous permet de faire se déplacer durant temps donné un nombre contrôlé de vésicules virtuelles dans un organe circulaire en 2D. Les vésicules virtuelles se déplacent de façon circulaire uniforme seulement et l'on fait tourner de façon arbitraire 1000 vésicules avec un temps de vie de 12.5s par vésicules. Le choix de ces valeurs est arbitraire car nous ne disposons pas de moyens pour les mesurer *in vivo*. Il est motivé par des essais successifs nous permettant plus ou moins de récapituler la distribution de vésicules, et est peut être révélateur d'une réalité biologique.

Nous montrons qu'il est possible de récapituler la distribution de vésicules observées seulement en fournissant à la simulation les données de vitesses angulaire mesurées. Il serait appréciable par la suite d'incrémenter à notre simulation, qui utilise un système de coordonnées polaires, le paramètre de la distance par rapport au centre de la KV. La possibilité de se déplacer non seulement de façon circulaire, mais également vers l'intérieur ou l'extérieur de l'organe simulé. De façon additionnelle, il est connu que le flux se propage différemment au contact des cils, avec des mouvements vorticaux, à l'inverse du flux laminaire observé quand on s'en éloigne (Supatto and Vermot 2011). Ces paramètres devront ainsi être étudiés plus en détail afin d'être intégrés à une simulation efficace.

De plus, nous occultons également une dimension dans notre modèle et notre analyse en général, qui est celle de l'épaisseur dorso-ventrale de la KV. Il a en effet été montré des différences de disposition des cils dans cette dimension, avec une majorité du côté dorsal (Kreiling, Williams, and Creton 2007). Le gradient de cils que l'on observe en remontant vers le pôle dorsal, ainsi que leur inclinaison vers ce pôle est supposé être important à

l'acquisition d'un flux circulaire (Ferreira et al. 2017, Montenegro-Johnson et al. 2016). Néanmoins, il a précédemment été mentionné que le déplacement des vésicules endogènes se faisait principalement au niveau du plan équatorial (Sampaio et al. 2014), et l'épaisseur de l'axe D/V est relativement fine en comparaison de l'axe A/P et du plan D/G. Il serait néanmoins intéressant de recueillir des paramètres de localisation des vésicules dans des plans plus éloignés de l'équatorial, afin de visualiser l'impact de ces nouvelles données sur notre simulation.

- *Transport asymétrique de billes dans la KV*

Pour confirmer notre interprétation, renforcée par la simulation, que les mouvements seuls du flux peuvent expliquer les différences de localisation asymétriques de vésicules observées, nous avons injecté des billes fluorescentes dans la lumière de la KV. Ces billes ne sont pas sécrétées ou réceptionnées, et leur localisation est donc le reflet direct de mouvement du flux uniquement. Nous avons ainsi observé que les billes se comportent de la même façon que les vésicules, et sont transportées également de façon latéralisée. Le flux est donc intrinsèquement responsable du transport latéralisé de matériel extracellulaire dans la KV. On peut donc supposer que, si des évènements de sécrétions ou réception de produisent dans le cas des vésicules, leur impact sur la présence générale des vésicules dans le flux est négligeable. Ici, la prochaine étape sera certainement la visualisation des vésicules Chmp1b, ou par l'intermédiaire d'autres marqueurs in vivo. Si ces vésicules se comportent comme des billes, et que les mouvements du flux seuls peuvent expliquer leur localisation dans la KV, cela peut signifier plusieurs choses. Soit leur temps de vie dans la KV est suffisamment long pour que leur localisation à un temps t ne soit pas impactée par leur réception. Soit la sécrétion de ces vésicules balance parfaitement leur réception, de telle sorte qu'il y a toujours un même nombre de vésicules dans l'organe. Ces suppositions restent cependant tout à fait hypothétiques et nécessiteront d'autres niveaux d'analyses. De plus, l'utilisation de réactifs inhibant l'action du flux ou la perturbant comme le morpholino *Irrc50* et le mutant *vangl2* (Borovina et al. 2010), pourraient être d'intérêt majeur. Si le transport extracellulaire de matière, sous forme potentielle d'exovésicule, dans la lumière de l'organisateur est important pour la latéralité, des conditions de perturbation du flux devraient avoir des conséquences sur leur distribution. pour la latéralité, des conditions de perturbation du flux devraient avoir des conséquences sur leur distribution.

III-1-c- Conclusion

En résumé, ce travail sur le rôle du complexe ESCRT dans la mise en place de l'asymétrie D/G et la dynamique du transport d'exovésicules dans la KV a permis de réaliser trois avancées dans la compréhension des mécanismes d'acquisition de la latéralité chez les vertébrés.

Premièrement, il s'agit de la première évidence d'un rôle du complexe ESCRT dans la latéralité. Le complexe ESCRT, principalement étudié d'un point de vue biochimique chez la levure, a émergé au cours des dernières années comme d'intérêt majeur au cours du développement. Le fait que plusieurs mutants ESCRT comme Chmp1a ou Chmp1b survivent jusqu'à l'âge adulte chez le poisson-zèbre tout en présentant certains phénotypes rend ce modèle particulièrement attrayant pour l'étude du complexe ESCRT au cours du développement. Ainsi, les composants Vps4a, Vps4b et Chmp1a apparaissent comme cruciaux à l'établissement d'une asymétrie D/G normale sans affecter de façon majeure la ciliogenèse de la KV et son flux de liquide circulaire. L'activité d'ESCRT semble être requise spécifiquement au niveau de la KV pour réaliser son action et des analyses supplémentaires seront requises pour étudier la conservation de sa fonction au cours de l'évolution.

Deuxièmement, nous montrons que chez le poisson-zèbre des exovésicules sont présentes dans la lumière de l'organisateur D/G, de la même façon que chez la souris avec les NVP. Le composant Vps4b du complexe ESCRT semble être crucial à leur présence dans la lumière. Cette observation, en corrélation avec l'absence d'autres défauts majeurs de fonctions de la KV dans les conditions de perte de fonction ESCRT, suggère que ces exovésicules pourraient jouer un rôle dans l'établissement de la latéralité. Cette observation permet donc de présenter le poisson-zèbre comme un nouveau modèle d'étude potentiel du rôle des exovésicules dans l'établissement de l'asymétrie D/G. Nous présentons également un nouveau marqueur pour ces exovésicules avec le gène Chmp1b du complexe ESCRT, qu'il serait intéressant d'aller examiner chez la souris.

Finalement nous apportons des éléments de réponse sur la façon dont des exovésicules seraient transportées dans la KV. Nous montrons qu'il y a un transport latéralisé de vésicules dans la KV. Celui-ci semble pouvoir être expliqué par le fait que le flux présente lui-même des caractéristiques latéralisées, notamment sa vitesse angulaire. Ainsi, nous présentons le poisson-zèbre comme un nouvel organisme vertébré dont l'organisateur D/G permet le transport de matériel extracellulaire. Les mécanismes d'acquisition d'une asymétrie du flux demeurent cependant inconnus *in vivo*, bien que certains modèles informatiques présentent des pistes de réflexion (Ferreira et al. 2017, Montenegro-Johnson et al. 2016), notamment par le placement et l'inclinaison des cils motiles.

III-2- Projet 2 : Myo1D est un déterminant essentiel à la latéralité conservé au cours de l'évolution.

III-2-a- Myo1D et latéralité chez le poisson-zèbre.

- *La fonction de Myo1D est conservée chez le poisson-zèbre.*

Afin d'étudier la conservation de la fonction de Myo1D au cours de l'évolution, nous avons réalisé un mutant poisson-zèbre grâce au système Crispr/Cas9 pour ce gène. Les mutants zygotiques *myo1D* ne montrent pas de phénotypes, tandis que les mutants maternels-zygotiques *myo1D* présentent des défauts de latéralité, ce qui est cohérent avec la contribution maternelle de *myo1D* observé aux stades clivage. Les mutants MZ *myo1D* présentent donc des défauts d'asymétrie de tous les organes embryonnaires latéralisés comme le cœur, les viscères et le cerveau, et à différents temps de développement (positionnement asymétrique du cœur à 26h et torsion latéralisée à un stade plus tardif). Comme pour la drosophile, une surexpression de *myo1Cb* mime le phénotype induit par la mutation *myo1D* (Petzoldt et al. 2012, Hozumi et al. 2008). De plus, la perte de *myo1G*, le deuxième orthologue poisson-zèbre de *myo1D* chez la drosophile, aggrave le phénotype observé. Le phénotype induit par la mutation *myo1D*, autours de 15-20% de défaut de latéralité, est relativement faible en comparaison d'autres facteurs important pour l'asymétrie D/G.

En général, chez le poisson-zèbre, il est rare d'obtenir des phénotypes excédants les 50% de défaut de la latéralité, pour des raisons qui ne sont pas encore comprises. Cela pourrait être lié à l'influence relative de l'organisateur D/G par rapport à d'autres facteurs périphériques, mais cela reste à déterminer. Dans le cas de Myo1D, cela pourrait être lié à de potentielles redondances fonctionnelles ave d'autres myosines 1 non conventionnelles, au nombre de 12 chez le poisson-zèbre. La double perte de fonction *myo1D* et *myo1G* que l'on présente comme présentant des défauts supérieur à la simple perte de *myo1D* va dans ce sens. De plus, en l'absence de *myo1D*, la surexpression de *myo1Cb* pourrait antagoniser la fonction d'autres myosines 1. En ce sens, il serait intéressant de procéder à une surexpression de *myo1Cb* en condition de double perte de fonction de *myo1D* et *myo1G*. Si dans cette condition, il est possible d'augmenter le pourcentage de phénotype de latéralité, cela pourrait signifier que Myo1Cb antagonise l'action d'autres protéines que Myo1D et Myo1G.

Les deux mutants *myo1D* et *myo1G* dont l'on dispose ne sont pas homozygotes létaux, et présentent un développement normal en dehors de l'asymétrie D/G. Il peut donc être également envisageable de générer des poissons double mutants pour ces gènes afin de

réaliser des doubles maternels-zygotiques, afin d'obtenir des phénotypes potentiellement plus forts.

Chez la drosophile, nos collaborateurs ont également montré que la protéine Myo1D provenant du poisson-zèbre était capable de sauver le phénotype de perte de fonction *myo1D* au niveau du génitalia. Dans ce cas, protéine Myo1D de poisson-zèbre seule est capable de sauver le phénotype, sa fonction semble donc avoir été particulièrement conservée au cours de l'évolution. Il serait intéressant de voir si d'autres myosines 1 de poisson-zèbre ont également cette capacité, et notamment Myo1G, que l'on a montré comme collaborant avec Myo1D dans l'établissement de l'asymétrie D/G. En outre, l'étude de la capacité de Myo1Cb de poisson-zèbre à antagoniser la fonction de Myo1D chez la drosophile serait également importante pour l'interprétation des phénotypes que l'on observe.

- *Myo1D est requis pour la fonction de l'organisateur droite/gauche.*

Chez la drosophile, Myo1D est requis au niveau de la région organisatrice de l'asymétrie D/G afin d'induire un biais chiral des tissus organisateurs par eux même (Speder, Adam, and Noselli 2006, Hozumi et al. 2006), ou des tissus adjacents (Gonzalez-Morales et al. 2015). On s'est ainsi intéressé dans un deuxième temps à l'organisateur D/G du poisson-zèbre, et au mésoderme adjacent, qui interviennent en amont de la latéralité des organes asymétriques. Ainsi, si Myo1D joue un rôle uniquement au niveau des organes, l'organisateur et les signaux précoces de latéralité ne devraient pas être perturbés. Le mutant *myo1D* induit des défauts de latéralité dans le mésoderme latéral, au niveau de *spaw* et *pitx2*, dans des proportions cohérentes avec les défauts d'asymétrie observés en aval. De plus, il est également important pour l'enrichissement de *dand5* du côté droit de la KV. De même Myo1G semble ici avoir un rôle redondant à Myo1D et Myo1Cb antagonise sa fonction.

De la même façon que j'ai pu le suggérer pour le projet 1 de ce manuscrit, un niveau manque dans l'étude de la transmission d'information entre le flux et les marqueurs précoces de latéralité, la signalisation calcique. Il serait intéressant de vérifier si celle-ci est encore active, ou est altérée par la perte de *myo1D*.

Additionnellement, on ignore si Myo1D est requis spécifiquement au niveau de l'organisateur pour permettre de mettre en place d'une bonne latéralité. Une stratégie serait d'injecter un morpholino couplé à la fluorescéine contre *myo1D* à 256 cellules afin de l'adresser aux DFC, comme je l'ai précédemment décrit. Le problème étant qu'avec cette technique, on risque cibler moins efficacement la contribution maternelle de *myo1D*, importante pour sa fonction. Alternativement, nous pourrions donc également injecter au même stade de l'ARN codant pour Myo1D afin de vérifier si cela est suffisant au sauvetage du phénotype. Une observation

intéressante que nous avons faite est la présence de transcrits *myo1D* dans la notochorde au moment de la cassure de symétrie dans la KV. Bien que nous ayons montré que la contribution maternelle était importante pour la fonction de *myo1D*, la contribution zygotique semble également jouer un rôle synergique, avec le constat que les mutants maternels ne récapitulent pas tout à fait le phénotype maternel-zygotique. Il est donc possible que cette présence de *myo1D* au niveau de la notochorde soit importante pour sa fonction. De plus, il a été montré que la proximité de notochorde était importante à l'acquisition d'une structure normale de la KV (Compagnon et al. 2014). Dans l'intestin postérieur de drosophile, il a été montré que Myo1D était actif de façon non cellule autonome, et transmettait un biais dextral dans les cellules adjacentes par le biais de la signalisation de polarité planaire globale (Gonzalez-Morales et al. 2015). Il peut ainsi être imaginable ici que Myo1D puisse transmettre une information de latéralité à la KV par l'intermédiaire de la notochorde. En ce sens, il serait intéressant de vérifier si les acteurs Fat et Dachshous de cette polarité planaire sont présents à la jonction entre la KV et la notochorde, et si la perte de *myo1D* joue un rôle dans leur localisation.

III-2-b- Interaction entre Myo1D et PCP dans l'activité de l'organisateur droite/gauche

- *Myo1D* contrôle le flux de l'organisateur droite/gauche.

La fonction de l'organisateur D/G semble donc être perturbée chez le mutant *Myo1D* comme en atteste la diminution d'asymétrie de *dand5* observée. Nous nous sommes donc demandé quels étaient les paramètres atteints au niveau de la KV ou de ses précurseurs. Il apparaît que la KV est affectée à plusieurs niveaux. Les KV ont une taille plus petite, les cils sont plus courts et moins nombreux, et le flux présente une forme plus chaotique. Les KV de petite taille, ou présentant des cils moins nombreux ne corrèlent pas avec les phénotypes de latéralité du cœur observés. Cependant, les KV présentant des défauts de circularité, avec une vitesse angulaire réduite, présentent une corrélation avec les phénotypes cardiaques. Il est donc probable que le caractère chaotique du flux soit au moins pour partie responsable des défauts de latéralité observés chez le mutant *myo1D*. Il serait néanmoins intéressant de visualiser si d'autres organes asymétriques que le cœur comme les viscères ou le cerveau présentent des défauts pouvant corrélérer avec les paramètres cités précédemment.

Les phénotypes de défauts de directionnalité du flux ne sont pas courants. De manière générale, lorsque l'on affecte la motilité ciliaire ou la forme de la KV, le flux diminue en vitesse globale. Ici, il semble que les défauts de flux concernent principalement sa circularité. Le mutant *myo1D* pourrait ainsi être un outil particulièrement puissant pour étudier l'impact précis du flux dans la latéralité. Dans les embryons mutants *myo1D*, le flux ne semble pas être perturbé de la même manière, mais plutôt de façon aléatoire. Il serait attirant dans le

cadre de ce projet, mais également pour le projet 1 de tirer avantage du mutant *myo1D* en corrélant certaines formes du flux avec des problèmes de latéralité plus tardifs.

- *L'interaction entre Myo1D et Vangl2 contrôle la fonction de la KV.*

Le phénotype de flux du mutant *myo1D* n'est pas très courant dans la littérature, et le phénotype s'y rapportant le plus est celui du mutant *vangl2* (Borovina et al. 2010). Nous nous sommes donc intéressés à une potentielle interaction entre *myo1D* et le composant de la polarité planaire cœur *vangl2*. De façon surprenante, le fait d'être hétérozygote *vangl2* dans un fond mutant *myo1D* réduit le pourcentage de défauts de latéralité.

Une analyse plus précise du flux de la KV a montré chez les mutants *myo1D*, l'accélération antérieure semble perdue, de façon similaire aux mutants *vangl2*. Et le fait d'être hétérozygote *vangl2* sauve en partie cette accélération. Il y a donc une interaction entre *myo1D* et *vangl2* dans la fonction de contrôle de circularité du flux.

L'accélération antérieure a été montrée comme dépendante de la forme des cellules antérieures, qui permettent de façon locale une concentration plus élevée de cils (Wang et al. 2011). Cette forme particulière des cellules à l'antérieur est dépendante du contact avec la notochorde (Compagnon et al. 2014). La présence de *myo1D* au niveau de la notochorde pourrait ainsi potentiellement favoriser cette interaction avec la notochorde. La situation n'est pas cependant pas aussi simple, car nous n'avons pas trouvé de diminution de la concentration plus élevée de cils à l'antérieur chez le mutant *myo1D*. Ce paramètre ne semble donc pas en cause pour expliquer les défauts de flux entraînés par *myo1D*.

Un autre paramètre que la localisation des cils dans la KV semble essentiel à la mise en place d'un flux circulaire. Dans les mutants *vangl2*, il a été montré que les cils sont inclinés de manière aberrante (Borovina et al. 2010). Nous avons ainsi montré que chez les mutants *myo1D*, il y a également des perturbations de l'inclinaison des cils, mais avec une tendance inverse à *vangl2*. Il serait intéressant ici d'étudier aussi l'interaction entre *myo1D* et *vangl2*.

Finalement, nous montrons pour la première fois chez le poisson-zèbre que les corps basaux de l'organisateur D/G sont positionnés de façon postérieure, de la même façon que chez la souris (Minegishi et al. 2017). De plus, *Myo1D* et *Vangl2* sont essentiels à ce positionnement, et ici encore la perte d'un allèle de *vangl2* dans un fond mutant *myo1D* réduit l'impact du phénotype. Que ce soit pour la position des corps basaux, l'inclinaison des cils, ou le phénotype de flux, les gènes *myo1D* et *vangl2* semblent jouer des rôles inverses. On pourrait penser que *Myo1D* entraîne une surexpression ou une suractivation de *Vangl2*. Ainsi, en l'absence de *myo1D*, une seule copie de *vangl2* est suffisante pour un bon positionnement des corps basaux et des cils.

Nous ne savons pas à quel point le positionnement du corps basal et l'inclinaison des cils sont liés, et si *Myo1D* agit sur ces deux paramètres, ou seulement sur l'un. Cependant,

compte tenu de l'importance des cils pour la bonne mise en place du flux, il est tentant de supposer que ces défauts sont responsables des phénotypes de latéralité observés chez le mutant *myo1D*.

Si Myo1D est nécessaire à l'inclinaison des cils, il serait également important de les visualiser le long de l'axe D/V. Il a été montré que les cils doivent être inclinés vers le pôle dorsal afin de permettre la mise en place d'un flux circulaire (Ferreira et al. 2017, Montenegro-Johnson et al. 2016).

Dans un autre registre, les cils de la KV sont inclinés selon un certain angle et sont polarisés, mais possèdent également un mouvement chiral avec une rotation horaire (Okabe, Xu, and Burdine 2008, Hilfinger and Julicher 2008). La chiralité intrinsèque du mouvement ciliaire rotatoire constitue ainsi un événement chiral plus précoce que le flux. Il serait donc intéressant de voir si Myo1D peut jouer un rôle également sur le caractère rotatoire des cils. Chez la drosophile, comme mentionné précédemment, Myo1D est connu comme interagissant avec la polarité planaire globale. La polarité planaire cœur, dont Vangl est un membre, a également été montrée comme jouant un rôle dans l'asymétrie D/G, cependant sa possible interaction avec Myo1D demeure inconnue (Gonzalez-Morales et al. 2015). Nous montrons ici que Myo1D interagit avec Vangl2, mais par un biais inconnu. En ce sens, il serait intéressant de visualiser les effets de la perte de Myo1D sur la localisation de Vangl2. Vangl2, en tant que composant de la voie PCP, va être impliqué dans l'orientation dans le plan des corps basaux et de l'inclinaison des cils, en se situant préférentiellement au pôle antérieur des cellules. Une relocalisation de Vangl2 pourrait ainsi expliquer les phénotypes observés suite à la perte de Myo1D.

Les composants de la voie PCP n'ont jamais été observés dans les cellules de la KV. En ce sens il serait judicieux d'étudier leur présence au niveau de l'organe, et l'impact de la perte de Myo1D sur ces autres facteurs. Néanmoins, il est probable que Myo1D n'interagisse pas avec tous les composants PCP. Par exemple la perte de Prickle1a, appartenant à la polarité planaire cœur, entraîne des phénotypes de fragmentation de la lumière de la KV, ce qui n'est pas observable pour Myo1D (Oteiza et al. 2010).

Chez la drosophile, il a été montré qu'une relocalisation de Myo1D au niveau de la membrane, en contact avec les jonctions adhérentes, était nécessaire à sa fonction (Geminard et al. 2014). Myo1D induit une courbure des membranes initiée à partir de l'organisateur D/G, par l'intermédiaire de l'E-cadherine (Taniguchi et al. 2011). La perte d'E-cadherine ou β -catenine entraîne une absence de courbure de membranes (Petzoldt 2012). La présence de la E-Cadherine a déjà été attestée dans la KV, et sa perte a été associée à des défauts de l'organisateur (Tay et al. 2013). Il serait donc intéressant de visualiser l'impact de la perte de Myo1D chez le poisson-zèbre dans la localisation de la E-Cadherine ou β -catenine dans la KV.

III-2-c- Conclusion.

Ce deuxième projet de thèse sur l'étude de la conservation de la fonction de Myo1D dans la latéralité chez le poisson-zèbre nous a conduit à trois conclusions sur la façon dont certaines molécules peuvent jouer un rôle conservé au cours de l'évolution.

Premièrement, nous avons montré pour la première fois que la perte de *myo1D* chez un organisme vertébré entraîne l'apparition de défauts d'asymétrie des organes latéralisés embryonnaires. Afin de remplir cette fonction, Myo1D montre des redondances fonctionnelles avec une autre myosine non-conventionnelle, Myo1G. De plus, comme chez la drosophile, Myo1Cb semble antagoniser la fonction de Myo1D. Myo1D fait donc partie d'un complexe de myosines non-conventionnelles donc la fonction des agents a été conservée au cours de l'évolution afin de permettre la mise en place de la latéralité. Cela est confirmé par la possibilité du sauvetage du phénotype de perte de fonction de *myo1D* chez la drosophile grâce à un ADNc de poisson-zèbre.

Deuxièmement, il apparaît que Myo1D est nécessaire à la fonction de l'organisateur D/G chez le poisson-zèbre. Comme chez la drosophile, Myo1D est requis pour les étapes les plus précoces d'initiation d'une asymétrie. Un des premiers événements chiraux, en amont de la latéralité des premiers gènes exprimés asymétriquement, le flux de liquide de la KV, est perturbé dans sa chiralité. D'autres paramètres au niveau de la KV sont également touchés, comme sa taille ou la longueur et le nombre des cils qui la tapissent. Néanmoins, la perte du caractère circulaire du flux semble être l'évènement majeur à l'origine des défauts de latéralité. Ainsi, bien que chez la drosophile les organisateurs D/G ne présentent pas de flux chiral, la fonction de Myo1D apparaît comme conservée même dans des organisateurs présentant des topologies différentes.

Finalement, nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle entre *myo1D* et *vangl2*, une protéine appartenant à la voie de la polarité planaire cœur (PCP). *Myo1D* et *vangl2* interagissent dans le positionnement des corps basaux et dans l'inclinaison des cils de la KV. Ces paramètres sont connus comme cruciaux dans d'autres modèles vertébrés à l'établissement d'un flux de liquide efficace et la mise en place d'une bonne asymétrie. Nous présentons donc la signalisation PCP comme voie conservée d'établissement de la latéralité chez les animaux, avec Myo1D interagissant avec celle-ci afin d'initier et propager un biais chiral essentiel à la fonction des organisateurs D/G, quel que soit leur mode d'action et leur topologie en aval.

IV- Conclusion générale

Les deux projets sur lesquels j'ai travaillé au cours de ma thèse m'ont permis de m'intéresser à plusieurs aspects de l'asymétrie D/G. J'ai ainsi travaillé précisément chez le poisson-zèbre à identifier le rôle d'une machinerie cellulaire très conservée, ESCRT, dans la latéralité. L'étude des phénotypes de défauts de latéralité associés à la perte de protéines ESCRT m'ont conduit à étudier le flux de l'organisateur D/G, et la façon dont il pourrait participer à la cassure de symétrie. J'ai tenté de disséquer la contribution des deux hypothèses actuellement en cours afin d'expliquer la façon dont le flux permet d'entraîner une morphogenèse asymétrique. Je montre ainsi que le flux permet le transport asymétrique de matériel extracellulaire chez le poisson-zèbre, grâce à la présence d'une asymétrie de vitesse intrinsèque. Il sera nécessaire à l'avenir d'identifier chez le poisson-zèbre de potentielles molécules de signalisation présentes dans le flux et capables d'induire une cassure de symétrie. De plus, des progrès devront être effectués dans notre compréhension de la façon dont des vésicules présentes dans le flux de la KV peuvent être sécrétées et réceptionnées, notamment par l'amélioration des modèles informatiques et des techniques d'imagerie. Parallèlement j'ai étudié la conservation des mécanismes fondamentaux de cassure de symétrie par l'intermédiaire du mutant *myo1D*. Je participe ainsi à montrer qu'une caractéristique qui apparaît comme conservée entre un organisme modèle vertébré, le poisson-zèbre, et la drosophile, un protostome, semble être la signalisation de polarité cellulaire planaire. Chez la drosophile, la polarité planaire va ainsi permettre d'orienter les tissus à partir d'un organisateur D/G en transmettant un biais chiral induit par Myo1D sous forme de torsion. Chez le poisson-zèbre la polarité planaire va être impliquée dans l'orientation des corps basaux et des cils des cellules de l'organisateur, qui en retour vont transmettre le biais de latéralité. La présence d'un flux ne semble pas être un prérequis essentiel à la cassure de symétrie, et apparaît comme étant apparu relativement tardivement au cours de l'évolution des vertébrés. Cependant, les mécanismes de cassure de symétrie passant par le cytosquelette d'actomyosine, semblent eux particulièrement conservés. Il sera intéressant à l'avenir d'étudier plus en détail la façon Myo1D communique avec la signalisation PCP, et si cela est également le cas dans davantage d'organismes modèles. Ce deuxième projet se recoupe également finalement avec le premier. Myo1D, par son action sur le flux de la KV, m'a permis de mettre au point des systèmes d'analyse du flux plus efficaces, avec de la détection automatique et une imagerie plus résolutive. Ainsi, le mutant *myo1D* pourrait représenter un outil intéressant pour étudier le rôle de vésicules se déplaçant dans le flux de la KV, en analysant la façon dont des localisations différentielles de vésicules peuvent entraîner l'apparition de défauts d'asymétrie.

Bibliographie

- Ablooglu, A. J., E. Tkachenko, J. Kang, and S. J. Shattil. 2010. "Integrin alphaV is necessary for gastrulation movements that regulate vertebrate body asymmetry." *Development* 137 (20):3449-58. doi: 10.1242/dev.045310.
- Abrami, L., L. Brandi, M. Moayeri, M. J. Brown, B. A. Krantz, S. H. Leppla, and F. G. van der Goot. 2013. "Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin." *Cell Rep* 5 (4):986-96. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.019.
- Adams, D. S., K. R. Robinson, T. Fukumoto, S. Yuan, R. C. Albertson, P. Yelick, L. Kuo, M. McSweeney, and M. Levin. 2006. "Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates." *Development* 133 (9):1657-71. doi: 10.1242/dev.02341.
- Adell, M. A., G. F. Vogel, M. Pakdel, M. Müller, H. Lindner, M. W. Hess, and D. Teis. 2014. "Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation." *J Cell Biol* 205 (1):33-49. doi: 10.1083/jcb.201310114.
- Ali, M. Y., K. Homma, A. H. Iwane, K. Adachi, H. Itoh, K. Kinosita, Jr., T. Yanagida, and M. Ikebe. 2004. "Unconstrained steps of myosin VI appear longest among known molecular motors." *Biophys J* 86 (6):3804-10. doi: 10.1529/biophysj.103.037416.
- Ali, M. Y., S. Uemura, K. Adachi, H. Itoh, K. Kinosita, Jr., and S. Ishiwata. 2002. "Myosin V is a left-handed spiral motor on the right-handed actin helix." *Nat Struct Biol* 9 (6):464-7. doi: 10.1038/nsb803.
- Ali, N., L. Zhang, S. Taylor, A. Mironov, S. Urbe, and P. Woodman. 2013. "Recruitment of UBPY and ESCRT exchange drive HD-PTP-dependent sorting of EGFR to the MVB." *Curr Biol* 23 (6):453-61. doi: 10.1016/j.cub.2013.02.033.
- Amack, J. D., and H. J. Yost. 2004. "The T box transcription factor no tail in ciliated cells controls zebrafish left-right asymmetry." *Curr Biol* 14 (8):685-90. doi: 10.1016/j.cub.2004.04.002.
- Anderson, M. R., F. Kashanchi, and S. Jacobson. 2016. "Exosomes in Viral Disease." *Neurotherapeutics* 13 (3):535-46. doi: 10.1007/s13311-016-0450-6.
- Antic, D., J. L. Stubbs, K. Suyama, C. Kintner, M. P. Scott, and J. D. Axelrod. 2010. "Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis." *PLoS One* 5 (2):e8999. doi: 10.1371/journal.pone.0008999.
- Arrington, C. B., A. G. Peterson, and H. J. Yost. 2013. "Sdc2 and Tbx16 regulate Fgf2-dependent epithelial cell morphogenesis in the ciliated organ of asymmetry." *Development* 140 (19):4102-9. doi: 10.1242/dev.096933.
- Aw, S., D. S. Adams, D. Qiu, and M. Levin. 2008. "H,K-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry." *Mech Dev* 125 (3-4):353-72. doi: 10.1016/j.mod.2007.10.011.
- Axelrod, J. D. 2009. "Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling." *Semin Cell Dev Biol* 20 (8):964-71. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.08.001.
- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr. 2002. "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* 3 (2):271-82.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland, and S. D. Emr. 2002. "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* 3 (2):283-9.
- Baietti, M. F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, and G. David. 2012. "Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes." *Nat Cell Biol* 14 (7):677-85. doi: 10.1038/ncb2502.
- Baillie, Matthew. 1788. An account of a remarkable transposition of the viscera.

- Baker, K., N. G. Holtzman, and R. D. Burdine. 2008. "Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (37):13924-9. doi: 10.1073/pnas.0802159105.
- Barth, K. A., A. Miklosi, J. Watkins, I. H. Bianco, S. W. Wilson, and R. J. Andrew. 2005. "fsi zebrafish show concordant reversal of laterality of viscera, neuroanatomy, and a subset of behavioral responses." *Curr Biol* 15 (9):844-50. doi: 10.1016/j.cub.2005.03.047.
- Barylko, B., D. D. Binns, and J. P. Albanesi. 2000. "Regulation of the enzymatic and motor activities of myosin I." *Biochim Biophys Acta* 1496 (1):23-35.
- Bastock, R., H. Strutt, and D. Strutt. 2003. "Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning." *Development* 130 (13):3007-14.
- Beausang, J. F., H. W. Schroeder, 3rd, P. C. Nelson, and Y. E. Goldman. 2008. "Twirling of actin by myosins II and V observed via polarized TIRF in a modified gliding assay." *Biophys J* 95 (12):5820-31. doi: 10.1529/biophysj.108.140319.
- Beckers, A., L. Alten, C. Viebahn, P. Andre, and A. Gossler. 2007. "The mouse homeobox gene Noto regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (40):15765-70. doi: 10.1073/pnas.0704344104.
- Beckett, K., S. Monier, L. Palmer, C. Alexandre, H. Green, E. Bonneil, G. Raposo, P. Thibault, R. Le Borgne, and J. P. Vincent. 2013. "Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes." *Traffic* 14 (1):82-96. doi: 10.1111/tra.12016.
- Beer, K. B., and A. M. Wehman. 2017. "Mechanisms and functions of extracellular vesicle release in vivo-What we can learn from flies and worms." *Cell Adh Migr* 11 (2):135-150. doi: 10.1080/19336918.2016.1236899.
- Berg, J. S., B. C. Powell, and R. E. Cheney. 2001. "A millennial myosin census." *Mol Biol Cell* 12 (4):780-94.
- Bergmann, D. C., M. Lee, B. Robertson, M. F. Tsou, L. S. Rose, and W. B. Wood. 2003. "Embryonic handedness choice in C. elegans involves the Galpha protein GPA-16." *Development* 130 (23):5731-40. doi: 10.1242/dev.00839.
- Bhutta, M. S., C. J. McInerney, and G. W. Gould. 2014. "ESCRT function in cytokinesis: location, dynamics and regulation by mitotic kinases." *Int J Mol Sci* 15 (12):21723-39. doi: 10.3390/ijms151221723.
- Bischoff, M., and R. Schnabel. 2006. "A posterior centre establishes and maintains polarity of the Caenorhabditis elegans embryo by a Wnt-dependent relay mechanism." *PLoS Biol* 4 (12):e396. doi: 10.1371/journal.pbio.0040396.
- Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry. 2011. "Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses." *Traffic* 12 (12):1659-68. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.
- Bonnafe, E., M. Touka, A. AitLounis, D. Baas, E. Barras, C. Ucla, A. Moreau, F. Flamant, R. Dubruille, P. Couble, J. Collignon, B. Durand, and W. Reith. 2004. "The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification." *Mol Cell Biol* 24 (10):4417-27.
- Borovina, A., S. Superina, D. Voskas, and B. Ciruna. 2010. "Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia." *Nat Cell Biol* 12 (4):407-12. doi: 10.1038/ncb2042.
- Boycott, A.E., and C. Diver. 1923. On the inheritance of sinistrality in Limnaea peregra.
- Brennan, J., D. P. Norris, and E. J. Robertson. 2002. "Nodal activity in the node governs left-right asymmetry." *Genes Dev* 16 (18):2339-44. doi: 10.1101/gad.1016202.
- Briscoe, J., and P. P. Therond. 2013. "The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (7):416-29. doi: 10.1038/nrm3598.

- Brown, L., J. M. Wolf, R. Prados-Rosales, and A. Casadevall. 2015. "Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi." *Nat Rev Microbiol* 13 (10):620-30. doi: 10.1038/nrmicro3480.
- Brown, N. A., and L. Wolpert. 1990. "The development of handedness in left/right asymmetry." *Development* 109 (1):1-9.
- Burn, S. F., and R. E. Hill. 2009. "Left-right asymmetry in gut development: what happens next?" *Bioessays* 31 (10):1026-37. doi: 10.1002/bies.200900056.
- Buschow, S. I., J. M. Liefhebber, R. Wubbolts, and W. Stoorvogel. 2005. "Exosomes contain ubiquitinated proteins." *Blood Cells Mol Dis* 35 (3):398-403. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.08.005.
- Buschow, S. I., E. N. Nolte-'t Hoen, G. van Niel, M. S. Pols, T. ten Broeke, M. Lauwen, F. Ossendorp, C. J. Melief, G. Raposo, R. Wubbolts, M. H. Wauben, and W. Stoorvogel. 2009. "MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways." *Traffic* 10 (10):1528-42. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x.
- Cabello, J., L. J. Neukomm, U. Gunesdogan, K. Burkart, S. J. Charette, G. Lochnit, M. O. Hengartner, and R. Schnabel. 2010. "The Wnt pathway controls cell death engulfment, spindle orientation, and migration through CED-10/Rac." *PLoS Biol* 8 (2):e1000297. doi: 10.1371/journal.pbio.1000297.
- Cao, M., J. Ning, C. I. Hernandez-Lara, O. Belzile, Q. Wang, S. K. Dutcher, Y. Liu, and W. J. Snell. 2015. "Uni-directional ciliary membrane protein trafficking by a cytoplasmic retrograde IFT motor and ciliary ectosome shedding." *Elife* 4. doi: 10.7554/eLife.05242.
- Carlton, J. G., and J. Martin-Serrano. 2007. "Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery." *Science* 316 (5833):1908-12. doi: 10.1126/science.1143422.
- Chairoungdua, A., D. L. Smith, P. Pochard, M. Hull, and M. J. Caplan. 2010. "Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling." *J Cell Biol* 190 (6):1079-91. doi: 10.1083/jcb.201002049.
- Chamling, X., S. Seo, C. C. Searby, G. Kim, D. C. Slusarski, and V. C. Sheffield. 2014. "The centriolar satellite protein AZ11 interacts with BBS4 and regulates ciliary trafficking of the BBSome." *PLoS Genet* 10 (2):e1004083. doi: 10.1371/journal.pgen.1004083.
- Chen, T. H., J. J. Hsu, X. Zhao, C. Guo, M. N. Wong, Y. Huang, Z. Li, A. Garfinkel, C. M. Ho, Y. Tintut, and L. L. Demer. 2012. "Left-right symmetry breaking in tissue morphogenesis via cytoskeletal mechanics." *Circ Res* 110 (4):551-9. doi: 10.1161/circresaha.111.255927.
- Chen, Y., and A. F. Schier. 2002. "Lefty proteins are long-range inhibitors of squint-mediated nodal signaling." *Curr Biol* 12 (24):2124-8.
- Chiasserini, D., M. Mazzoni, F. Bordi, S. Sennato, F. Susta, P. L. Orvietani, L. Binaglia, and C. A. Palmerini. 2015. "Identification and Partial Characterization of Two Populations of Prostatomes by a Combination of Dynamic Light Scattering and Proteomic Analysis." *J Membr Biol* 248 (6):991-1004. doi: 10.1007/s00232-015-9810-0.
- Chinnici, J. L., C. Fu, L. M. Caccamise, J. W. Arnold, and S. J. Free. 2014. "Neurospora crassa Female Development Requires the PACC and Other Signal Transduction Pathways, Transcription Factors, Chromatin Remodeling, Cell-To-Cell Fusion, and Autophagy." *PLoS One* 9 (10):e110603. doi: 10.1371/journal.pone.0110603.
- Choksi, S. P., G. Lauter, P. Swoboda, and S. Roy. 2014. "Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis." *Development* 141 (7):1427-41. doi: 10.1242/dev.074666.
- Choudhuri, K., J. Llodra, E. W. Roth, J. Tsai, S. Gordo, K. W. Wucherpfennig, L. C. Kam, D. L. Stokes, and M. L. Dustin. 2014. "Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse." *Nature* 507 (7490):118-23. doi: 10.1038/nature12951.
- Christianson, H. C., K. J. Svensson, T. H. van Kuppevelt, J. P. Li, and M. Belting. 2013. "Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (43):17380-5. doi: 10.1073/pnas.1304266110.

- Ciruna, B., G. Weidinger, H. Knaut, B. Thisse, C. Thisse, E. Raz, and A. F. Schier. 2002. "Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (23):14919-24. doi: 10.1073/pnas.222459999.
- Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. They, and G. Raposo. 2013. "Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles." *J Cell Sci* 126 (Pt 24):5553-65. doi: 10.1242/jcs.128868.
- Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry. 2014. "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles." *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Compagnon, J., V. Barone, S. Rajshekar, R. Kottmeier, K. Pranjic-Ferscha, M. Behrndt, and C. P. Heisenberg. 2014. "The notochord breaks bilateral symmetry by controlling cell shapes in the zebrafish laterality organ." *Dev Cell* 31 (6):774-83. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.003.
- Concha, M. L., I. H. Bianco, and S. W. Wilson. 2012. "Encoding asymmetry within neural circuits." *Nat Rev Neurosci* 13 (12):832-43. doi: 10.1038/nrn3371.
- Concha, M. L., R. D. Burdine, C. Russell, A. F. Schier, and S. W. Wilson. 2000. "A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain." *Neuron* 28 (2):399-409.
- Concha, M. L., C. Russell, J. C. Regan, M. Tawk, S. Sidi, D. T. Gilmour, M. Kapsimali, L. Sumoy, K. Goldstone, E. Amaya, D. Kimelman, T. Nicolson, S. Grunder, M. Gomperts, J. D. Clarke, and S. W. Wilson. 2003. "Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality." *Neuron* 39 (3):423-38.
- Cooper, M. S., and L. A. D'Amico. 1996. "A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation." *Dev Biol* 180 (1):184-98. doi: 10.1006/dbio.1996.0294.
- Corless, L., C. M. Crump, S. D. Griffin, and M. Harris. 2010. "Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles." *J Gen Virol* 91 (Pt 2):362-72. doi: 10.1099/vir.0.017285-0.
- Coutelis, J. B., C. Geminard, P. Speder, M. Suzanne, A. G. Petzoldt, and S. Noselli. 2013. "Drosophila left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene abdominal-B." *Dev Cell* 24 (1):89-97. doi: 10.1016/j.devcel.2012.11.013.
- Coutelis, J. B., N. Gonzalez-Morales, C. Geminard, and S. Noselli. 2014. "Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa." *EMBO Rep* 15 (9):926-37. doi: 10.15252/embr.201438972.
- Cui, C., C. D. Little, and B. J. Rongish. 2009. "Rotation of organizer tissue contributes to left-right asymmetry." *Anat Rec (Hoboken)* 292 (4):557-61. doi: 10.1002/ar.20872.
- Curwin, A. J., N. Brouwers, Y. Adell M. Alonso, D. Teis, G. Turacchio, S. Parashuraman, P. Ronchi, and V. Malhotra. 2016. "ESCRT-III drives the final stages of CUPS maturation for unconventional protein secretion." *Elife* 5. doi: 10.7554/eLife.16299.
- Dasgupta, A., and J. D. Amack. 2016. "Cilia in vertebrate left-right patterning." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371 (1710). doi: 10.1098/rstb.2015.0410.
- David, G., and P. Zimmermann. 2016. "Heparanase tailors syndecan for exosome production." *Mol Cell Oncol* 3 (3):e1047556. doi: 10.1080/23723556.2015.1047556.
- Davison, A., G. S. McDowell, J. M. Holden, H. F. Johnson, G. D. Koutsovoulos, M. M. Liu, P. Hulpiau, F. Van Roy, C. M. Wade, R. Banerjee, F. Yang, S. Chiba, J. W. Davey, D. J. Jackson, M. Levin, and M. L. Blaxter. 2016. "Formin Is Associated with Left-Right Asymmetry in the Pond Snail and the Frog." *Curr Biol* 26 (5):654-60. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.071.
- de Campos-Baptista, M. I., N. G. Holtzman, D. Yelon, and A. F. Schier. 2008. "Nodal signaling promotes the speed and directional movement of cardiomyocytes in zebrafish." *Dev Dyn* 237 (12):3624-33. doi: 10.1002/dvdy.21777.

- de Gassart, A., C. Geminard, D. Hoekstra, and M. Vidal. 2004. "Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins?" *Traffic* 5 (11):896-903. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00223.x.
- De La Cruz, E. M., and D. Sept. 2010. "The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament." *Biophys J* 98 (9):1893-901. doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.023.
- Delling, M., A. A. Indzhykulian, X. Liu, Y. Li, T. Xie, D. P. Corey, and D. E. Clapham. 2016. "Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors." *Nature* 531 (7596):656-60. doi: 10.1038/nature17426.
- Denais, C. M., R. M. Gilbert, P. Isermann, A. L. McGregor, M. te Lindert, B. Weigelin, P. M. Davidson, P. Friedl, K. Wolf, and J. Lammerding. 2016. "Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration." *Science* 352 (6283):353-8. doi: 10.1126/science.aad7297.
- Diener, D. R., P. Lupetti, and J. L. Rosenbaum. 2015. "Proteomic analysis of isolated ciliary transition zones reveals the presence of ESCRT proteins." *Curr Biol* 25 (3):379-84. doi: 10.1016/j.cub.2014.11.066.
- Duboc, V., E. Rottinger, F. Lapraz, L. Besnardeau, and T. Lepage. 2005. "Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side." *Dev Cell* 9 (1):147-58. doi: 10.1016/j.devcel.2005.05.008.
- Ellen, A. F., S. V. Albers, W. Huibers, A. Pitcher, C. F. Hobel, H. Schwarz, M. Folea, S. Schouten, E. J. Boekema, B. Poolman, and A. J. Driessen. 2009. "Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components." *Extremophiles* 13 (1):67-79. doi: 10.1007/s00792-008-0199-x.
- Esguerra, C. V., L. Nelles, L. Vermeire, A. Ibrahim, A. D. Crawford, R. Derua, E. Janssens, E. Waelkens, P. Carmeliet, D. Collen, and D. Huylebroeck. 2007. "Ttrap is an essential modulator of Smad3-dependent Nodal signaling during zebrafish gastrulation and left-right axis determination." *Development* 134 (24):4381-93. doi: 10.1242/dev.000026.
- Essner, J. J., J. D. Amack, M. K. Nyholm, E. B. Harris, and H. J. Yost. 2005. "Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut." *Development* 132 (6):1247-60. doi: 10.1242/dev.01663.
- Essner, J. J., W. W. Branford, J. Zhang, and H. J. Yost. 2000. "Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by pitx2 isoforms." *Development* 127 (5):1081-93.
- Fang, Y., N. Wu, X. Gan, W. Yan, J. C. Morrell, and S. J. Gould. 2007. "Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes." *PLoS Biol* 5 (6):e158. doi: 10.1371/journal.pbio.0050158.
- Faure, J., G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C. Chatellard-Cause, B. Blot, J. Grange, G. Schoehn, Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G. Raposo, J. Garin, and R. Sadoul. 2006. "Exosomes are released by cultured cortical neurones." *Mol Cell Neurosci* 31 (4):642-8. doi: 10.1016/j.mcn.2005.12.003.
- Feistel, K., and M. Blum. 2006. "Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo." *Dev Dyn* 235 (12):3348-58. doi: 10.1002/dvdy.20986.
- Feng, Z., L. Hensley, K. L. McKnight, F. Hu, V. Madden, L. Ping, S. H. Jeong, C. Walker, R. E. Lanford, and S. M. Lemon. 2013. "A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes." *Nature* 496 (7445):367-71. doi: 10.1038/nature12029.
- Ferreira, R. R., A. Vilfan, F. Julicher, W. Supatto, and J. Vermot. 2017. "Physical limits of flow sensing in the left-right organizer." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.25078.
- Field, S., K. L. Riley, D. T. Grimes, H. Hilton, M. Simon, N. Powles-Glover, P. Siggers, D. Bogani, A. Greenfield, and D. P. Norris. 2011. "Pkd11 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2." *Development* 138 (6):1131-42. doi: 10.1242/dev.058149.
- Forterre, A., A. Jalabert, E. Berger, M. Baudet, K. Chikh, E. Errazuriz, J. De Larichaudy, S. Chanon, M. Weiss-Gayet, A. M. Hesse, M. Record, A. Geloën, E. Lefai, H. Vidal, Y. Coute, and S. Rome. 2014. "Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new

- paradigm for myoblast-myotube cross talk?" *PLoS One* 9 (1):e84153. doi: 10.1371/journal.pone.0084153.
- Francescato, L., S. C. Rothschild, A. L. Myers, and R. M. Tombes. 2010. "The activation of membrane targeted CaMK-II in the zebrafish Kupffer's vesicle is required for left-right asymmetry." *Development* 137 (16):2753-62. doi: 10.1242/dev.049627.
- Frasnelli, E., I. Iakovlev, and Z. Reznikova. 2012. "Asymmetry in antennal contacts during trophallaxis in ants." *Behav Brain Res* 232 (1):7-12. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.014.
- Freeman, G., and J. W. Lundelius. 1982. "The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Lymnaea peregra*." *Wilehm Roux Arch Dev Biol* 191 (2):69-83. doi: 10.1007/bf00848443.
- Fumoto, K., K. Kikuchi, H. Gon, and A. Kikuchi. 2012. "Wnt5a signaling controls cytokinesis by correctly positioning ESCRT-III at the midbody." *J Cell Sci* 125 (Pt 20):4822-32. doi: 10.1242/jcs.108142.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszk, and W. I. Sundquist. 2001. "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." *Cell* 107 (1):55-65.
- Geminard, C., N. Gonzalez-Morales, J. B. Coutelis, and S. Noselli. 2014. "The myosin ID pathway and left-right asymmetry in *Drosophila*." *Genesis* 52 (6):471-80. doi: 10.1002/dvg.22763.
- Ghossoub, R., F. Lembo, A. Rubio, C. B. Gaillard, J. Bouchet, N. Vitale, J. Slavik, M. Machala, and P. Zimmermann. 2014. "Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2." *Nat Commun* 5:3477. doi: 10.1038/ncomms4477.
- Glasauer, S. M., and S. C. Neuhauss. 2014. "Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences." *Mol Genet Genomics* 289 (6):1045-60. doi: 10.1007/s00438-014-0889-2.
- Gokey, J. J., A. Dasgupta, and J. D. Amack. 2015. "The V-ATPase accessory protein Atp6ap1b mediates dorsal forerunner cell proliferation and left-right asymmetry in zebrafish." *Dev Biol* 407 (1):115-30. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.08.002.
- Gokey, J. J., Y. Ji, H. G. Tay, B. Litts, and J. D. Amack. 2016. "Kupffer's vesicle size threshold for robust left-right patterning of the zebrafish embryo." *Dev Dyn* 245 (1):22-33. doi: 10.1002/dvdy.24355.
- Gong, J., R. Korner, L. Gaitanos, and R. Klein. 2016. "Exosomes mediate cell contact-independent ephrin-Eph signaling during axon guidance." *J Cell Biol* 214 (1):35-44. doi: 10.1083/jcb.201601085.
- Gonzalez-Morales, N., C. Geminard, G. Lebreton, D. Cerezo, J. B. Coutelis, and S. Noselli. 2015. "The Atypical Cadherin Dachous Controls Left-Right Asymmetry in *Drosophila*." *Dev Cell* 33 (6):675-89. doi: 10.1016/j.devcel.2015.04.026.
- Goodrich, L. V., and D. Strutt. 2011. "Principles of planar polarity in animal development." *Development* 138 (10):1877-92. doi: 10.1242/dev.054080.
- Gore, J., Z. Bryant, M. Nollmann, M. U. Le, N. R. Cozzarelli, and C. Bustamante. 2006. "DNA overwinds when stretched." *Nature* 442 (7104):836-9. doi: 10.1038/nature04974.
- Gradilla, A. C., E. Gonzalez, I. Seijo, G. Andres, M. Bischoff, L. Gonzalez-Mendez, V. Sanchez, A. Callejo, C. Ibanez, M. Guerra, J. R. Ortigao-Farias, J. D. Sutherland, M. Gonzalez, R. Barrio, J. M. Falcon-Perez, and I. Guerrero. 2014. "Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion." *Nat Commun* 5:5649. doi: 10.1038/ncomms6649.
- Grande, C., and N. H. Patel. 2009. "Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails." *Nature* 457 (7232):1007-11. doi: 10.1038/nature07603.
- Gray, R. S., I. Roszko, and L. Solnica-Krezel. 2011. "Planar cell polarity: coordinating morphogenetic cell behaviors with embryonic polarity." *Dev Cell* 21 (1):120-33. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.011.
- Greenberg, M. J., and E. M. Ostap. 2013. "Regulation and control of myosin-I by the motor and light chain-binding domains." *Trends Cell Biol* 23 (2):81-9. doi: 10.1016/j.tcb.2012.10.008.

- Grimes, D. T., and R. D. Burdine. 2017. "Left-Right Patterning: Breaking Symmetry to Asymmetric Morphogenesis." *Trends Genet* 33 (9):616-628. doi: 10.1016/j.tig.2017.06.004.
- Grimes, D. T., J. L. Keynton, M. T. Buenavista, X. Jin, S. H. Patel, S. Kyosuke, J. Vibert, D. J. Williams, H. Hamada, R. Hussain, S. M. Nauli, and D. P. Norris. 2016. "Genetic Analysis Reveals a Hierarchy of Interactions between Polycystin-Encoding Genes and Genes Controlling Cilia Function during Left-Right Determination." *PLoS Genet* 12 (6):e1006070. doi: 10.1371/journal.pgen.1006070.
- Gros, J., K. Feistel, C. Viebahn, M. Blum, and C. J. Tabin. 2009. "Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick." *Science* 324 (5929):941-4. doi: 10.1126/science.1172478.
- Gross, J. C., V. Chaudhary, K. Bartscherer, and M. Boutros. 2012. "Active Wnt proteins are secreted on exosomes." *Nat Cell Biol* 14 (10):1036-45. doi: 10.1038/ncb2574.
- Gunturkun, O., and S. Ocklenburg. 2017. "Ontogenesis of Lateralization." *Neuron* 94 (2):249-263. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.045.
- Gutierrez-Vazquez, C., C. Villarroja-Beltri, M. Mittelbrunn, and F. Sanchez-Madrid. 2013. "Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions." *Immunol Rev* 251 (1):125-42. doi: 10.1111/imr.12013.
- Hagmann, J. 1993. "Pattern formation and handedness in the cytoskeleton of human platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (8):3280-3.
- Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl. 1983. "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." *J Cell Biol* 97 (2):329-39.
- Hashimoto, H., M. Rebagliati, N. Ahmad, O. Muraoka, T. Kurokawa, M. Hibi, and T. Suzuki. 2004. "The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish." *Development* 131 (8):1741-53. doi: 10.1242/dev.01070.
- Hashimoto, M., and H. Hamada. 2010. "Translation of anterior-posterior polarity into left-right polarity in the mouse embryo." *Curr Opin Genet Dev* 20 (4):433-7. doi: 10.1016/j.gde.2010.04.002.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich, and S. D. Emr. 2011. "The ESCRT pathway." *Dev Cell* 21 (1):77-91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.
- Henne, W. M., H. Stenmark, and S. D. Emr. 2013. "Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (9). doi: 10.1101/cshperspect.a016766.
- Hildebrandt, F., T. Benzing, and N. Katsanis. 2011. "Ciliopathies." *N Engl J Med* 364 (16):1533-43. doi: 10.1056/NEJMra1010172.
- Hilfinger, A., and F. Julicher. 2008. "The chirality of ciliary beats." *Phys Biol* 5 (1):016003. doi: 10.1088/1478-3975/5/1/016003.
- Hirokawa, N., Y. Tanaka, and Y. Okada. 2009. "Left-right determination: involvement of molecular motor KIF3, cilia, and nodal flow." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (1):a000802. doi: 10.1101/cshperspect.a000802.
- Hochgreb-Hagele, T., C. Yin, D. E. Koo, M. E. Bronner, and D. Y. Stainier. 2013. "Laminin beta1a controls distinct steps during the establishment of digestive organ laterality." *Development* 140 (13):2734-45. doi: 10.1242/dev.097618.
- Hokanson, D. E., J. M. Laakso, T. Lin, D. Sept, and E. M. Ostap. 2006. "Myo1c binds phosphoinositides through a putative pleckstrin homology domain." *Mol Biol Cell* 17 (11):4856-65. doi: 10.1091/mbc.E06-05-0449.
- Horne-Badovinac, S., M. Rebagliati, and D. Y. Stainier. 2003. "A cellular framework for gut-looping morphogenesis in zebrafish." *Science* 302 (5645):662-5. doi: 10.1126/science.1085397.
- Hozumi, S., R. Maeda, K. Taniguchi, M. Kanai, S. Shirakabe, T. Sasamura, P. Speder, S. Noselli, T. Aigaki, R. Murakami, and K. Matsuno. 2006. "An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs." *Nature* 440 (7085):798-802. doi: 10.1038/nature04625.
- Hozumi, S., R. Maeda, M. Taniguchi-Kanai, T. Okumura, K. Taniguchi, Y. Kawakatsu, N. Nakazawa, R. Hatori, and K. Matsuno. 2008. "Head region of unconventional myosin I family members is

- responsible for the organ-specificity of their roles in left-right polarity in *Drosophila*." *Dev Dyn* 237 (12):3528-37. doi: 10.1002/dvdy.21583.
- Hurley, J. H. 2015. "ESCRTs are everywhere." *Embo j* 34 (19):2398-407. doi: 10.15252/embj.201592484.
- Hurley, J. H., E. Boura, L. A. Carlson, and B. Rozycki. 2010. "Membrane budding." *Cell* 143 (6):875-87. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.030.
- Hutter, H., and R. Schnabel. 1995a. "Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events." *Development* 121 (10):3417-24.
- Hutter, H., and R. Schnabel. 1995b. "Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction." *Development* 121 (5):1559-68.
- Hyenne, V., A. Apaydin, D. Rodriguez, C. Spiegelhalter, S. Hoff-Yoessle, M. Diem, S. Tak, O. Lefebvre, Y. Schwab, J. G. Goetz, and M. Labouesse. 2015. "RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion." *J Cell Biol* 211 (1):27-37. doi: 10.1083/jcb.201504136.
- Iavello, A., V. S. Frech, C. Gai, M. C. Deregibus, P. J. Quesenberry, and G. Camussi. 2016. "Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis." *Int J Mol Med* 37 (4):958-66. doi: 10.3892/ijmm.2016.2488.
- Inaki, M., J. Liu, and K. Matsuno. 2016. "Cell chirality: its origin and roles in left-right asymmetric development." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371 (1710). doi: 10.1098/rstb.2015.0403.
- Jimenez, A. J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez. 2014. "ESCRT machinery is required for plasma membrane repair." *Science* 343 (6174):1247136. doi: 10.1126/science.1247136.
- Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987. "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." *J Biol Chem* 262 (19):9412-20.
- Juan, T., and M. Furthauer. 2015. "[The ESCRT complex: from endosomal transport to the development of multicellular organisms]." *Biol Aujourdhui* 209 (1):111-24. doi: 10.1051/jbio/2015009.
- Juan, T., and M. Furthauer. 2017. "Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles." *Semin Cell Dev Biol*. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.022.
- Juryneć, M. J., R. Xia, J. J. Mackrill, D. Gunther, T. Crawford, K. M. Flanigan, J. J. Abramson, M. T. Howard, and D. J. Grunwald. 2008. "Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (34):12485-90. doi: 10.1073/pnas.0806015105.
- Kamura, K., D. Kobayashi, Y. Uehara, S. Koshida, N. Iijima, A. Kudo, T. Yokoyama, and H. Takeda. 2011. "Pkd1l1 complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis." *Development* 138 (6):1121-9. doi: 10.1242/dev.058271.
- Karlebach, G., and C. Francks. 2015. "Lateralization of gene expression in human language cortex." *Cortex* 67:30-6. doi: 10.1016/j.cortex.2015.03.003.
- Kartagener, M., and A. Horlacher. 1936. *Situs viscerum inversus und Polyposis nasi in einem Falle familiaerer Bronchiektasien*.
- Kim, S., H. Nie, V. Nesin, U. Tran, P. Outeda, C. X. Bai, J. Keeling, D. Maskey, T. Watnick, O. Wessely, and L. Tsiokas. 2016. "The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling." *Nat Cell Biol* 18 (7):752-764. doi: 10.1038/ncb3363.
- Kim, S. V., and R. A. Flavell. 2008. "Myosin I: from yeast to human." *Cell Mol Life Sci* 65 (14):2128-37. doi: 10.1007/s00018-008-7435-5.
- Kobayashi, H., N. Tanaka, H. Asao, S. Miura, M. Kyuuma, K. Semura, N. Ishii, and K. Sugamura. 2005. "Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transducing adaptor molecule 1 and 2." *J Biol Chem* 280 (11):10468-77. doi: 10.1074/jbc.M409969200.
- Kobayashi, Y., M. Watanabe, Y. Okada, H. Sawa, H. Takai, M. Nakanishi, Y. Kawase, H. Suzuki, K. Nagashima, K. Ikeda, and N. Motoyama. 2002. "Hydrocephalus, situs inversus, chronic

- sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome." *Mol Cell Biol* 22 (8):2769-76.
- Kok, F. O., M. Shin, C. W. Ni, A. Gupta, A. S. Grosse, A. van Impel, B. C. Kirchmaier, J. Peterson-Maduro, G. Kourkoulis, I. Male, D. F. DeSantis, S. Sheppard-Tindell, L. Ebarasi, C. Betsholtz, S. Schulte-Merker, S. A. Wolfe, and N. D. Lawson. 2015. "Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish." *Dev Cell* 32 (1):97-108. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.018.
- Koles, K., and V. Budnik. 2012. "Exosomes go with the Wnt." *Cell Logist* 2 (3):169-173. doi: 10.4161/cl.21981.
- Komori, Y., A. H. Iwane, and T. Yanagida. 2007. "Myosin-V makes two brownian 90 degrees rotations per 36-nm step." *Nat Struct Mol Biol* 14 (10):968-73. doi: 10.1038/nsmb1298.
- Korkut, C., B. Ataman, P. Ramachandran, J. Ashley, R. Barria, N. Gherbesi, and V. Budnik. 2009. "Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless." *Cell* 139 (2):393-404. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.051.
- Kowal, J., G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J. P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, and C. Thery. 2016. "Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (8):E968-77. doi: 10.1073/pnas.1521230113.
- Kramer-Zucker, A. G., F. Olale, C. J. Haycraft, B. K. Yoder, A. F. Schier, and I. A. Drummond. 2005. "Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis." *Development* 132 (8):1907-21. doi: 10.1242/dev.01772.
- Krasnow, R. E., L. L. Wong, and P. N. Adler. 1995. "Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in Drosophila." *Development* 121 (12):4095-102.
- Kreiling, J. A., Z. L. Balantac, A. R. Crawford, Y. Ren, J. Toure, S. Zchut, L. Kochilas, and R. Creton. 2008. "Suppression of the endoplasmic reticulum calcium pump during zebrafish gastrulation affects left-right asymmetry of the heart and brain." *Mech Dev* 125 (5-6):396-410. doi: 10.1016/j.mod.2008.02.004.
- Kreiling, J. A., G. Williams, and R. Creton. 2007. "Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment." *Dev Dyn* 236 (7):1963-9. doi: 10.1002/dvdy.21191.
- Krendel, M., and M. S. Mooseker. 2005. "Myosins: tails (and heads) of functional diversity." *Physiology (Bethesda)* 20:239-51. doi: 10.1152/physiol.00014.2005.
- Kunadt, M., K. Eckermann, A. Stuenkel, J. Gong, B. Russo, K. Strauss, S. Rai, S. Kugler, L. Falomir Lockhart, M. Schwalbe, P. Krumova, L. M. Oliveira, M. Bahr, W. Mobius, J. Levin, A. Giese, N. Kruse, B. Mollenhauer, R. Geiss-Friedlander, A. C. Ludolph, A. Freischmidt, M. S. Feiler, K. M. Danzer, M. Zweckstetter, T. M. Jovin, M. Simons, J. H. Weishaupt, and A. Schneider. 2015. "Extracellular vesicle sorting of alpha-Synuclein is regulated by sumoylation." *Acta Neuropathol* 129 (5):695-713. doi: 10.1007/s00401-015-1408-1.
- Kupffer, C. 1868. Beobachtungen über die Entwicklung der Knochenfische.
- Lachenal, G., K. Pernet-Gallay, M. Chivet, F. J. Hemming, A. Belly, G. Bodon, B. Blot, G. Haase, Y. Goldberg, and R. Sadoul. 2011. "Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity." *Mol Cell Neurosci* 46 (2):409-18. doi: 10.1016/j.mcn.2010.11.004.
- Lata, S., G. Schoehn, A. Jain, R. Pires, J. Piehler, H. G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2008. "Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4." *Science* 321 (5894):1354-7. doi: 10.1126/science.1161070.
- Laulagnier, K., D. Grand, A. Dujardin, S. Hamdi, H. Vincent-Schneider, D. Lankar, J. P. Salles, C. Bonnerot, B. Perret, and M. Record. 2004. "PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes." *FEBS Lett* 572 (1-3):11-4. doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.082.

- Lenhart, K. F., N. G. Holtzman, J. R. Williams, and R. D. Burdine. 2013. "Integration of nodal and BMP signals in the heart requires FoxH1 to create left-right differences in cell migration rates that direct cardiac asymmetry." *PLoS Genet* 9 (1):e1003109. doi: 10.1371/journal.pgen.1003109.
- Levin, M., R. L. Johnson, C. D. Stern, M. Kuehn, and C. Tabin. 1995. "A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis." *Cell* 82 (5):803-14.
- Levin, M., and A. R. Palmer. 2007. "Left-right patterning from the inside out: widespread evidence for intracellular control." *Bioessays* 29 (3):271-87. doi: 10.1002/bies.20545.
- Levin, M., T. Thorlin, K. R. Robinson, T. Nogi, and M. Mercola. 2002. "Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning." *Cell* 111 (1):77-89.
- Liegeois, S., A. Benedetto, J. M. Garnier, Y. Schwab, and M. Labouesse. 2006. "The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*." *J Cell Biol* 173 (6):949-61. doi: 10.1083/jcb.200511072.
- Lin, Y., L. A. Kimpler, T. V. Naismith, J. M. Lauer, and P. I. Hanson. 2005. "Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1." *J Biol Chem* 280 (13):12799-809. doi: 10.1074/jbc.M413968200.
- Liu, M. M., J. W. Davey, R. Banerjee, J. Han, F. Yang, A. Aboobaker, M. L. Blaxter, and A. Davison. 2013. "Fine mapping of the pond snail left-right asymmetry (chirality) locus using RAD-Seq and fibre-FISH." *PLoS One* 8 (8):e71067. doi: 10.1371/journal.pone.0071067.
- Logan, M., S. M. Pagan-Westphal, D. M. Smith, L. Paganessi, and C. J. Tabin. 1998. "The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals." *Cell* 94 (3):307-17.
- Loncle, N., M. Agromayor, J. Martin-Serrano, and D. W. Williams. 2015. "An ESCRT module is required for neuron pruning." *Sci Rep* 5:8461. doi: 10.1038/srep08461.
- Long, H., F. Zhang, N. Xu, G. Liu, D. R. Diener, J. L. Rosenbaum, and K. Huang. 2016. "Comparative Analysis of Ciliary Membranes and Ectosomes." *Curr Biol* 26 (24):3327-3335. doi: 10.1016/j.cub.2016.09.055.
- Long, S., N. Ahmad, and M. Rebagliati. 2003. "The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry." *Development* 130 (11):2303-16.
- Lopes, S. S., R. Lourenco, L. Pacheco, N. Moreno, J. Kreiling, and L. Saude. 2010. "Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control." *Development* 137 (21):3625-32. doi: 10.1242/dev.054452.
- Luga, V., L. Zhang, A. M. Vitoria-Petit, A. A. Ogunjimi, M. R. Inanlou, E. Chiu, M. Buchanan, A. N. Hosein, M. Basik, and J. L. Wrana. 2012. "Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration." *Cell* 151 (7):1542-56. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024.
- Luhtala, N., A. Aslanian, J. R. Yates, 3rd, and T. Hunter. 2017. "Secreted Glioblastoma Nanovesicles Contain Intracellular Signaling Proteins and Active Ras Incorporated in a Farnesylation-dependent Manner." *J Biol Chem* 292 (2):611-628. doi: 10.1074/jbc.M116.747618.
- MacDonald, C., N. J. Buchkovich, D. K. Stringer, S. D. Emr, and R. C. Piper. 2012. "Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation." *EMBO Rep* 13 (4):331-8. doi: 10.1038/embor.2012.18.
- Maeda, R. K., and F. Karch. 2009. "The bithorax complex of *Drosophila* an exceptional Hox cluster." *Curr Top Dev Biol* 88:1-33. doi: 10.1016/s0070-2153(09)88001-0.
- Mahaffey, J. P., J. Grego-Bessa, K. F. Liem, Jr., and K. V. Anderson. 2013. "Cofilin and Vangl2 cooperate in the initiation of planar cell polarity in the mouse embryo." *Development* 140 (6):1262-71. doi: 10.1242/dev.085316.
- Maminska, A., A. Bartosik, M. Banach-Orlowska, I. Pilecka, K. Jastrzebski, D. Zdzalik-Bielecka, I. Castanon, M. Poulain, C. Neyen, L. Wolinska-Niziol, A. Torun, E. Szymanska, A. Kowalczyk, K. Piwocka, A. Simonsen, H. Stenmark, M. Furthauer, M. Gonzalez-Gaitan, and M. Miaczynska.

2016. "ESCRT proteins restrict constitutive NF-kappaB signaling by trafficking cytokine receptors." *Sci Signal* 9 (411):ra8. doi: 10.1126/scisignal.aad0848.
- Mathivanan, S., H. Ji, and R. J. Simpson. 2010. "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." *J Proteomics* 73 (10):1907-20. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- Matsui, T., H. Ishikawa, and Y. Bessho. 2015. "Cell collectivity regulation within migrating cell cluster during Kupffer's vesicle formation in zebrafish." *Front Cell Dev Biol* 3:27. doi: 10.3389/fcell.2015.00027.
- Matsui, T., S. Thitamadee, T. Murata, H. Kakinuma, T. Nabetani, Y. Hirabayashi, Y. Hirate, H. Okamoto, and Y. Bessho. 2011. "Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (24):9881-6. doi: 10.1073/pnas.1017248108.
- Matusek, T., F. Wendler, S. Poles, S. Pizette, G. D'Angelo, M. Furthauer, and P. P. Therond. 2014. "The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog." *Nature* 516 (7529):99-103. doi: 10.1038/nature13847.
- Matusek, T., F. Wendler, S. Polès, S. Pizette, G. D'Angelo, M. Fürthauer, and P. P. Théron. 2014. "The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog." *Nature* 516 (7529):99-103. doi: 10.1038/nature13847.
- May-Simera, H. L., M. Kai, V. Hernandez, D. P. Osborn, M. Tada, and P. L. Beales. 2010. "Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish." *Dev Biol* 345 (2):215-25. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.07.013.
- McCullough, J., L. A. Colf, and W. I. Sundquist. 2013. "Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway." *Annu Rev Biochem* 82:663-92. doi: 10.1146/annurev-biochem-072909-101058.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. "Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function." *J Cell Biol* 138 (4):771-81.
- McGough, I. J., and J. P. Vincent. 2016. "Exosomes in developmental signalling." *Development* 143 (14):2482-93. doi: 10.1242/dev.126516.
- McGrath, J., S. Somlo, S. Makova, X. Tian, and M. Brueckner. 2003. "Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse." *Cell* 114 (1):61-73.
- Melby, A. E., R. M. Warga, and C. B. Kimmel. 1996. "Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula." *Development* 122 (7):2225-37.
- Meno, C., K. Gritsman, S. Ohishi, Y. Ohfuji, E. Heckscher, K. Mochida, A. Shimono, H. Kondoh, W. S. Talbot, E. J. Robertson, A. F. Schier, and H. Hamada. 1999. "Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation." *Mol Cell* 4 (3):287-98.
- Meno, C., A. Shimono, Y. Saijoh, K. Yashiro, K. Mochida, S. Ohishi, S. Noji, H. Kondoh, and H. Hamada. 1998. "lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal." *Cell* 94 (3):287-97.
- Minegishi, K., M. Hashimoto, R. Ajima, K. Takaoka, K. Shinohara, Y. Ikawa, H. Nishimura, A. P. McMahon, K. Willert, Y. Okada, H. Sasaki, D. Shi, T. Fujimori, T. Ohtsuka, Y. Igarashi, T. P. Yamaguchi, A. Shimono, H. Shiratori, and H. Hamada. 2017. "A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking." *Dev Cell* 40 (5):439-452.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.010.
- Mizuno, H., C. Higashida, Y. Yuan, T. Ishizaki, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2011. "Rotational movement of the formin mDia1 along the double helical strand of an actin filament." *Science* 331 (6013):80-3. doi: 10.1126/science.1197692.
- Molina, M. D., N. de Croze, E. Haillet, and T. Lepage. 2013. "Nodal: master and commander of the dorsal-ventral and left-right axes in the sea urchin embryo." *Curr Opin Genet Dev* 23 (4):445-53. doi: 10.1016/j.gde.2013.04.010.
- Montenegro-Johnson, T. D., D. I. Baker, D. J. Smith, and S. S. Lopes. 2016. "Three-dimensional flow in Kupffer's Vesicle." *J Math Biol* 73 (3):705-25. doi: 10.1007/s00285-016-0967-7.

- Moore, P. B., H. E. Huxley, and D. J. DeRosier. 1970. "Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments." *J Mol Biol* 50 (2):279-95.
- Moreno-Gonzalo, O., C. Villarroya-Beltri, and F. Sanchez-Madrid. 2014. "Post-translational modifications of exosomal proteins." *Front Immunol* 5:383. doi: 10.3389/fimmu.2014.00383.
- Moreno-Mateos, M. A., C. E. Vejnár, J. D. Beaudoin, J. P. Fernandez, E. K. Mis, M. K. Khokha, and A. J. Giraldez. 2015. "CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo." *Nat Methods* 12 (10):982-8. doi: 10.1038/nmeth.3543.
- Morita, E., V. Sandrin, H. Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch, and W. I. Sundquist. 2007. "Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis." *Embo j* 26 (19):4215-27. doi: 10.1038/sj.emboj.7601850.
- Morita, E., and W. I. Sundquist. 2004. "Retrovirus budding." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:395-425. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102350.
- Muntasell, A., A. C. Berger, and P. A. Roche. 2007. "T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes." *Embo j* 26 (19):4263-72. doi: 10.1038/sj.emboj.7601842.
- Murrow, L., R. Malhotra, and J. Debnath. 2015. "ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function." *Nat Cell Biol* 17 (3):300-10. doi: 10.1038/ncb3112.
- Nabhan, J. F., R. Hu, R. S. Oh, S. N. Cohen, and Q. Lu. 2012. "Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (11):4146-51. doi: 10.1073/pnas.1200448109.
- Naganathan, S. R., S. Furthauer, M. Nishikawa, F. Julicher, and S. W. Grill. 2014. "Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left-right symmetry breaking." *Elife* 3:e04165. doi: 10.7554/eLife.04165.
- Naganathan, S. R., T. C. Middelkoop, S. Furthauer, and S. W. Grill. 2016. "Actomyosin-driven left-right asymmetry: from molecular torques to chiral self organization." *Curr Opin Cell Biol* 38:24-30. doi: 10.1016/j.ceb.2016.01.004.
- Nager, A. R., J. S. Goldstein, V. Herranz-Perez, D. Portran, F. Ye, J. M. Garcia-Verdugo, and M. V. Nachury. 2017. "An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling." *Cell* 168 (1-2):252-263.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.036.
- Nakamura, T., N. Mine, E. Nakaguchi, A. Mochizuki, M. Yamamoto, K. Yashiro, C. Meno, and H. Hamada. 2006. "Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system." *Dev Cell* 11 (4):495-504. doi: 10.1016/j.devcel.2006.08.002.
- Nambiar, R., R. E. McConnell, and M. J. Tyska. 2010. "Myosin motor function: the ins and outs of actin-based membrane protrusions." *Cell Mol Life Sci* 67 (8):1239-54. doi: 10.1007/s00018-009-0254-5.
- Navis, A., L. Marjoram, and M. Bagnat. 2013. "Cftr controls lumen expansion and function of Kupffer's vesicle in zebrafish." *Development* 140 (8):1703-12. doi: 10.1242/dev.091819.
- Neugebauer, J. M., J. D. Amack, A. G. Peterson, B. W. Bisgrove, and H. J. Yost. 2009. "FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia." *Nature* 458 (7238):651-4. doi: 10.1038/nature07753.
- Ngo, K. X., N. Kodera, E. Katayama, T. Ando, and T. Q. Uyeda. 2015. "Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy." *Elife* 4. doi: 10.7554/eLife.04806.
- Nickerson, D. P., M. West, R. Henry, and G. Odorizzi. 2010. "Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles." *Mol Biol Cell* 21 (6):1023-32. doi: 10.1091/mbc.E09-09-0776.
- Nishide, K., M. Mugitani, G. Kumano, and H. Nishida. 2012. "Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae." *Development* 139 (8):1467-75. doi: 10.1242/dev.076083.

- Nishizaka, T., T. Yagi, Y. Tanaka, and S. Ishiwata. 1993. "Right-handed rotation of an actin filament in an in vitro motile system." *Nature* 361 (6409):269-71. doi: 10.1038/361269a0.
- Noel, E. S., M. Verhoeven, A. K. Lagendijk, F. Tessadori, K. Smith, S. Choorapoikayil, J. den Hertog, and J. Bakkers. 2013. "A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality." *Nat Commun* 4:2754. doi: 10.1038/ncomms3754.
- Nonaka, S., H. Shiratori, Y. Saijoh, and H. Hamada. 2002. "Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow." *Nature* 418 (6893):96-9. doi: 10.1038/nature00849.
- Nonaka, S., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido, and N. Hirokawa. 1998. "Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein." *Cell* 95 (6):829-37.
- Nonaka, S., S. Yoshida, D. Watanabe, S. Ikeuchi, T. Goto, W. F. Marshall, and H. Hamada. 2005. "De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia." *PLoS Biol* 3 (8):e268. doi: 10.1371/journal.pbio.0030268.
- Norris, D. P., and D. T. Grimes. 2012. "Developmental biology. Cilia discern left from right." *Science* 338 (6104):206-7. doi: 10.1126/science.1230401.
- Ocana, O. H., H. Coskun, C. Minguillon, P. Murawala, E. M. Tanaka, J. Galceran, R. Munoz-Chapuli, and M. A. Nieto. 2017. "A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates." *Nature* 549 (7670):86-90. doi: 10.1038/nature23454.
- Oishi, I., Y. Kawakami, A. Raya, C. Callol-Massot, and J. C. Izpisua Belmonte. 2006. "Regulation of primary cilia formation and left-right patterning in zebrafish by a noncanonical Wnt signaling mediator, *duboraya*." *Nat Genet* 38 (11):1316-22. doi: 10.1038/ng1892.
- Okabe, N., B. Xu, and R. D. Burdine. 2008. "Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle." *Dev Dyn* 237 (12):3602-12. doi: 10.1002/dvdy.21730.
- Okada, Y., S. Takeda, Y. Tanaka, J. C. Izpisua Belmonte, and N. Hirokawa. 2005. "Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination." *Cell* 121 (4):633-44. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.008.
- Olmos, Y., L. Hodgson, J. Mantell, P. Verkade, and J. G. Carlton. 2015. "ESCRT-III controls nuclear envelope reformation." *Nature* 522 (7555):236-9. doi: 10.1038/nature14503.
- Oteiza, P., M. Koppen, M. L. Concha, and C. P. Heisenberg. 2008. "Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish." *Development* 135 (16):2807-13. doi: 10.1242/dev.022228.
- Oteiza, P., M. Koppen, M. Krieg, E. Pulgar, C. Farias, C. Melo, S. Preibisch, D. Muller, M. Tada, S. Hartel, C. P. Heisenberg, and M. L. Concha. 2010. "Planar cell polarity signalling regulates cell adhesion properties in progenitors of the zebrafish laterality organ." *Development* 137 (20):3459-68. doi: 10.1242/dev.049981.
- Palicharla, V. R., and S. Maddika. 2015. "HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion." *Cell Signal* 27 (12):2355-62. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.001.
- Pan, B. T., and R. M. Johnstone. 1983. "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor." *Cell* 33 (3):967-78.
- Panakova, D., H. Sprong, E. Marois, C. Thiele, and S. Eaton. 2005. "Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling." *Nature* 435 (7038):58-65. doi: 10.1038/nature03504.
- Parchure, A., N. Vyas, C. Ferguson, R. G. Parton, and S. Mayor. 2015. "Oligomerization and endocytosis of Hedgehog is necessary for its efficient exovesicular secretion." *Mol Biol Cell* 26 (25):4700-17. doi: 10.1091/mbc.E15-09-0671.
- Paulozzi, L. J., and J. M. Lary. 1999. "Laterality patterns in infants with external birth defects." *Teratology* 60 (5):265-71. doi: 10.1002/(sici)1096-9926(199911)60:5<265::aid-tera7>3.0.co;2-h.
- Peng, Y., and J. D. Axelrod. 2012. "Asymmetric protein localization in planar cell polarity: mechanisms, puzzles, and challenges." *Curr Top Dev Biol* 101:33-53. doi: 10.1016/b978-0-12-394592-1.00002-8.

- Pennekamp, P., C. Karcher, A. Fischer, A. Schweickert, B. Skryabin, J. Horst, M. Blum, and B. Dworniczak. 2002. "The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice." *Curr Biol* 12 (11):938-43.
- Petzoldt, A. G., J. B. Coutelis, C. Geminard, P. Speder, M. Suzanne, D. Cerezo, and S. Noselli. 2012. "DE-Cadherin regulates unconventional Myosin ID and Myosin IC in *Drosophila* left-right asymmetry establishment." *Development* 139 (10):1874-84. doi: 10.1242/dev.047589.
- Piedra, M. E., J. M. Icardo, M. Albajar, J. C. Rodriguez-Rey, and M. A. Ros. 1998. "Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry." *Cell* 94 (3):319-24.
- Pintado, P., P. Sampaio, B. Tavares, T. D. Montenegro-Johnson, D. J. Smith, and S. S. Lopes. 2017. "Dynamics of cilia length in left-right development." *R Soc Open Sci* 4 (3):161102. doi: 10.1098/rsos.161102.
- Pohl, C. 2011. "Left-right patterning in the *C. elegans* embryo: Unique mechanisms and common principles." *Commun Integr Biol* 4 (1):34-40. doi: 10.4161/cib.4.1.14144.
- Pohl, C., and Z. Bao. 2010. "Chiral forces organize left-right patterning in *C. elegans* by uncoupling midline and anteroposterior axis." *Dev Cell* 19 (3):402-12. doi: 10.1016/j.devcel.2010.08.014.
- Poulain, F. E., and H. J. Yost. 2015. "Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development?" *Development* 142 (20):3456-67. doi: 10.1242/dev.098178.
- Pyrpassopoulos, S., E. A. Feeser, J. N. Mazerik, M. J. Tyska, and E. M. Ostap. 2012. "Membrane-bound myo1c powers asymmetric motility of actin filaments." *Curr Biol* 22 (18):1688-92. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.069.
- Raab, M., M. Gentili, H. de Belly, H. R. Thiam, P. Vargas, A. J. Jimenez, F. Lautenschlaeger, R. Voituriez, A. M. Lennon-Dumenil, N. Manel, and M. Piel. 2016. "ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death." *Science* 352 (6283):359-62. doi: 10.1126/science.aad7611.
- Raff, R. A., and M. Snoke Smith. 2009. "Chapter 7. Axis formation and the rapid evolutionary transformation of larval form." *Curr Top Dev Biol* 86:163-90. doi: 10.1016/s0070-2153(09)01007-2.
- Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins." *Nature* 458 (7237):445-52. doi: 10.1038/nature07961.
- Regan, J. C., M. L. Concha, M. Roussigne, C. Russell, and S. W. Wilson. 2009. "An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry." *Neuron* 61 (1):27-34. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.030.
- Richards, T. A., and T. Cavalier-Smith. 2005. "Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes." *Nature* 436 (7054):1113-8. doi: 10.1038/nature03949.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, and et al. 1989. "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." *Science* 245 (4922):1066-73.
- Robu, M. E., J. D. Larson, A. Nasevicius, S. Beiraghi, C. Brenner, S. A. Farber, and S. C. Ekker. 2007. "p53 activation by knockdown technologies." *PLoS Genet* 3 (5):e78. doi: 10.1371/journal.pgen.0030078.
- Romancino, D. P., G. Paterniti, Y. Campos, A. De Luca, V. Di Felice, A. d'Azzo, and A. Bongiovanni. 2013. "Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells." *FEBS Lett* 587 (9):1379-84. doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.012.
- Roxo-Rosa, M., R. Jacinto, P. Sampaio, and S. S. Lopes. 2015. "The zebrafish Kupffer's vesicle as a model system for the molecular mechanisms by which the lack of Polycystin-2 leads to stimulation of CFTR." *Biol Open* 4 (11):1356-66. doi: 10.1242/bio.014076.
- Ryan, A. K., B. Blumberg, C. Rodriguez-Esteban, S. Yonei-Tamura, K. Tamura, T. Tsukui, J. de la Pena, W. Sabbagh, J. Greenwald, S. Choe, D. P. Norris, E. J. Robertson, R. M. Evans, M. G. Rosenfeld, and J. C. Izpisua Belmonte. 1998. "Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates." *Nature* 394 (6693):545-51. doi: 10.1038/29004.
- Sampaio, P., R. R. Ferreira, A. Guerrero, P. Pintado, B. Tavares, J. Amaro, A. A. Smith, T. Montenegro-Johnson, D. J. Smith, and S. S. Lopes. 2014. "Left-right organizer flow dynamics: how much

- cilia activity reliably yields laterality?" *Dev Cell* 29 (6):716-28. doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.030.
- Sanders, T. A., E. Llagostera, and M. Barna. 2013. "Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning." *Nature* 497 (7451):628-32. doi: 10.1038/nature12157.
- Sarmah, B., A. J. Latimer, B. Appel, and S. R. Wenthe. 2005. "Inositol polyphosphates regulate zebrafish left-right asymmetry." *Dev Cell* 9 (1):133-45. doi: 10.1016/j.devcel.2005.05.002.
- Sase, I., H. Miyata, S. Ishiwata, and K. Kinoshita, Jr. 1997. "Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (11):5646-50.
- Sato, K., T. Hiraiwa, and T. Shibata. 2015. "Cell Chirality Induces Collective Cell Migration in Epithelial Sheets." *Phys Rev Lett* 115 (18):188102. doi: 10.1103/PhysRevLett.115.188102.
- Scheffer, L. L., S. C. Sreetama, N. Sharma, S. Medikayala, K. J. Brown, A. Defour, and J. K. Jaiswal. 2014. "Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair." *Nat Commun* 5:5646. doi: 10.1038/ncomms6646.
- Schier, A. F. 2009. "Nodal morphogens." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (5):a003459. doi: 10.1101/cshperspect.a003459.
- Schnall, B. S., and D. W. Smith. 1974. "Nonrandom laterality of malformations in paired structures." *J Pediatr* 85 (4):509-11.
- Schneider, I., D. W. Houston, M. R. Rebagliati, and D. C. Slusarski. 2008. "Calcium fluxes in dorsal forerunner cells antagonize beta-catenin and alter left-right patterning." *Development* 135 (1):75-84. doi: 10.1242/dev.004713.
- Schonegg, S., A. A. Hyman, and W. B. Wood. 2014. "Timing and mechanism of the initial cue establishing handed left-right asymmetry in *Caenorhabditis elegans* embryos." *Genesis* 52 (6):572-80.
- Schreuder, M. F. 2011. "Unilateral anomalies of kidney development: why is left not right?" *Kidney Int* 80 (7):740-5. doi: 10.1038/ki.2011.204.
- Schweickert, A., T. Weber, T. Beyer, P. Vick, S. Bogusch, K. Feistel, and M. Blum. 2007. "Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*." *Curr Biol* 17 (1):60-6. doi: 10.1016/j.cub.2006.10.067.
- Seegerer, F. J., F. Thuroff, A. Piera Alberola, E. Frey, and J. O. Radler. 2015. "Emergence and Persistence of Collective Cell Migration on Small Circular Micropatterns." *Phys Rev Lett* 114 (22):228102. doi: 10.1103/PhysRevLett.114.228102.
- Sharma, P., and H. McNeill. 2013. "Regulation of long-range planar cell polarity by Fat-Dachsous signaling." *Development* 140 (18):3869-81. doi: 10.1242/dev.094730.
- Shibazaki, Y., M. Shimizu, and R. Kuroda. 2004. "Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo." *Curr Biol* 14 (16):1462-7. doi: 10.1016/j.cub.2004.08.018.
- Shimeld, S. M., and M. Levin. 2006. "Evidence for the regulation of left-right asymmetry in *Ciona intestinalis* by ion flux." *Dev Dyn* 235 (6):1543-53. doi: 10.1002/dvdy.20792.
- Shinohara, K., A. Kawasumi, A. Takamatsu, S. Yoshida, Y. Botilde, N. Motoyama, W. Reith, B. Durand, H. Shiratori, and H. Hamada. 2012. "Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo." *Nat Commun* 3:622. doi: 10.1038/ncomms1624.
- Shiratori, H., K. Yashiro, M. M. Shen, and H. Hamada. 2006. "Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs." *Development* 133 (15):3015-25. doi: 10.1242/dev.02470.
- Shurtleff, M. J., M. M. Temoche-Diaz, K. V. Karfilis, S. Ri, and R. Schekman. 2016. "Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction." *Elife* 5. doi: 10.7554/eLife.19276.
- Silva, M., N. Morsci, K. C. Q. Nguyen, A. Rizvi, C. Rongo, D. H. Hall, and M. M. Barr. 2017. "Cell-Specific alpha-Tubulin Isoform Regulates Ciliary Microtubule Ultrastructure, Intraflagellar Transport, and Extracellular Vesicle Biology." *Curr Biol* 27 (7):968-980. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.039.

- Simon, M. A., A. Xu, H. O. Ishikawa, and K. D. Irvine. 2010. "Modulation of fat:dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed." *Curr Biol* 20 (9):811-7. doi: 10.1016/j.cub.2010.04.016.
- Simonsen, A., and S. A. Tooze. 2009. "Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes." *J Cell Biol* 186 (6):773-82. doi: 10.1083/jcb.200907014.
- Smith, K. A., S. Chocron, S. von der Hardt, E. de Pater, A. Soufan, J. Bussmann, S. Schulte-Merker, M. Hammerschmidt, and J. Bakkers. 2008. "Rotation and asymmetric development of the zebrafish heart requires directed migration of cardiac progenitor cells." *Dev Cell* 14 (2):287-97. doi: 10.1016/j.devcel.2007.11.015.
- Smith, K. A., E. Noel, I. Thurlings, H. Rehmann, S. Chocron, and J. Bakkers. 2011. "Bmp and nodal independently regulate lefty1 expression to maintain unilateral nodal activity during left-right axis specification in zebrafish." *PLoS Genet* 7 (9):e1002289. doi: 10.1371/journal.pgen.1002289.
- Snelson, C. D., K. Santhakumar, M. E. Halpern, and J. T. Gamse. 2008. "Tbx2b is required for the development of the parapineal organ." *Development* 135 (9):1693-702. doi: 10.1242/dev.016576.
- Speder, P., G. Adam, and S. Noselli. 2006. "Type II unconventional myosin controls left-right asymmetry in Drosophila." *Nature* 440 (7085):803-7. doi: 10.1038/nature04623.
- Speder, P., and S. Noselli. 2007. "Left-right asymmetry: class I myosins show the direction." *Curr Opin Cell Biol* 19 (1):82-7. doi: 10.1016/j.ceb.2006.12.006.
- Speder, P., A. Petzoldt, M. Suzanne, and S. Noselli. 2007. "Strategies to establish left/right asymmetry in vertebrates and invertebrates." *Curr Opin Genet Dev* 17 (4):351-8. doi: 10.1016/j.gde.2007.05.008.
- Stanganello, E., A. I. Hagemann, B. Mattes, C. Sinner, D. Meyen, S. Weber, A. Schug, E. Raz, and S. Scholpp. 2015. "Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning." *Nat Commun* 6:5846. doi: 10.1038/ncomms6846.
- Staudt, D., and D. Stainier. 2012. "Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish." *Annu Rev Genet* 46:397-418. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155646.
- Stephen, L. A., E. J. Johnson, G. M. Davis, L. McTeir, J. Pinkham, N. Jaber, and M. G. Davey. 2014. "The chicken left right organizer has nonmotile cilia which are lost in a stage-dependent manner in the talpid(3) ciliopathy." *Genesis* 52 (6):600-13. doi: 10.1002/dvg.22775.
- Stubbs, J. L., I. Oishi, J. C. Izpisua Belmonte, and C. Kintner. 2008. "The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in Xenopus and zebrafish embryos." *Nat Genet* 40 (12):1454-60. doi: 10.1038/ng.267.
- Stuffers, S., A. Brech, and H. Stenmark. 2009. "ESCRT proteins in physiology and disease." *Exp Cell Res* 315 (9):1619-26. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.013.
- Sulik, K., D. B. Dehart, T. Iangaki, J. L. Carson, T. Vrablic, K. Gesteland, and G. C. Schoenwolf. 1994. "Morphogenesis of the murine node and notochordal plate." *Dev Dyn* 201 (3):260-78. doi: 10.1002/aja.1002010309.
- Supatto, W., and J. Vermot. 2011. "From cilia hydrodynamics to zebrafish embryonic development." *Curr Top Dev Biol* 95:33-66. doi: 10.1016/b978-0-12-385065-2.00002-5.
- Superina, S., A. Borovina, and B. Ciruna. 2014. "Analysis of maternal-zygotic ugdh mutants reveals divergent roles for HSPGs in vertebrate embryogenesis and provides new insight into the initiation of left-right asymmetry." *Dev Biol* 387 (2):154-66. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.01.013.
- Supp, D. M., D. P. Witte, S. S. Potter, and M. Brueckner. 1997. "Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice." *Nature* 389 (6654):963-6. doi: 10.1038/40140.

- Suzanne, M., A. G. Petzoldt, P. Speder, J. B. Coutelis, H. Steller, and S. Noselli. 2010. "Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping." *Curr Biol* 20 (19):1773-8. doi: 10.1016/j.cub.2010.08.056.
- Taelman, V. F., R. Dobrowolski, J. L. Plouhinec, L. C. Fuentealba, P. P. Vorwald, I. Gumper, D. D. Sabatini, and E. M. De Robertis. 2010. "Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes." *Cell* 143 (7):1136-48. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.034.
- Takeda, S., Y. Yonekawa, Y. Tanaka, Y. Okada, S. Nonaka, and N. Hirokawa. 1999. "Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A^{-/-} mice analysis." *J Cell Biol* 145 (4):825-36.
- Tamada, A., S. Kawase, F. Murakami, and H. Kamiguchi. 2010. "Autonomous right-screw rotation of growth cone filopodia drives neurite turning." *J Cell Biol* 188 (3):429-41. doi: 10.1083/jcb.200906043.
- Tamai, K., M. Shiina, N. Tanaka, T. Nakano, A. Yamamoto, Y. Kondo, E. Kakazu, J. Inoue, K. Fukushima, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, and K. Sugamura. 2012. "Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway." *Virology* 422 (2):377-85. doi: 10.1016/j.virol.2011.11.009.
- Tamai, K., N. Tanaka, T. Nakano, E. Kakazu, Y. Kondo, J. Inoue, M. Shiina, K. Fukushima, T. Hoshino, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, and K. Sugamura. 2010. "Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein." *Biochem Biophys Res Commun* 399 (3):384-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.083.
- Tanaka, Y., Y. Okada, and N. Hirokawa. 2005. "FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination." *Nature* 435 (7039):172-7. doi: 10.1038/nature03494.
- Tang, S., W. M. Henne, P. P. Borbat, N. J. Buchkovich, J. H. Freed, Y. Mao, J. C. Fromme, and S. D. Emr. 2015. "Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments." *Elife* 4. doi: 10.7554/eLife.12548.
- Taniguchi, K., R. Maeda, T. Ando, T. Okumura, N. Nakazawa, R. Hatori, M. Nakamura, S. Hozumi, H. Fujiwara, and K. Matsuno. 2011. "Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis." *Science* 333 (6040):339-41. doi: 10.1126/science.1200940.
- Tavares, B., R. Jacinto, P. Sampaio, S. Pestana, A. Pinto, A. Vaz, M. Roxo-Rosa, R. Gardner, T. Lopes, B. Schilling, I. Henry, L. Saude, and S. S. Lopes. 2017. "Notch/Her12 signalling modulates, motile/immotile cilia ratio downstream of Foxj1a in zebrafish left-right organizer." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.25165.
- Tay, H. G., S. K. Schulze, J. Compagnon, F. C. Foley, C. P. Heisenberg, H. J. Yost, S. Abdelilah-Seyfried, and J. D. Amack. 2013. "Lethal giant larvae 2 regulates development of the ciliated organ Kupffer's vesicle." *Development* 140 (7):1550-9. doi: 10.1242/dev.087130.
- Tee, Y. H., T. Shemesh, V. Thiagarajan, R. F. Hariadi, K. L. Anderson, C. Page, N. Volkmann, D. Hanein, S. Sivaramakrishnan, M. M. Kozlov, and A. D. Bershadsky. 2015. "Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton." *Nat Cell Biol* 17 (4):445-57. doi: 10.1038/ncb3137.
- Thery, C. 2011. "Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications." *F1000 Biol Rep* 3:15. doi: 10.3410/b3-15.
- Thomas, C., and D. Strutt. 2012. "The roles of the cadherins Fat and Dachshous in planar polarity specification in Drosophila." *Dev Dyn* 241 (1):27-39. doi: 10.1002/dvdy.22736.
- Thompson, A. G., E. Gray, S. M. Heman-Ackah, I. Mager, K. Talbot, S. E. Andaloussi, M. J. Wood, and M. R. Turner. 2016. "Extracellular vesicles in neurodegenerative disease - pathogenesis to biomarkers." *Nat Rev Neurol* 12 (6):346-57. doi: 10.1038/nrneuro.2016.68.
- Tkach, M., and C. Thery. 2016. "Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go." *Cell* 164 (6):1226-1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.

- Tree, D. R., D. Ma, and J. D. Axelrod. 2002. "A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity." *Semin Cell Dev Biol* 13 (3):217-24.
- Trikic, M. Z., P. Monk, H. Roehl, and L. J. Partridge. 2011. "Regulation of zebrafish hatching by tetraspanin cd63." *PLoS One* 6 (5):e19683. doi: 10.1371/journal.pone.0019683.
- Turing, A. M. 1990. "The chemical basis of morphogenesis. 1953." *Bull Math Biol* 52 (1-2):153-97; discussion 119-52.
- Tzolovsky, G., H. Millo, S. Pathirana, T. Wood, and M. Bownes. 2002. "Identification and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* myosins." *Mol Biol Evol* 19 (7):1041-52.
- Veerkamp, J., F. Rudolph, Z. Cseresnyes, F. Priller, C. Otten, M. Renz, L. Schaefer, and S. Abdelilah-Seyfried. 2013. "Unilateral dampening of Bmp activity by nodal generates cardiac left-right asymmetry." *Dev Cell* 24 (6):660-7. doi: 10.1016/j.devcel.2013.01.026.
- Vidal, M., P. Mangeat, and D. Hoekstra. 1997. "Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation." *J Cell Sci* 110 (Pt 16):1867-77.
- Vietri, M., K. O. Schink, C. Campsteijn, C. S. Wegner, S. W. Schultz, L. Christ, S. B. Thoresen, A. Brech, C. Raiborg, and H. Stenmark. 2015. "Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing." *Nature* 522 (7555):231-5. doi: 10.1038/nature14408.
- Vilfan, A. 2009. "Twirling motion of actin filaments in gliding assays with nonprocessive Myosin motors." *Biophys J* 97 (4):1130-7. doi: 10.1016/j.bpj.2009.06.008.
- Villarroya-Beltri, C., F. Baixauli, M. Mittelbrunn, I. Fernandez-Delgado, D. Torralba, O. Moreno-Gonzalo, S. Baldanta, C. Enrich, S. Guerra, and F. Sanchez-Madrid. 2016. "ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins." *Nat Commun* 7:13588. doi: 10.1038/ncomms13588.
- Vinson, C. R., and P. N. Adler. 1987. "Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*." *Nature* 329 (6139):549-51. doi: 10.1038/329549a0.
- Votteler, J., and W. I. Sundquist. 2013. "Virus budding and the ESCRT pathway." *Cell Host Microbe* 14 (3):232-41. doi: 10.1016/j.chom.2013.08.012.
- Vyas, N., A. Walvekar, D. Tate, V. Lakshmanan, D. Bansal, A. Lo Cicero, G. Raposo, D. Palakodeti, and J. Dhawan. 2014. "Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties." *Sci Rep* 4:7357. doi: 10.1038/srep07357.
- Wallingford, J. B. 2012. "Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos." *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:627-53. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154208.
- Wan, L. Q., K. Ronaldson, M. Guirguis, and G. Vunjak-Novakovic. 2013. "Micropatterning of cells reveals chiral morphogenesis." *Stem Cell Res Ther* 4 (2):24. doi: 10.1186/scrt172.
- Wang, G., A. B. Cadwallader, D. S. Jang, M. Tsang, H. J. Yost, and J. D. Amack. 2011. "The Rho kinase Rock2b establishes anteroposterior asymmetry of the ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish." *Development* 138 (1):45-54. doi: 10.1242/dev.052985.
- Wang, J., R. Kaletsky, M. Silva, A. Williams, L. A. Haas, R. J. Androwski, J. N. Landis, C. Patrick, A. Rashid, D. Santiago-Martinez, M. Gravato-Nobre, J. Hodgkin, D. H. Hall, C. T. Murphy, and M. M. Barr. 2015. "Cell-Specific Transcriptional Profiling of Ciliated Sensory Neurons Reveals Regulators of Behavior and Extracellular Vesicle Biogenesis." *Curr Biol* 25 (24):3232-8. doi: 10.1016/j.cub.2015.10.057.
- Wang, J., M. Silva, L. A. Haas, N. S. Morsci, K. C. Nguyen, D. H. Hall, and M. M. Barr. 2014. "C. elegans ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication." *Curr Biol* 24 (5):519-25. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.002.
- Wang, X., and H. J. Yost. 2008. "Initiation and propagation of posterior to anterior (PA) waves in zebrafish left-right development." *Dev Dyn* 237 (12):3640-7. doi: 10.1002/dvdy.21771.

- Wang, Z., S. Hill, J. M. Luther, D. L. Hachey, and K. L. Schey. 2012. "Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT)." *Proteomics* 12 (2):329-38. doi: 10.1002/pmic.201100477.
- Webster, B. M., P. Colombi, J. Jäger, and C. P. Lusk. 2014. "Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4." *Cell* 159 (2):388-401. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.012.
- Wehman, A. M., C. Poggioli, P. Schweinsberg, B. D. Grant, and J. Nance. 2011. "The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos." *Curr Biol* 21 (23):1951-9. doi: 10.1016/j.cub.2011.10.040.
- Willert, K., and R. Nusse. 2012. "Wnt proteins." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (9):a007864. doi: 10.1101/cshperspect.a007864.
- Wilting, J., and M. Hagedorn. 2011. "Left-right asymmetry in embryonic development and breast cancer: common molecular determinants?" *Curr Med Chem* 18 (36):5519-27.
- Wolff, T., and G. M. Rubin. 1998. "Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*." *Development* 125 (6):1149-59.
- Wood, C. R., K. Huang, D. R. Diener, and J. L. Rosenbaum. 2013. "The cilium secretes bioactive ectosomes." *Curr Biol* 23 (10):906-11. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.019.
- Yamamoto, M., N. Mine, K. Mochida, Y. Sakai, Y. Saijoh, C. Meno, and H. Hamada. 2003. "Nodal signaling induces the midline barrier by activating Nodal expression in the lateral plate." *Development* 130 (9):1795-804.
- Yamanaka, H., and S. Kondo. 2015. "Rotating pigment cells exhibit an intrinsic chirality." *Genes Cells* 20 (1):29-35. doi: 10.1111/gtc.12194.
- Yang, C. H., J. D. Axelrod, and M. A. Simon. 2002. "Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the *Drosophila* compound eye." *Cell* 108 (5):675-88.
- Yin, C., K. Kikuchi, T. Hochgreb, K. D. Poss, and D. Y. Stainier. 2010. "Hand2 regulates extracellular matrix remodeling essential for gut-looping morphogenesis in zebrafish." *Dev Cell* 18 (6):973-84. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.009.
- Yoshioka, H., C. Meno, K. Koshiba, M. Sugihara, H. Itoh, Y. Ishimaru, T. Inoue, H. Ohuchi, E. V. Semina, J. C. Murray, H. Hamada, and S. Noji. 1998. "Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry." *Cell* 94 (3):299-305.
- Yu, X., C. P. Ng, H. Habacher, and S. Roy. 2008. "Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program." *Nat Genet* 40 (12):1445-53. doi: 10.1038/ng.263.
- Yuan, S., L. Zhao, M. Brueckner, and Z. Sun. 2015. "Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry." *Curr Biol* 25 (5):556-67. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.051.
- Zhang, M., S. J. Kenny, L. Ge, K. Xu, and R. Schekman. 2015. "Translocation of interleukin-1beta into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion." *Elife* 4. doi: 10.7554/eLife.11205.
- Zhang, M., and R. Schekman. 2013. "Cell biology. Unconventional secretion, unconventional solutions." *Science* 340 (6132):559-61. doi: 10.1126/science.1234740.
- Zhu, H., S. Guariglia, R. Y. Yu, W. Li, D. Brancho, H. Peinado, D. Lyden, J. Salzer, C. Bennett, and C. W. Chow. 2013. "Mutation of SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth 1C alters production of exosomes." *Mol Biol Cell* 24 (11):1619-37, s1-3. doi: 10.1091/mbc.E12-07-0544.
- Zhu, P., X. Xu, and X. Lin. 2015. "Both ciliary and non-ciliary functions of Foxj1a confer Wnt/beta-catenin signaling in zebrafish left-right patterning." *Biol Open* 4 (11):1376-86. doi: 10.1242/bio.012088.

**Annexe 1 : Revue « Le complexe ESCRT :du
transport endosomal au développement
d'organismes multivellulaires »**

Le complexe ESCRT : du transport endosomal au développement d'organismes multicellulaires

Thomas Juan et Maximilian Fürthauer

Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR 7277, INSERM 1091, Université Nice Sophia Antipolis, 28 avenue Valrose, 06103 Nice, France

Auteur correspondant : Maximilian Fürthauer, furthauer@unice.fr

Reçu le 24 décembre 2014

Résumé – Depuis sa découverte il y a un peu plus de 50 ans, le système endo-lysosomal a émergé comme un processeur central de différentes activités cellulaires. Cette machinerie de transport vésiculaire intervient dans des processus aussi divers que la transduction de stimuli par des récepteurs de facteurs de croissance, le recyclage et la sécrétion de molécules de signalisation ou la régulation autophagique de l'homéostasie cellulaire. En conséquence des dysfonctionnements de la machinerie de transport vésiculaire sont impliqués dans un nombre grandissant de pathologies. Dans cette revue, nous prenons comme exemple le complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) pour illustrer les multiples fonctions exercées par une machinerie de transport endosomal qui a été conservée tout au long de l'évolution. Ici nous décrivons les principes directeurs qui ont émergé de l'étude de la fonction de ces facteurs à l'échelle du développement et de la physiologie d'organismes multicellulaires. Nous illustrerons plus particulièrement le rôle essentiel des ESCRT dans trois fonctions biologiques : la régulation endosomale de la signalisation cellulaire, l'autophagie et son importance pour la morphogénèse neuronale, et enfin la biogénèse et la fonction de vésicules extracellulaires.

Mots clés : ESCRT / endocytose / signalisation / exovésicules / autophagie

Abstract – The ESCRT complex: from endosomal transport to the development of multicellular organisms.

Since its discovery more than 50 years ago, the endo-lysosomal system has emerged as a central integrator of different cellular activities. This vesicular trafficking apparatus governs processes as diverse as the transduction of stimuli by growth factor receptors, the recycling and secretion of signaling molecules and the regulation of cellular homeostasis through autophagy. Accordingly, dysfunctions of the vesicular transport machinery have been linked to a growing number of pathologies. In this review we take the “Endosomal Sorting Complex Required for Transport” (ESCRT) as an example to illustrate the multiple functions of an evolutionarily conserved endosomal transport machinery. We describe the major concepts that have emerged from the study of this machinery at the level of the development and the physiology of multi-cellular organisms. In particular, we highlight the essential contributions of ESCRT proteins on the regulation of three biological processes: the endocytic regulation of cell signaling, autophagy and its role in neuronal morphogenesis and finally the biogenesis and function of extracellular vesicles.

Key words: ESCRT / endocytosis / cell signaling / exovesicles / autophagy

Abréviations

DSL	Delta/Serrate/Lag2
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
ILV	<i>Intra-Luminal Vesicles</i> (vésicules intra-endosomales)
JAK/STAT	<i>Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
MAPK	<i>Mitogen Associated Protein Kinase</i>
MVB	<i>Multi-Vesicular Bodies</i> (endosomes multivésiculaires)
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase

Introduction

Il y a un demi-siècle, Christian de Duve (Prix Nobel de Physiologie et Médecine 1974) désigna par le terme « endocytose » un processus par lequel des invaginations de la membrane plasmique donnent naissance à des vésicules intracellulaires. Depuis cette découverte, l'étude du transport vésiculaire a montré qu'au-delà de l'internalisation et de la digestion de matériel extracellulaire solide (phagocytose) ou liquide (pinocytose), la machinerie d'endocytose contrôle des processus aussi divers que la signalisation par des récepteurs de facteurs de croissance, le recyclage de molécules internalisées vers la surface de la cellule en vue de leur re-sécrétion, ou la digestion par une cellule de ses propres composants (autophagie). Des études récentes ont par ailleurs révélé que de nombreuses protéines endosomales exercent des fonctions qui s'étendent au-delà du système endo-lysosomal.

Dans cette revue nous prenons comme exemple le complexe ESCRT (pour *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) pour illustrer la multiplicité des fonctions exercées par les composants d'une machinerie de transport endosomal. Alors que des études *in vitro* de reconstitution biochimique ou de culture cellulaire ont permis des avancées majeures dans la dissection moléculaire de la machinerie ESCRT, nous résumerons ici l'état de connaissances quant à l'analyse de ces facteurs dans le contexte physiologique d'organismes multicellulaires.

Le complexe ESCRT : composition, mécanismes d'action et fonctions cellulaires

Le complexe ESCRT a été découvert initialement pour son implication dans le transfert de matériel internalisé des endosomes précoces (où s'effectue le premier tri du matériel internalisé) vers les endosomes tardifs qui, eux, assureront le transport vers le compartiment de dégradation lysosomale (Katzmann

et al., 2001; Babst *et al.*, 2002a, 2002b) (figure 1). De par ce rôle, les protéines ESCRT sont essentielles pour contrôler l'activité de différents récepteurs transmembranaires répondant à des facteurs de croissance extracellulaires. Alors que l'internalisation d'un récepteur permet immédiatement de réduire la sensibilité de la cellule au facteur de croissance correspondant, il est important de noter que ce même processus ne suffit pas pour mettre un terme à la signalisation si le récepteur a déjà été activé par le ligand. Dans de nombreux cas le domaine cytoplasmique du récepteur internalisé peut en effet continuer à interagir avec des effecteurs cytoplasmiques (figure 2) (Vieira *et al.*, 1996). Dans ce contexte, les protéines ESCRT mettent un terme à la signalisation en dirigeant l'incorporation de ces molécules dans des vésicules intra-endosomales (ou *Intra-Luminal Vesicles*, ILV, figure 2) qui ne sont plus en contact avec le cytoplasme. Les protéines ESCRT sont ainsi à l'origine de la formation d'un type particulier d'endosome, les endosomes multivésiculaires (ou *Multi-Vesicular Bodies*, MVB) (figure 2).

La machinerie ESCRT est constituée d'une trentaine de protéines qui s'assemblent en 5 sous-complexes fonctionnels (tableau 1). ESCRT-0 identifie et concentre le fret destiné à être incorporé dans les ILV en reconnaissant des molécules qui ont été préalablement conjuguées à l'ubiquitine (une marque protéique de 76 acides aminés) pour initier leur endocytose (figure 3a) (Raiborg *et al.*, 2002). Les complexes ESCRT-I et -II prennent ensuite en charge la cargaison et assurent une première invagination de la membrane endosomale (Wollert & Hurley, 2010) (figure 3b). L'interaction avec la cargaison et ESCRT-I permet par ailleurs à ESCRT-II d'initier la polymérisation de monomères d'ESCRT-III en filaments multiprotéiniques (figure 3c) (Lata *et al.*, 2008). Ces filaments adoptent une forme de spirale qui encerclle à la fois la cargaison et le domaine de membrane endosomale destinés à être incorporés dans une ILV (Henne *et al.*, 2012). De par sa forme pyramidale et son association étroite avec la membrane endosomale, la spirale ESCRT-III déforme l'invagination initialement peu profonde de la membrane en une vésicule qui n'est plus reliée à la membrane limitante de l'endosome que par un mince septum membranaire dont la scission assurera *in fine* la libération de l'ILV néoformée (figure 3d) (Wollert & Hurley, 2010). Finalement, le complexe Vps4 est doté d'une activité ATPase qui fournit l'énergie nécessaire pour assurer un désassemblage des composants et permettre leur réutilisation dans un autre cycle de formation d'ILV (figure 3e) (Lata *et al.*, 2008).

La topologie de leur assemblage permet aux protéines ESCRT d'assurer des déformations membranaires tout à fait particulières. Dans des contextes tels que la formation de vésicules d'endocytose à la

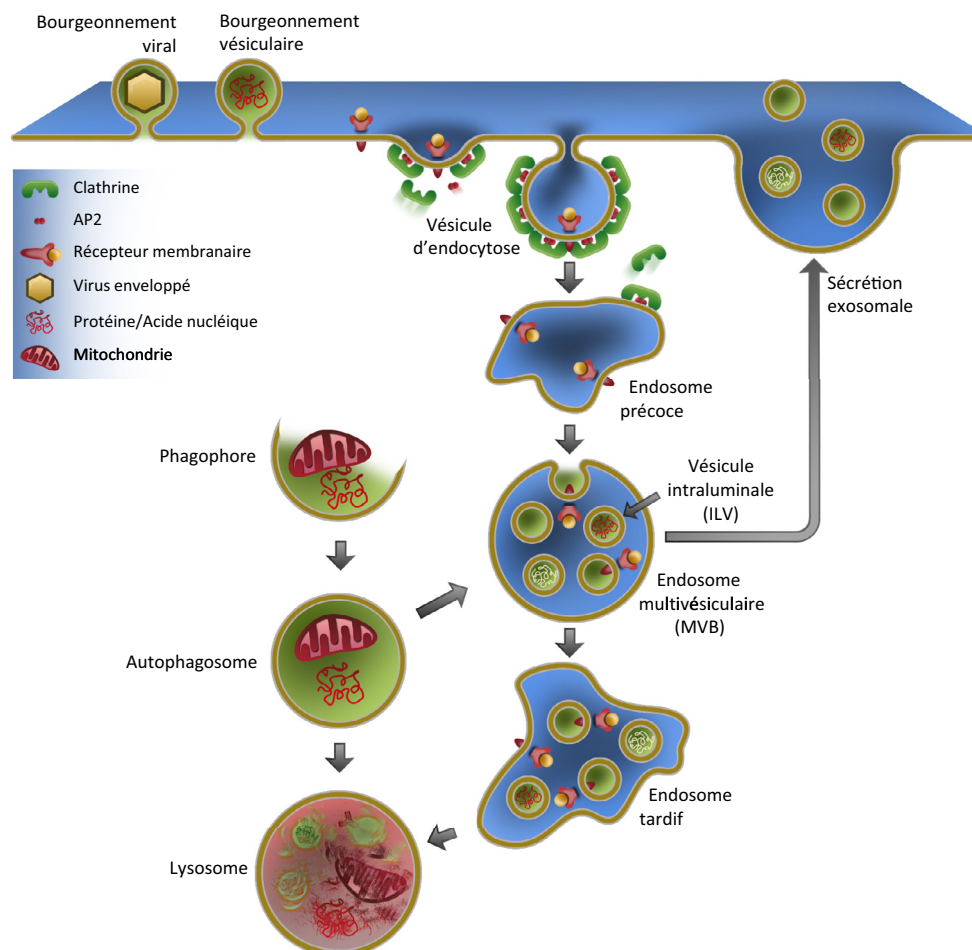


Fig. 1. Rôles cellulaires de la machinerie ESCRT au sein du système endo-membranaire. Des invaginations de la membrane plasmique (ici médiée par un manteau protéique de clathrine) donnent naissance à des vésicules d'endocytose. La vésicule formée est ensuite relâchée dans le cytoplasme, processus suivi du désassemblage du manteau de clathrine ainsi que de la fusion avec l'endosome précoce où s'effectue le tri du matériel internalisé. Le complexe ESCRT intervient ensuite pour incorporer le fret transmembranaire par évagination de la membrane endosomale dans des vésicules intraluminales (ILV), aboutissant à la formation d'endosomes multivésiculaires (MVB). Ces endosomes s'acidifient et mûrissent en endosomes tardifs pour finir par fusionner avec les lysosomes, entraînant la dégradation de leur contenu. Les protéines ESCRT interviennent également dans la digestion de composants cytoplasmiques par des vésicules d'autophagie (autophagosome). Celles-ci se forment à la suite de la séquestration de matériel par des phagophores. Outre la fonction endosomale d'ESCRT, des rôles importants concernant la libération de vésicules extracellulaires ont été rapportés, *via* deux voies indépendantes. D'une part les ILV des MVB peuvent être relâchées sous forme d'exosomes après fusion des endosomes avec la membrane plasmique. De plus, ESCRT est responsable du bourgeonnement de virus enveloppés et d'exovésicules directement à partir de la surface de la cellule.

membrane plasmique ou le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, la déformation des membranes est assurée par des manteaux protéiques (*e.g.* clathrine /AP2 pour des vésicules d'endocytose, figure 1) qui entourent l'ensemble de la vésicule afin de diriger son *invagination* vers l'intérieur de la cellule. À l'inverse, les protéines ESCRT agissent uniquement au niveau du goulot d'étranglement de la vésicule naissante afin de promouvoir un bourgeonnement vers l'intérieur du MVB,

ce qui équivaut topologiquement à une *évagination* vers l'extérieur de la cellule.

Le système endo-lysosomal assure de multiples connexions entre différents organites membranaires. Il n'est donc guère étonnant que l'activité des ESCRT ait également un impact sur d'autres compartiments vésiculaires, notamment les autophagosomes impliqués dans la dégradation de composants cytoplasmiques (figure 1) (Lee *et al.*, 2007; Rusten *et al.*, 2007). Au-delà de leur rôle dans le transport de

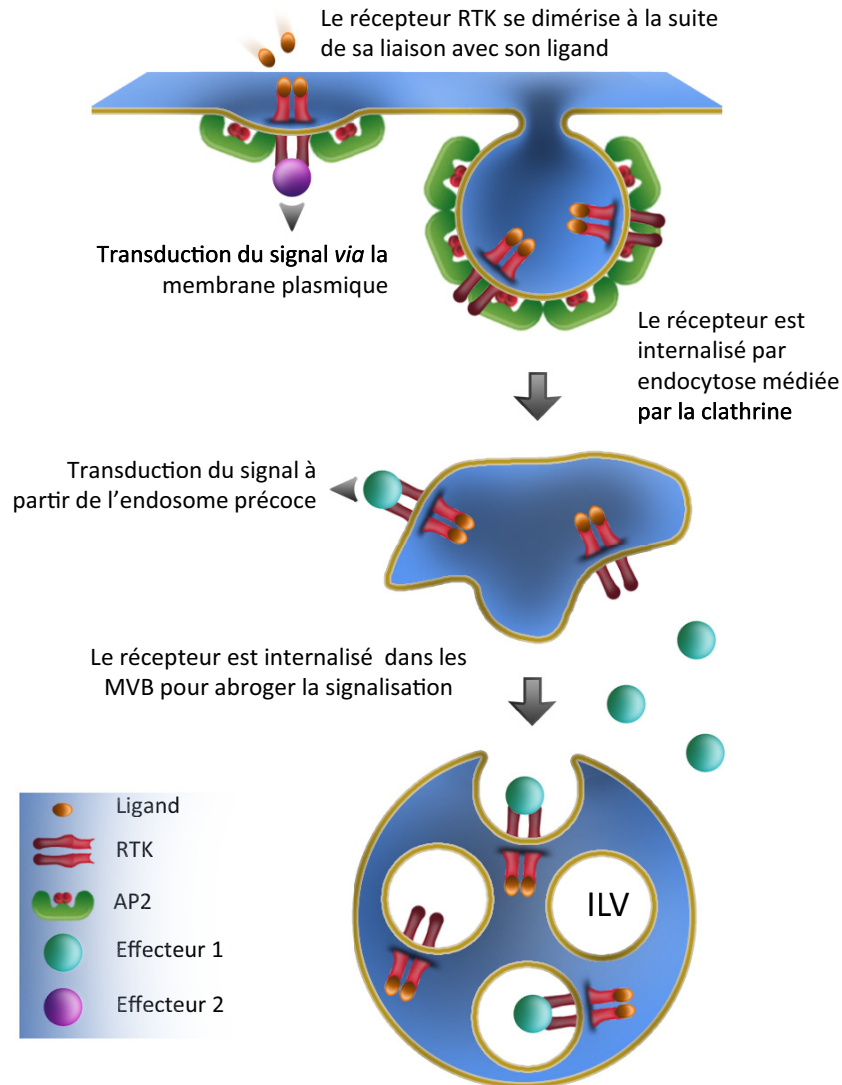


Fig. 2. Le complexe ESCRT abroge la signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Les RTK se dimérisent à la suite de la fixation de facteurs de croissance et activent une cascade d'effecteurs cytoplasmiques nécessaires, qui assurent la transduction d'un signal. Les RTK sont également internalisés par endocytose, transférés vers les endosomes précoces où ils peuvent, dans certains cas, interagir avec des effecteurs différents de ceux présents à la membrane plasmique. L'activité du complexe ESCRT dirige l'incorporation de RTK dans des vésicules intra-luminales (ILV). Comme les ILV matures sont isolées du cytoplasme, ceci met un terme à la transduction du signal.

molécules entre les endosomes précoces et tardifs, les MVB peuvent, dans certaines conditions, agir comme des endosomes sécrétoires qui fusionnent avec la membrane plasmique et relarguent alors leurs vésicules internes (appelés alors exosomes) dans le milieu extracellulaire (figure 1). Un certain nombre de protéines ESCRT ont ainsi été impliquées dans la formation d'exosomes (Baietti *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013). L'implication des ESCRT dans la formation des ILV et des MVB est par ailleurs à l'origine d'un double lien entre les ESCRT et les mécanismes d'ARN interférence : alors qu'il a été montré d'une part que les

MVB sont associés au complexe d'interférence RISC (pour *RNA Induced Silencing Complex*) (Gibbins *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009), il a été montré d'autre part que les exosomes médient la sécrétion et le transport extracellulaire de différents micro-ARN en fonction du contexte cellulaire (Squadrito *et al.*, 2014).

La capacité spécifique des protéines ESCRT à déformer des membranes cellulaires dans le sens d'une évagination de la membrane plasmique est également mise à profit en dehors du système endo-lysosomal. Dans un événement topologiquement analogue à la formation des ILV des MVB, des protéines ESCRT

Tableau 1. Composition, fonctions et interactions des sous-complexes de la machinerie ESCRT.

	ESCRT-0		ESCRT-I		ESCRT-II		ESCRT-III		Vps4		Accessoires	
Composants	Levure	Métazoaires	Levure	Métazoaires	Levure	Métazoaires	Levure	Métazoaires	Levure	Métazoaires	Levure	Métazoaires
		Vps27 Hse1	Hrs Stam1,2	Vps23 Vps28 Vps37 Mvb12 -	Tsg101 Vps28 Vps37a-d Mvb12a,b Ubp1	Vps22 Vps25 Vps36	Vps22 Vps25 Vps36	Vps2 Vps24 Vps32 Vps20 -	Chmp2a,b Chmp3 Chmp4/Snf7a-d Chmp6 Chmp7	Vps4 Vta1 Did2 Vps60 Ist1	Vps4a,b Lip5 Chmp1a,b Chmp5 Ist1	Bro1 Doa4 -
Fonction	Reconnaît les cibles ubiquitinylées au niveau de la membrane.		Forme un pont entre ESCRT-0 et ESCRT-I.		Agit en collaboration avec ESCRT-I pour initier une courbure de la membrane attenante à la cible d'ESCRT-0. Recrute ESCRT-III.		Forme un long filament en spirale qui permet la constriction du goulot de membrane.		Catalyse grâce à son activité enzymatique la dissociation de la spirale ESCRT-III en monomères pour permettre son recyclage.		Alix recrute et stabilise ESCRT-III. Ubp1 et Amsh assurent la dé-ubiquitination de la cible.	
Interactions	Protéique: Ubiquitine, Amsh, Ubp1, Clathrine, ESCRT-I Membranaire: PtdIns-3P		Protéique: Ubiquitine ESCRT-0, ESCRT-I		Protéique: Ubiquitine ESCRT-I, ESCRT-II Membranaire: PtdIns-3P		Protéique: Ubiquitine, Amsh, Ubp1, Alix, ESCRT-II, Vps4 Membranaire: PtdIns-(3,5)P ₂		Protéique: ESCRT-III		Protéique: Ubiquitine ESCRT-0, ESCRT-III	

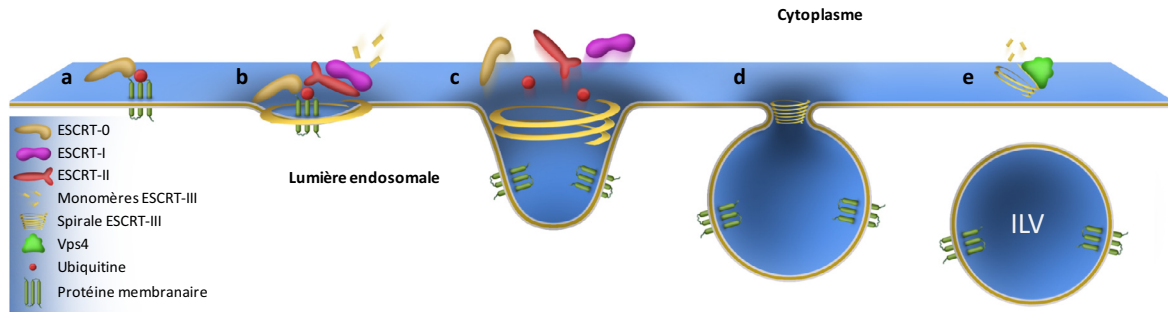


Fig. 3. Mécanisme de déformation des membranes par le complexe ESCRT au cours de la biogénèse endosomale. (a) ESCRT-0 reconnaît les éléments internalisés conjugués à l'ubiquitine. (b) Il recrute ensuite ESCRT-I et ESCRT-II, qui collaborent pour initier une première courbure de la membrane de la future vésicule intra-luminale. ESCRT-II initie par ailleurs l'assemblage de monomères d'ESCRT-III en une spirale qui va encercler la cargaison. (c) La spirale d'ESCRT-III va ensuite continuer à déformer la membrane évaginée, simultanément avec la dé-ubiquitination de la cargaison et les déchargements des autres ESCRT. (d) La constriction de la spirale ESCRT-III se poursuit jusqu'au clivage du septum membranaire séparant la membrane de la vésicule formée. (e) Vps4 intervient alors pour désassembler ESCRT-III en monomères, pour permettre son recyclage.

ont été impliquées dans le bourgeonnement de virus enveloppés, dont le HIV, au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées (Votteler & Sundquist, 2013). Une étude récente suggère par ailleurs qu'à la suite d'une lésion localisée de la membrane plasmique, l'action des ESCRT permet d'éliminer le domaine membranaire endommagé par extrusion dans l'espace extracellulaire (Jimenez *et al.*, 2014). Une activité quelque peu similaire assure l'extrusion de pores malformés de la membrane nucléaire (Webster *et al.*, 2014). La capacité des ESCRT à assurer la formation et la scission de constriction membranaires est par ailleurs exploitée aux étapes finales de la division cellulaire, quand le recrutement localisé de protéines ESCRT permet de réaliser l'abscission du pont cytoplasmique reliant les deux cellules filles (Carlton & Martin-Serrano, 2007).

L'incorporation de molécules ubiquitinylées dans les ILV des MVB requiert la participation de l'ensemble des sous-complexes de la machinerie ESCRT (figure 3). *A contrario*, la plupart des autres fonctions décrites ci-dessus n'impliquent qu'une partie de ses éléments constitutifs qui s'assemblent alors selon des mécanismes variables. À titre d'exemple, le bourgeonnement viral requiert les complexes ESCRT-I et -III sans participation de ESCRT-II (Votteler & Sundquist, 2013). Il est intéressant de noter que le complexe ESCRT-0, pourtant essentiel pour le transit de molécules ubiquitinylées dans le système endolysosomal, est absent chez les Archaeobactéries qui utilisent pourtant les ESCRT pour leur division cellulaire (Samson *et al.*, 2008). Cette observation suggère que l'implication des ESCRT dans la division cellulaire pourrait en fait représenter une fonction ancestrale,

non endosomale, de ces facteurs (Wideman *et al.*, 2014).

Le complexe ESCRT apparaît essentiellement comme une machinerie engagée dans différents processus concernant le remodelage de bicouches lipidiques. L'action des ESCRT s'étend cependant probablement au-delà de la biologie des membranes. Plusieurs études ont en effet impliqué ces facteurs dans des processus qui ne semblent pas dépendre de compartiments membranaires, telles que la duplication des centrosomes (Morita *et al.*, 2010) ou le transport subcellulaire de molécules d'ARN (Irion & St Johnston, 2007).

Le complexe ESCRT a été initialement découvert chez la levure et largement étudié dans des systèmes *in vitro* de culture de cellules. D'excellentes revues sont disponibles pour plus de détails concernant l'étude de la mécanistique du complexe ESCRT (Raiborg & Stenmark, 2009; Hurley & Hanson, 2010; Henne *et al.*, 2011; Votteler & Sundquist, 2013; Mierzwa & Gerlich, 2014). Dans ce qui suit nous nous focaliserons sur l'étude de la fonction de ces facteurs à l'échelle plus large du développement et de la physiologie d'organismes multicellulaires. Nous illustrerons plus particulièrement le rôle essentiel des ESCRT dans trois fonctions biologiques : la régulation endosomale de la signalisation cellulaire, l'autophagie et la morphogénèse neuronale, et enfin la biogénèse et la fonction de vésicules extracellulaires.

Complexe ESCRT, transport endosomal et signalisation cellulaire

Signalisation par des récepteurs tyrosine kinase : le cas d'école

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont des molécules transmembranaires qui sont activées par des ligands extracellulaires. La liaison au ligand induit une dimérisation qui permet alors à chaque monomère du récepteur de phosphoryler un résidu tyrosine présent sur son partenaire de dimérisation. Ces résidus phospho-tyrosinés permettent alors la liaison et l'activation d'effecteurs cytoplasmiques qui sont à l'origine d'une transduction de signal par le biais de la voie des *Mitogen Associated Protein Kinases* (MAPK). Parmi les RTK les plus étudiés figure le récepteur à l'EGF (EGFR), dont des mutations activatrices sont à l'origine de nombreux cancers.

C'est l'étude de l'internalisation de l'EGFR qui a permis de révéler pour la première fois que les endosomes étaient importants non seulement pour la dégradation de récepteurs activés, mais qu'ils pouvaient également favoriser la transduction de certains signaux (Vieira *et al.*, 1996). Alors qu'il est établi que le complexe ESCRT est requis pour l'incorporation de l'EGFR dans des ILV et pour sa dégradation,

une étude récente a cependant montré que l'inactivation de protéines ESCRT n'a que peu d'effet sur la réponse transcriptionnelle à l'EGF (Raiborg *et al.*, 2008; Brankatschk *et al.*, 2012). Ces observations soulèvent la question de l'importance du complexe ESCRT pour la régulation de la signalisation RTK *in vivo*.

Une première réponse à cette question a été apportée par l'étude de l'effet d'une mutation du gène ESCRT-0 *hrs* sur l'activité de deux voies de signalisation RTK (Torso et EGFR) impliquées dans la régionalisation précoce de l'embryon de drosophile (Lloyd *et al.*, 2002). Comme attendu, l'inactivation de Hrs perturbe la biogénèse des MVB et la dégradation des récepteurs. L'accumulation de récepteurs qui en résulte provoque une suractivation de la signalisation qui se manifeste aussi bien au niveau de l'activation de la voie MAPK (détectable par des anticorps reconnaissant spécifiquement les formes activées, phosphorylées, des protéines) qu'au niveau de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles. De manière analogue, Hrs et la protéine ESCRT-I Vps28 inhibent la signalisation EGFR au cours du développement de la vulve chez le nématode *Cænorhabditis elegans* (Skorobogata & Rocheleau, 2012).

Alors que ces études suggèrent un rôle prédominant du complexe ESCRT dans l'inactivation et la dégradation des RTK, il semblerait cependant que ces conclusions soient à nuancer en fonction du contexte biologique. Une autre étude chez la drosophile suggère ainsi que Hrs et une protéine accessoire du complexe ESCRT, Myopic, sont nécessaires pour activer la signalisation EGFR au cours du développement de l'œil (Miura *et al.*, 2008). Hrs et Myopic pourraient être requis pour le transport de l'EGFR vers les endosomes tardifs, compartiment cellulaire sur lequel se trouvent Mp1 et p14, deux facteurs exigés pour un niveau d'activation maximal de la voie EGFR/MAPK.

Au vu des multiples fonctions cellulaires des protéines ESCRT, il n'est guère étonnant que l'inactivation complète de ces facteurs chez la souris ait généralement donné naissance à des phénotypes de létalité précoce difficilement interprétables en termes de signalisation cellulaire (Komada & Soriano, 1999; Ruland *et al.*, 2001; Shim *et al.*, 2006; Handschuh *et al.*, 2014). L'étude récente d'une mutation hypomorphe de Vps25 a cependant révélé un rôle essentiel de cette protéine dans la régulation négative de la signalisation RTK par la voie des facteurs de croissance fibroblastiques au cours du développement des membres de la souris (Handschuh *et al.*, 2014). À l'instar de ce qui a été observé chez d'autres organismes, ce phénotype résulte d'une accumulation excessive de récepteurs par suite des défauts de dégradation endolysosomale.

Le scénario complexe de la signalisation Notch

Les travaux cités ci-dessus corroborent largement un rôle des ESCRT dans l'inhibition de la signalisation RTK. La situation est nettement plus complexe pour la signalisation Delta/Notch. Dans le contexte de cette voie d'importance majeure pour le développement embryonnaire et le maintien de cellules souches adultes, des ligands transmembranaires de la famille Delta/Serrate/Lag2 (DSL) interagissent avec leurs récepteurs Notch présents sur la membrane de cellules adjacentes. L'interaction ligand/récepteur initie alors une série de clivages protéolytiques qui conduisent, en dernier lieu, à une libération du domaine intracellulaire de Notch qui entre alors dans le noyau pour s'associer avec des co-facteurs transcriptionnels et réguler l'expression de gènes cibles.

Une particularité intéressante de la voie Notch réside dans le fait que son activation est étroitement liée au transport endo-lysosomal. Depuis bientôt deux décennies, il est fermement établi que l'endocytose de ligands DSL est absolument essentielle pour l'activation de Notch, même si la raison cellulaire précise de cette exigence reste toujours ambiguë (Fürthauer & González-Gaitán, 2009). Des travaux récents ont par ailleurs montré que des mutations perturbant les endosomes précoces inhibent l'activation de Notch (Vaccari *et al.*, 2008) et que la ségrégation asymétrique d'une sous-population endosomale contenant Delta et Notch est corrélée à une activation localisée de la signalisation au cours de divisions cellulaires asymétriques (Coumailleau *et al.*, 2009).

Des études chez la drosophile ont montré que plusieurs protéines des complexes ESCRT-I, -II et -III agissent comme suppresseurs de tumeurs et que leur inactivation cause à la fois une sur-prolifération tumorale et une perte de la polarité épithéliale (Moberg *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005; Vaccari & Bilder, 2005). Alors que la raison de cette perte de polarité reste incomprise, le phénotype de sur-prolifération résulte d'une activation ectopique de la signalisation Notch qui stimule à son tour l'activité mitogénique de la voie JAK/STAT en induisant la surexpression du facteur de croissance *Unpaired* (Vaccari & Bilder, 2005). En accord avec un rôle des protéines ESCRT dans la dégradation de Notch, l'inactivation de ces facteurs conduit à une accumulation excessive du récepteur à la surface des endosomes (Vaccari *et al.*, 2008; Tognon *et al.*, 2014). Une étude récente chez le poisson zèbre suggère par ailleurs que chez les vertébrés comme chez la drosophile, la protéine ESCRT-I Tsg101 est requise pour assurer un contrôle négatif de la voie Notch (Leitch *et al.*, 2014).

Il est cependant important de noter que l'hyperactivation de la voie Notch observée chez des mutants ESCRT-I, -II et -III de drosophile est toujours

indépendante du ligand Delta. Ceci suggère que cette suractivation observée chez les mutants reflète non pas une exacerbation du niveau de signalisation physiologique, mais plutôt une activation anormale de Notch résultant directement d'un défaut de progression du récepteur à travers les MVB défectifs. L'observation récente montrant que des animaux dépourvus de l'ensemble des composants du complexe ESCRT-0 présentent un niveau d'activation de la voie Notch parfaitement normal semble en effet confirmer l'hypothèse selon laquelle l'action des protéines ESCRT n'est pas en soi requise pour l'activation de la voie Notch (Tognon *et al.*, 2014).

Le mécanisme d'activation canonique de Notch implique une interaction avec son ligand Delta qui initie une série de clivages protéolytiques activant le récepteur. Des études chez la drosophile suggèrent cependant l'existence d'un mécanisme alternatif qui impliquerait une activation ligand-indépendante du récepteur au niveau des endosomes tardifs (Hori *et al.*, 2004). Dans ce contexte, les clivages activateurs pourraient être initiés non pas par le ligand, mais par la digestion de la partie extracellulaire (et donc intra-endosomale) du récepteur par les enzymes de dégradation des lysosomes (Wilkin *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter qu'ESCRT-III et en particulier la protéine Shrub/SNF7 ont été directement impliqués dans la régulation de cette signalisation non canonique. Alors que l'action de l'ubiquitine-ligase Deltex favoriserait la rétention et l'activation de Notch à la membrane limitante de l'endosome tardif, Shrub/SNF7 antagoniserait cette activité en favorisant l'incorporation du récepteur dans des ILV qui seront dégradées sans déclencher de signal (Hori *et al.*, 2011). Shrub a par ailleurs été identifié comme un partenaire moléculaire d'interaction direct de *Lethal giant discs*, une protéine dont la perte de fonction exacerbe la signalisation Notch au niveau des endosomes tardifs (Troost *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2013). Des études futures permettront d'établir le mécanisme cellulaire et la signification biologique de cette branche alternative de la voie Notch.

Signalisation Wnt : activation de la signalisation par la formation d'ILV

Depuis la découverte initiale du complexe ESCRT, la formation des ILV des MVB a avant tout été considérée comme une étape dans l'inactivation et la *dégradation* de molécules de signalisation. Il est donc tout à fait intéressant de noter que des travaux sur l'axogénèse précoce de l'embryon de Xénope ont identifié un rôle essentiel des ILV dans l'*activation* de la signalisation Wnt (Taelman *et al.*, 2010).

Dans le contexte de cette voie de signalisation, un complexe de destruction multi-protéique assure la

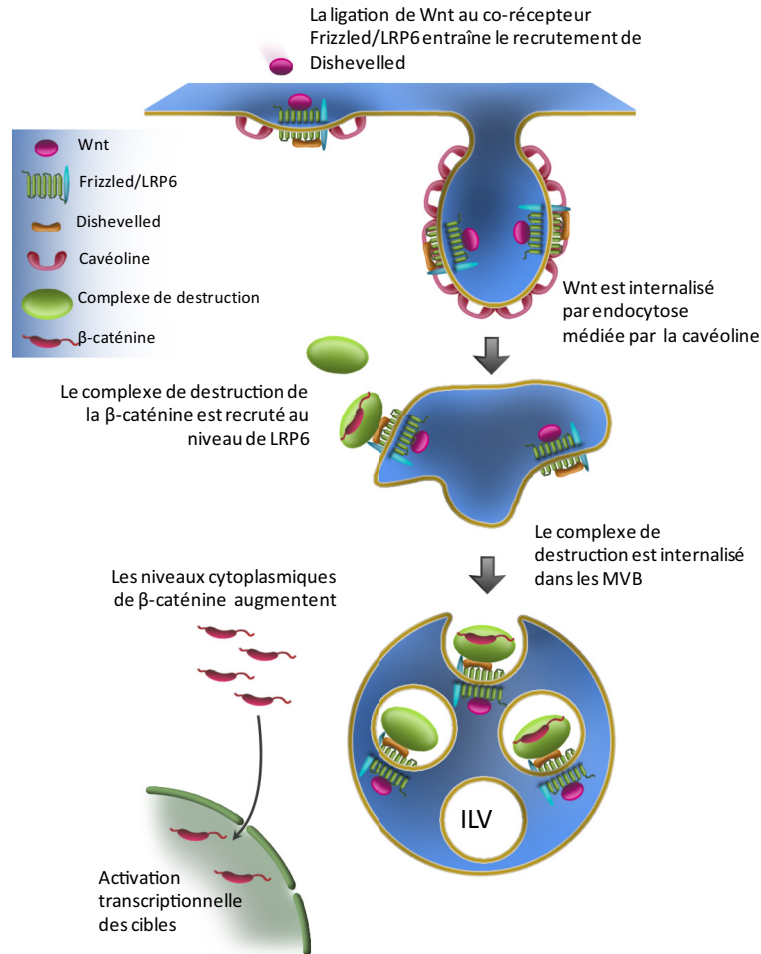


Fig. 4. L'activation de la signalisation Wnt nécessite la formation de vésicules intra-luminales. La fixation du ligand Wnt sur son co-récepteur Frizzled/LRP6 entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice Dishevelled, évènement nécessaire à une endocytose du complexe, médiée par la cavéoline. Le récepteur internalisé fixe alors le complexe de dégradation cytoplasmique de la β -caténine. En dirigeant l'internalisation et donc l'isolement du complexe de destruction dans des vésicules intra-luminales, le complexe ESCRT empêche la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine. Cette dernière peut alors entrer dans le noyau pour initier la transduction transcriptionnelle du signal.

phosphorylation et la dégradation de la β -caténine cytoplasmique en absence du ligand (figure 4). L'activation du récepteur par son ligand inactive le complexe de destruction ce qui permet à la β -caténine d'être stabilisée et d'entrer dans le noyau pour permettre l'activation transcriptionnelle de gènes cibles. Des études de la régulation endosomale de la signalisation Wnt ont montré que la liaison d'un ligand Wnt à son récepteur Frizzled (Frz) et son co-récepteur *Low-density Lipoprotein Receptor-related 6* (LRP6) provoque l'endocytose du complexe ligand/récepteur dans des structures cavéolaires, un type d'invagination endocytique indépendant de la clathrine (figure 4). L'internalisation de Wnt/Frz/LRP6 permet ensuite de recruter le complexe de destruction à la surface cytoplasmique de l'endosome. En permettant l'incorporation

de l'ensemble Wnt/Frz/LRP6/complexe de destruction dans les ILV, les protéines ESCRT Hrs et Vps4 séparent physiquement le complexe de destruction de la β -caténine cytoplasmique et permettent à celle-ci d'assurer la transduction du signal (figure 4) (Taelman *et al.*, 2010).

En assurant l'inactivation d'un inhibiteur de la transduction du signal, la biogénèse ESCRT-dépendante des ILV induit donc l'activation la voie Wnt. Il est intéressant de noter que ce concept pourrait s'appliquer plus généralement au contrôle de voies de signalisation dont l'activation passe par l'inactivation d'un inhibiteur. En accord avec cette hypothèse, les protéines ESCRT Hrs et Myopic assurent la dégradation endosomale de l'inhibiteur Cactus pour permettre l'activation de la voie Toll au cours de la

réponse immunitaire de la drosophile (Huang *et al.*, 2010).

De manière générale, le rôle de la machinerie ESCRT dans le transport endosomal de molécules de signalisation apparaît comme la fonction qui a été la plus largement conservée à travers l'évolution chez la levure, les animaux ainsi que les plantes. Chez ces dernières, l'analyse du génome a révélé une absence des composants canoniques ESCRT-0, mais leur fonction est suppléée par des protéines alternatives (Korbei *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014). Comme chez la levure et les animaux, la machinerie ESCRT intervient dans la régulation endosomale de la signalisation cellulaire, notamment en contrôlant l'activité des transporteurs de l'auxine, la principale hormone gouvernant la morphogénèse végétale (Spitzer *et al.*, 2009; Korbei *et al.*, 2013).

Les protéines ESCRT dans l'autophagie et la morphogénèse neuronale

Au-delà de leur implication dans la biogénèse endosomale, l'analyse des protéines ESCRT chez des organismes multicellulaires a révélé un rôle majeur de ces facteurs dans le contrôle d'un autre type de compartiments vésiculaires, les autophagosomes. Le terme autophagie désigne un ensemble de processus par lesquels une cellule assure une dégradation lysosomale de ses composants cytoplasmiques, ceux-ci pouvant inclure aussi bien des molécules individuelles que des organites entiers. Le rôle des protéines ESCRT a été essentiellement étudié dans le contexte de la voie d'autophagie principale, la macro-autophagie (Michelet & Legouis, 2012). Ce processus commence par la formation d'un compartiment vésiculaire d'abord ouvert, le phagophore, qui encercle progressivement une région du cytoplasme et les organites qu'elle contient (figure 1). Ce processus conduit à terme à l'obtention d'une vésicule fermée, l'autophagosome, qui fusionnera avec un lysosome (soit directement, soit en fusionnant d'abord avec un intermédiaire endosomal) pour permettre la dégradation de son contenu (figure 1).

Alors qu'un niveau basal d'autophagie est présent dans toutes les cellules pour permettre le recyclage de composants cellulaires, cette voie peut être fortement stimulée dans certaines conditions physiologiques. À titre d'exemple, la récupération autophagique de matériel améliore la capacité des cellules à affronter des situations de carence nutritionnelle. L'étude de pathologies neurodégénératives suggère par ailleurs que l'autophagie améliore la survie des cellules en assurant la dégradation d'agrégats de protéines neurotoxiques (Ravikumar *et al.*, 2004).

Des travaux chez la souris ont révélé que la protéine ESCRT-III SNF7 altère la morphogénèse

des dendrites neuronales avant de causer la mort des cellules (Lee *et al.*, 2007). L'analyse cellulaire de ces mutants a révélé que ces phénotypes présentent une accumulation excessive d'autophagosomes. Un phénotype similaire est par ailleurs causé par la surexpression d'une forme mutante de la protéine ESCRT-III CHMP2B, un partenaire d'interaction direct de SNF7 dont l'altération est à l'origine d'une démence fronto-temporale (Lee *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent qu'un dérèglement ESCRT-dépendant de l'autophagie pourrait jouer un rôle important dans des processus pathologiques. En accord avec cette hypothèse, l'inactivation de l'ubiquitine-ligase Atrogin-1 chez la souris conduit à une accumulation excessive de CHMP2B qui perturbe l'autophagie et cause la mort des cardiomyocytes (Zaglia *et al.*, 2014).

Une accumulation excessive d'autophagosomes est également observée chez des mutants de perte de fonction ESCRT chez la drosophile et le nématode (Rusten *et al.*, 2007; Djeddi *et al.*, 2012). Comment l'inactivation de protéines ESCRT conduit-elle à l'accumulation d'autophagosomes? D'une part, l'inactivation de gènes ESCRT pourrait inhiber la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. D'autre part, une perte de fonction ESCRT pourrait causer une stimulation générale de l'autophagie, c'est-à-dire augmenter le flux autophagique global. La réponse semble dépendre du contexte biologique. Chez la mouche et l'Homme, la réduction du nombre de compartiments cellulaires contenant à la fois des protéines autophagiques et lysosomales suggère que l'inactivation des ESCRT inhibe le processus de fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Lee *et al.*, 2007; Rusten *et al.*, 2007). En accord avec une telle hypothèse, une étude récente a mis en évidence des interactions génétiques entre CHMP2B et plusieurs composants de la machinerie de fusion vésiculaire (Lu *et al.*, 2013). La situation semble cependant différente chez le nématode, où l'inactivation de protéines ESCRT augmente le flux autophagique sans interférer avec les événements de fusion (Djeddi *et al.*, 2012).

Une deuxième question est de savoir si l'accumulation excessive d'autophagosomes est elle-même la cause du caractère dommageable des mutations ESCRT ou si, *a contrario*, les cellules activent la voie autophagique pour se protéger des conséquences de la perte des ESCRT? Une fois de plus, la situation ne semble pas être la même chez différents organismes. Alors que chez la souris une inhibition de l'autophagie permet de diminuer la neurotoxicité résultant de la perte de protéines ESCRT (Lee & Gao, 2009), elle aggrave la létalité associée avec la perte des ESCRT chez le nématode (Djeddi *et al.*, 2012).

L'implication des protéines ESCRT dans la formation du système nerveux ne se limite cependant pas à la régulation de l'autophagie. Chez la drosophile,

les ESCRT interviennent également dans le remodelage du système nerveux au cours de la métamorphose. Dans ce contexte, ils régulent le transport endosomal et l'activité de molécules gouvernant l'élagage neuronal (Issman-Zecharya & Schuldiner, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Au niveau des synapses, la fonction endosomale des ESCRT a été impliquée dans la régulation de la croissance synaptique par des facteurs de croissance (Rodal *et al.*, 2011) et l'élimination de protéines usagées des vésicules synaptiques (Uytterhoeven *et al.*, 2011). Chez l'Homme, la perte de la protéine ESCRT CHMP1A provoque par ailleurs une réduction du cerveau et du cortex cérébral, qui reflète une activité nucléaire (et indépendante des autres protéines ESCRT) de cette protéine dans la régulation de la prolifération cellulaire (Mochida *et al.*, 2012).

Protéines ESCRT et sécrétion exovésiculaire de Hedgehog

Alors qu'il est établi depuis longtemps qu'un large éventail de vésicules est présent dans l'espace extracellulaire et plus particulièrement dans la lumière de différents organes épithéliaux, les mécanismes de sécrétion et les éventuelles fonctions biologiques de ces entités restent largement méconnus. Des travaux récents suggèrent cependant que ces exovésicules pourraient jouer des rôles importants dans la communication et la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire, la coagulation, ou la progression tumorale (Colombo *et al.*, 2014).

De manière intéressante, il a été établi que nombre de protéines ESCRT peuvent contribuer à la production d'exovésicules par deux mécanismes différents : premièrement, en gouvernant la biogénèse des MVB qui peuvent, dans certaines conditions, fusionner avec la membrane plasmique et sécréter ainsi leurs vésicules internes, appelées alors exosomes (figure 1) (Baietti *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013). De manière alternative, certains ESCRT peuvent promouvoir le bourgeonnement de vésicules directement à partir de la membrane plasmique (Nabhan *et al.*, 2012), un processus comparable à leur implication dans le bourgeonnement viral (Votteler & Sundquist, 2013). De manière particulièrement intéressante, des travaux récents ont montré que l'inactivation de gènes ESCRT permet d'interférer avec la production d'exovésicules et d'apporter ainsi des informations quant à la fonction physiologique de ces organites extracellulaires.

Alors que certains facteurs de croissance sont sécrétés librement dans le milieu extracellulaire, des ligands tels que Hedgehog (Hh) et Wingless (Wg, homologue chez la drosophile des protéines Wnt) sont sujets à des modifications lipidiques qui favorisent leur association avec des membranes mais

les rendent hautement hydrophobes. Ces propriétés physico-chimiques soulèvent la question : comment de telles molécules peuvent-elles être sécrétées et transportées dans un milieu extracellulaire hydrophile ?

Une étude récente a révélé pour la première fois que des protéines ESCRT sont responsables de la formation d'exovésicules assurant la sécrétion de Hh au cours du développement de l'aile de la mouche drosophile (Matusek *et al.*, 2014). Dans ce tissu, Hh agit comme morphogène capable d'induire des gènes cibles différents en fonction de la distance entre les cellules qui sécrètent Hh et celles qui le reçoivent. L'inactivation de protéines ESCRT interfère spécifiquement avec la signalisation à longue distance. Alors que dans des conditions normales des exovésicules contenant Hh et les protéines ESCRT CHMP1 et Shrub sont détectées dans l'espace extracellulaire, l'inhibition du complexe ESCRT entraîne une rétention de Hh à la face externe de la membrane plasmique des cellules productrices. Cette observation suggère que les protéines ESCRT gouvernent la sécrétion de Hh par des exovésicules qui se forment par un processus de bourgeonnement de la membrane plasmique.

Dans le contexte du développement de l'aile de la drosophile, les protéines ESCRT interviennent non seulement dans la sécrétion du ligand mais assurent également l'inactivation du récepteur Smoothened lorsque celui-ci n'est pas stimulé (Yang *et al.*, 2013). Ceci montre que par leurs multiples fonctions cellulaires les protéines ESCRT peuvent intervenir à plusieurs niveaux au sein d'une même voie de signalisation, un aspect qu'il est important de garder en vue lors de l'interprétation de phénotypes observés.

Il sera intéressant de déterminer si l'implication de protéines ESCRT dans la production d'exovésicules transportant des molécules de signalisation pourra être étendue à d'autres contextes biologiques et d'autres facteurs de croissance. Deux études ont en effet montré que des cellules de drosophile en culture sécrètent des exosomes qui proviennent du système endosomal et contiennent des ligands Wg. Les auteurs arrivent cependant à des conclusions opposées concernant l'importance de ces exosomes pour la signalisation Wg *in vivo* (Gross *et al.*, 2012; Beckett *et al.*, 2013). Par ailleurs il faut noter que l'étude des exosomes ne reflètera pas nécessairement le rôle des protéines ESCRT : en effet il existe également un mécanisme de biogénèse exosomale ESCRT-indépendant impliquant le métabolisme des sphingolipides (Trajkovic *et al.*, 2008).

Comme le transport endosomal, la biogénèse des exovésicules doit être étroitement contrôlée. Une étude chez le nématode *Cænorhabditis elegans* a révélé que TAT-5, une protéine impliquée dans le maintien de la distribution asymétrique des lipides entre les couches externes et internes de la membrane plasmique, est

un régulateur négatif de la production d'exovésicules. L'absence de TAT-5 conduit à un bourgeonnement massif de vésicules à partir de la membrane plasmique qui, étonnamment, requiert l'activité des complexes ESCRT-0/I mais n'implique pas ESCRT-II/III. Cette sécrétion massive de vésicules induit des problèmes majeurs au niveau de l'adhérence et de la morphogénèse des cellules embryonnaires (Wehman *et al.*, 2011).

Questions actuelles et défis futurs

Dans cette revue nous avons cherché à décrire trois rôles de la machinerie ESCRT qui ont émergé de son étude *in vivo* au sein d'organismes multicellulaires : la régulation de la signalisation cellulaire, le contrôle de l'autophagie et la morphogénèse neuronale, et enfin la biologie des exovésicules. Au vu de la multiplicité de fonctions cellulaires des ESCRT, il est clair que cette description ne peut être exhaustive et qu'elle s'étoffera au cours des années à venir.

Alors que des études *in vitro* de reconstitution biochimique ou de culture cellulaire sont d'une valeur inestimable pour la dissection mécanistique de la machinerie ESCRT, il est impératif de les compléter par des analyses dans le contexte physiologique d'un organisme entier. Alors que des études *in vitro* ont révélé un rôle des ESCRT dans la régulation de la cytotinèse (Mierzwa & Gerlich, 2014), ce processus ne semble pas être perturbé par l'inactivation de ces facteurs chez la mouche ou la souris. À ce jour, seules deux études, une chez la plante *Arabidopsis thaliana* et une autre chez le ver nématode *Cænorhabditis elegans*, suggèrent que les ESCRT pourraient contribuer à la cytotinèse (Spitzer *et al.*, 2006 ; Green *et al.*, 2013). Ces observations suggèrent pour l'instant qu'en dépit d'un rôle essentiel des ESCRT dans le contrôle de la division de cellules en culture, cette fonction ne semble pas d'importance majeure dans la plupart des contextes physiologiques.

À l'inverse, l'étude de protéines ESCRT dans des organismes entiers a permis d'identifier des fonctions ESCRT totalement inattendues, telles que l'implication spécifique de protéines ESCRT-II dans la localisation subcellulaire de l'ARN de *bicoid*, le morphogène responsable de l'établissement de la polarité antéro-postérieure de l'embryon de drosophile (Irion & St Johnston, 2007).

Un des défis majeurs sera de comprendre la mécanistique cellulaire des fonctions des ESCRT qui ont émergé de leur étude dans un contexte multicellulaire. À titre d'exemple, alors qu'il est fermement établi que de nombreuses protéines ESCRT de drosophile agissent comme des suppresseurs de tumeurs néoplasiques dont l'inactivation perturbe la polarité

épithéliale, le mécanisme cellulaire qui est à l'origine de ces phénotypes reste à élucider. À l'évidence, l'étude de la fonction des protéines ESCRT dans le développement normal aussi bien que pathologique a encore de beaux jours devant elle.

Remerciements. T.J. bénéficie d'un financement de thèse octroyé par la région PACA et l'INSERM. Le travail dans le laboratoire de M.F. est financé par le programme ATIP/Avenir, le *Human Frontiers Science Program* (HFSP) et l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

Références

- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, 3, 271-282.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, 3, 283-289.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann P. and David G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, 14, 677-685.
- Beckett, K., Monier, S., Palmer, L., Alexandre, C., Green, H., Bonneil, E., Raposo, G., Thibault, P., Le Borgne, R., and Vincent, J.P. (2013). Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes. *Traffic*, 14, 82-96.
- Brankatschk, B., Wichert, S.P., Johnson, S.D., Schaad, O., Rossner, M.J., and Gruenberg, J. (2012). Regulation of the EGF transcriptional response by endocytic sorting. *Sci Signal*, 5, ra21.
- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*, 316, 1908-1912.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*, 126, 5553-5565.
- Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-289.
- Coumailleau, F., Fürthauer, M., Knoblich, J.A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature*, 458, 1051-1055.

- Djeddi, A., Michelet, X., Culetto, E., Alberti, A., Barois, N., and Legouis, R. (2012). Induction of autophagy in ESCRT mutants is an adaptive response for cell survival in *C. elegans*. *J Cell Sci*, 125, 685-694.
- Fürthauer, M., and González-Gaitán, M. (2009). Endocytic regulation of notch signalling during development. *Traffic*, 10, 792-802.
- Gao, C., Luo, M., Zhao, Q., Yang, R., Cui, Y., Zeng, Y., Xia, J., and Jiang, L. (2014). A Unique Plant ESCRT Component, FREE1, Regulates Multivesicular Body Protein Sorting and Plant Growth. *Curr Biol*, 24, 2556-2563.
- Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 11, 1143-1149.
- Green, R.A., Mayers, J.R., Wang, S., Lewellyn, L., Desai, A., Audhya, A., and Oegema, K. (2013). The midbody ring scaffolds the abscission machinery in the absence of midbody microtubules. *J Cell Biol*, 203, 505-520.
- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*, 14, 1036-1045.
- Handschuh, K., Feenstra, J., Koss, M., Ferretti, E., Risolino, M., Zewdu, R., Sahai, M.A., Benazet, J.D., Peng, X.P., Depew, M.J., Quintana L., Sharpe J., Wang B., Alcorn H., Rivi R., Butcher S., Manak J.R., Vaccari T., Weinstein H., Anderson K.V., Lacy E., and Selleri L. (2014). ESCRT-II/Vps25 Constrains Digit Number by Endosome-Mediated Selective Modulation of FGF-SHH Signaling. *Cell Rep*, 9, 674-687.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 21, 77-91.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Zhao, Y., and Emr, S.D. (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*, 151, 356-371.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T.J., Go, M.J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). *Drosophila* deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development*, 131, 5527-5537.
- Hori, K., Sen, A., Kirchhausen, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (2011). Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. *J Cell Biol*, 195, 1005-1015.
- Huang, H.R., Chen, Z.J., Kunes, S., Chang, G.D., and Maniatis, T. (2010). Endocytic pathway is required for *Drosophila* Toll innate immune signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 8322-8327.
- Hurley, J.H., and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 556-566.
- Irion, U., and St Johnston, D. (2007). bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*, 445, 554-558.
- Issman-Zecharya, N., and Schuldiner, O. (2014). The PI3K Class III Complex Promotes Axon Pruning by Downregulating a Ptc-Derived Signal via Endosome-Lysosomal Degradation. *Dev Cell*, 31, 461-473.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 343, 1247136.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106, 145-155.
- Komada, M., and Soriano, P. (1999). Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev*, 13, 1475-1485.
- Korbei, B., Moulinier-Anzola, J., De-Araujo, L., Lucyshyn, D., Retzer, K., Khan, M.A., and Luschnig, C. (2013). *Arabidopsis* TOL proteins act as gatekeepers for vacuolar sorting of PIN2 plasma membrane protein. *Curr Biol*, 23, 2500-2505.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science*, 321, 1354-1357.
- Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol*, 17, 1561-1567.
- Lee, J.A., and Gao, F.B. (2009). Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J Neurosci*, 29, 8506-8511.
- Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim do, H., Cho, I.S., Nakahara K., Preall J.B., Bellare P., Sontheimer E.J. and Carthew R.W. (2009). Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol*, 11, 1150-1156.
- Leitch, C.C., Lodh, S., Prieto-Echague, V., Badano, J.L., and Zaghoul, N.A. (2014). Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci*, 127, 2407-2419.
- Lloyd, T.E., Atkinson, R., Wu, M.N., Zhou, Y., Pennetta, G., and Bellen, H.J. (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*, 108, 261-269.
- Lu, Y., Zhang, Z., Sun, D., Sweeney, S.T., and Gao, F.B. (2013). Syntaxin 13, a genetic modifier of mutant CHMP2B in frontotemporal dementia, is required for autophagosome maturation. *Mol Cell*, 52, 264-271.
- Matusek, T., Wendler, F., Polès, S., Pizette, S., D'Angelo, G., Fürthauer, M., and Théron, P.P. (2014). The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature*, 516, 99-103.
- Michelet, X., and Legouis, R. (2012). Autophagy in endosomal mutants: Desperately seeking to survive. *Worm*, 1, 216-220.
- Mierzwa, B., and Gerlich, D.W. (2014). Cytokinetic Abscission: Molecular Mechanisms and Temporal Control. *Dev Cell*, 31, 525-538.

- Miura, G.I., Roignant, J.Y., Wassef, M., and Treisman, J.E. (2008). Myopic acts in the endocytic pathway to enhance signaling by the Drosophila EGF receptor. *Development*, 135, 1913-1922.
- Moberg, K.H., Schelble, S., Burdick, S.K., and Hariharan, I.K. (2005). Mutations in erupted, the Drosophila ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell*, 9, 699-710.
- Mochida, G.H., Ganesh, V.S., de Michelena, M.I., Dias, H., Atabay, K.D., Kathrein, K.L., Huang, H.T., Hill, R.S., Felie, J.M., Rakiec, D., Gleason D., Hill A.D., Malik A.N., Barry B.J., Partlow J.N., Tan W.H., Glader L.J., Barkovich A.J., Dobyns W.B., Zon L.I. and Walsh C.A. (2012). CHMP1A encodes an essential regulator of BMI1-INK4A in cerebellar development. *Nat Genet*, 44, 1260-1264.
- Morita, E., Colf, L.A., Karren, M.A., Sandrin, V., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 12889-12894.
- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N., and Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMS) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 4146-4151.
- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E., and Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 4, 394-398.
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458, 445-452.
- Raiborg, C., Malerod, L., Pedersen, N.M., and Stenmark, H. (2008). Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking. *Exp Cell Res*, 314, 801-813.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J. and Rubinsztein D.C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36, 585-595.
- Rodal, A.A., Blunk, A.D., Akbergenova, Y., Jorquera, R.A., Buhl, L.K., and Littleton, J.T. (2011). A presynaptic endosomal trafficking pathway controls synaptic growth signaling. *J Cell Biol*, 193, 201-217.
- Ruland, J., Sirard, C., Elia, A., MacPherson, D., Wakeham, A., Li, L., de la Pompa, J.L., Cohen, S.N., and Mak, T.W. (2001). p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 1859-1864.
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.P., Brech, A., Bilder, D., and Stenmark H. (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol*, 17, 1817-1825.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., and Bell, S.D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science*, 322, 1710-1713.
- Schneider, M., Troost, T., Grawe, F., Martinez-Arias, A., and Klein, T. (2013). Activation of Notch in Igd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome. *J Cell Sci*, 126, 645-656.
- Shim, J.H., Xiao, C., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Trombetta, E.S., Pypaert, M., Nara, A., Yoshimori, T., Wilm, B., Erdjument-Bromage, H. Tempst P, Hogan BL, Mellman I and Ghosh S. (2006). CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis. *J Cell Biol*, 172, 1045-1056.
- Skorobogata, O., and Rocheleau, C.E. (2012). RAB-7 antagonizes LET-23 EGFR signaling during vulva development in *Cænorhabditis elegans*. *PLoS One*, 7, e36489.
- Spitzer, C., Reyes, F.C., Buono, R., Sliwinski, M.K., Haas, T.J., and Otegui, M.S. (2009). The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in *Arabidopsis* and are required for plant development. *Plant Cell*, 21, 749-766.
- Spitzer, C., Schellmann, S., Sabovljevic, A., Shahriari, M., Keshavaiah, C., Bechtold, N., Herzog, M., Muller, S., Hanisch, F.G., and Hulskamp, M. (2006). The *Arabidopsis* elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development*, 133, 4679-4689.
- Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M., and De Palma, M. (2014). Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*, 8, 1432-1446.
- Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., and De Robertis, E.M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 143, 1136-1148.
- Thompson, B.J., Mathieu, J., Sung, H.H., Loeser, E., Rorth, P., and Cohen, S.M. (2005). Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in Drosophila. *Dev Cell*, 9, 711-720.
- Tognon, E., Wollscheid, N., Cortese, K., Tacchetti, C., and Vaccari, T. (2014). ESCRT-0 is not required for ectopic Notch activation and tumor suppression in Drosophila. *PLoS One*, 9, e93987.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319, 1244-1247.
- Troost, T., Jaekel, S., Ohlenhard, N., and Klein, T. (2012). The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4. *J Cell Sci*, 125, 763-776.

- Uytterhoeven, V., Kuenen, S., Kasprowicz, J., Miskiewicz, K., and Verstreken, P. (2011). Loss of skywalker reveals synaptic endosomes as sorting stations for synaptic vesicle proteins. *Cell*, 145, 117-132.
- Vaccari, T., and Bilder, D. (2005). The *Drosophila* tumor suppressor *vps25* prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell*, 9, 687-698.
- Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M.E., and Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, 180, 755-762.
- Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 274, 2086-2089.
- Votteler, J., and Sundquist, W.I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe*, 14, 232-241.
- Webster, B.M., Colombi, P., Jäger, J., and Lusk, C.P. (2014). Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell*, 159, 388-401.
- Wehman, A.M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B.D., and Nance, J. (2011). The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr Biol*, 21, 1951-1959.
- Wideman, J.G., Leung, K.F., Field, M.C., and Dacks, J.B. (2014). The cell biology of the endocytic system from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016998.
- Wilkin, M., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K. and Baron M. (2008). *Drosophila* HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of notch in the endosomal trafficking pathway. *Dev Cell*, 15, 762-772.
- Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464, 864-869.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458, 172-177.
- Yang, X., Mao, F., Lv, X., Zhang, Z., Fu, L., Lu, Y., Wu, W., Zhou, Z., Zhang, L., and Zhao, Y. (2013). *Drosophila* Vps36 regulates Smo trafficking in Hedgehog signaling. *J Cell Sci*, 126, 4230-4238.
- Zaglia, T., Milan, G., Ruhs, A., Franzoso, M., Bertaglia, E., Pianca, N., Carpi, A., Carullo, P., Pesce, P., Sacerdoti, D., Sarais, C., Catalucci, D., Krüger, M., Mongillo, M., and Sandri, M. (2014). Atrogin-1 deficiency promotes cardiomyopathy and premature death via impaired autophagy. *J Clin Invest*, 124, 2410-2424.
- Zhang, H., Wang, Y., Wong, J.J., Lim, K.L., Liou, Y.C., Wang, H., and Yu, F. (2014). Endocytic pathways downregulate the L1-type cell adhesion molecule neuropilin to promote dendrite pruning in *Drosophila*. *Dev Cell*, 30, 463-478.

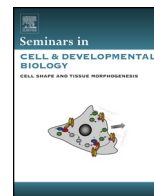
Annexe 2 : Revue « Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles»



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb



Review

Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles

Thomas Juan, Maximilian Fürthauer*

Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2017
Received in revised form 4 August 2017
Accepted 7 August 2017
Available online xxx

Keywords:

ESCRT
Exosome
Ectosome
Extracellular vesicle
Multivesicular endosome

ABSTRACT

From bacteria to humans, cells secrete a large variety of membrane-bound extracellular vesicles. Only relatively recently has it however started to become clear that the exovesicular transport of proteins and RNAs is important for normal physiology and numerous pathological conditions. Extracellular vesicles can be formed through the release of the intraluminal vesicles of multivesicular endosomes as so-called exosomes, or through direct, ectosomal, budding from the cell surface. Through their ability to promote the bending of membranes away from the cytoplasm, the components of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) have been implicated in both *exo*- and ectosomal biogenesis. Studies of the ESCRT machinery may therefore provide important insights into the formation and function of extracellular vesicles. In the present review, we first describe the cell biological mechanisms through which ESCRT components contribute to the biogenesis of different types of extracellular vesicles. We then discuss how recent functional studies have started to uncover important roles of ESCRT-dependent extracellular vesicles in a wide variety of processes, including the transport of developmental signaling molecules and embryonic morphogenesis, the regulation of social behavior and host-pathogen interactions, as well as the etiology and progression of neurodegenerative pathologies and cancer.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
1.1. Extracellular vesicles in a nutshell	00
2. Biogenesis of ESCRT-dependent extracellular vesicles	00
2.1. ESCRT function in exosome biogenesis	00
2.1.1. The Alix/Syntenin/Syndecan pathway of exosomal biogenesis.....	00
2.1.2. ESCRTs and exosomal cargo loading	00
2.1.3. ESCRT-independent exosome biogenesis	00
2.2. ESCRT proteins in ectosome formation	00
2.3. Additional modes of ESCRT-dependent secretion	00
3. ESCRT-positive extracellular vesicles in cell communication.....	00
3.1. Exovesicular transport of developmental signaling molecules.....	00
3.1.1. Exovesicular transport of Wingless	00
3.1.2. Hedgehog secretion and transport	00
3.1.3. Eph/Ephrin signaling	00
3.2. Extracellular vesicles in morphogenesis.....	00

Abbreviations: A β , amyloid- β protein; Acb1, acyl CoA binding protein1; ALIX, ALG-2 interacting protein X; APP, amyloid precursor protein; ARDDC1, ARRestin domain-containing protein 1; COPI/II, coat protein complex I/II; CUPS, compartment for unconventional protein secretion; ER, endoplasmic reticulum; ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; EV, extracellular vesicle; Hh, hedgehog; HIV, human immunodeficiency virus; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; ILV, intraluminal vesicle; IL-1 β , Interleukin-1 β ; ISG15, interferon-stimulated gene 15; LF, anthrax lethal factor; MHCII, classII major histocompatibility complex; MVE, multivesicular endosome; NMJ, neuro-muscular junction; nSMase, neutral sphingomyelinase; PA, anthrax protective antigen; PE, phosphatidylethanolamine; PMEL, PreMELanosome protein; Shh, sonic hedgehog; SIMPLE, small integral membrane protein of the lysosome/late endosome; SNARE, soluble Nsf attachment protein (SNAP) receptor; SUMO, small ubiquitin-like modifier; TCR, T-cell receptor; Tsg101, tumor susceptibility gene 101; Wg, wingless.

* Corresponding author.

E-mail address: furthauer@unice.fr (M. Fürthauer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.022>
1084-9521/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: T. Juan, M. Fürthauer, Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles, Semin Cell Dev Biol (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.022>

3.3.	Inter-organismal communication by extracellular vesicles	00
4.	ESCRT-dependent extracellular vesicles and disease	00
4.1.	Exovesicular transport of viral proteins	00
4.2.	ESCRT-dependent extracellular vesicles and cancer.....	00
4.3.	ESCRTs, extracellular vesicles and neurodegenerative diseases.....	00
4.4.	ESCRT-dependent extracellular vesicles in immune responses and host-pathogen interactions	00
5.	Extracellular vesicles and beyond	00
	Acknowledgements.....	00
	References	00

1. Introduction

Since the discoveries of Christian de Duve, Albert Claude and Georges Palade which shared the 1974 Nobel Prize “for their discoveries concerning the structural and functional organization of the cell”, a major objective of cell biology has been to understand the importance of intracellular vesicular compartments for the organization and function of eucaryotic cells. In contrast, the existence of membrane-bound entities in the extracellular space and various body fluids has long been recognized, but the biology of Extracellular Vesicles (EV) has been largely ignored. Only recently has it emerged that the exovesicular transport of proteins and coding or non-coding RNAs is of importance for organismal development and function throughout evolution, as well as being implicated in a number of human pathologies [1–8].

The assembly of endocytic clathrin scaffolds at the plasma membrane or COPI/II coats at the Endoplasmic Reticulum (ER)/Golgi allows to release intracellular vesicles into the cytoplasmic space. In contrast, EV formation requires the – topologically opposite – budding of cellular membranes away from the cytoplasm. The discovery of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) provided a cellular mechanism for this process [9,10]. ESCRT components promote the budding and release of Intraluminal Vesicles (ILV) into the endosome lumen, promoting therefore the biogenesis of MultiVesicular Endosomes (MVEs) [11,12] (see also paper by Frankel and Audhya in the present issue). As the MVE lumen corresponds to the extracellular milieu, ILV biogenesis is topologically equivalent to EV release. The biological significance of this geometrical analogy was further underscored by the discovery that numerous enveloped viruses, including HIV, highjack ESCRT components to promote viral budding from the cell surface [13].

These findings raised the question whether ESCRTs might also be relevant for physiological EV release? Pioneering studies performed in the 1980s had indeed revealed that in the context of erythropoiesis, the maturation of reticulocytes into functional red blood cells involves fusion of MVEs with the plasma membrane, which leads to the extracellular secretion of their ILVs as so-called exosomes [14–16]. As subsequent studies not only identified MVEs as a major site of ESCRT activity, but also showed that selected ESCRT proteins are incorporated into exosomes [17], it became apparent that the study of ESCRT proteins may be key to the understanding of EV biology. In this review we discuss the importance of the ESCRT machinery for the biogenesis and function of extracellular vesicles.

1.1. Extracellular vesicles in a nutshell

In the following, we use the generic term Extracellular Vesicle (EV) to designate any particle that is delimited by a lipid bilayer and released into the extracellular space. EV are generally separated into two categories with respect to their mode of formation. The name “exosomes” designates EVs of endo-lysosomal origin that are released upon fusion of MVEs with the plasma membrane [15]. In contrast, different terms (ectosomes, microvesicles, shedding

vesicles. . .) are used to designate EVs that form through cell surface budding. We will use the term “ectosome” to specifically designate this second class of EVs, as we feel that it most appropriately reflects their common mode of biogenesis.

Distinct EV populations can be released by different cell populations [18,19], or even by a single cell type [20–23]. The search for methods to identify, isolate and manipulate different EVs is however still in its infancy. EV size has been one of the most widely used criteria for vesicle classification, with small (<150 nm) vesicles being assimilated to exosomes, while ectosomes would be larger (100 to >1000 nm) [2,22]. The overlap between these size ranges, as well as the observation that bacteria, which lack endosomal organelles, release EVs in the 30–150 nm size range, however clearly indicate the limitation of this classification [24].

A recent benchmark study of EV proteomics further revealed that the small vesicle fraction harbors both exo- and ectosomes [22]. The authors propose that exosomes are small EVs that are additionally characterized by the presence of the Tetraspanins CD9, CD63 and CD81, the ESCRT protein Tsg101, as well as Syntenin, a protein that has been implicated in Alix-dependent exosome biogenesis [25]. In contrast, a number of factors such as class II Major Histocompatibility Complex (MHCII), flotillin or heat-shock 70 kD proteins which have been previously used as exosomal markers, were not found to be preferentially enriched in any particular type of EV [22]. Based on their work in human dendritic cells, the authors suggest combining EV size fractionation with CD63 immuno-isolation for exosome isolation. A number of findings indicate however that it will be essential to adapt the chosen methods to the biological context: Zebrafish CD63 is only expressed and required in the cells of the hatching gland [26], and therefore unlikely to represent a general exosomal marker. In *Drosophila*, heterologous expression of CD63-GFP has been used to label exosomes [27,28], but the fly genome actually harbors no CD63 homologue. The situation is further complicated by the fact that CD63 has also been shown to be released through the budding of EV from endosome-like membrane domains from the surface of human T-cells [29]. While markers for exosomes are starting to emerge, the situation remains even more problematic for ectosomes and larger EVs [22].

ESCRT proteins are implicated in exosomal and ectosomal biogenesis [25,30]. This highlights the particular interest of ESCRTs for EV biology, but also pinpoints a major challenge of EV research, namely the difficulty to manipulate specific extracellular carriers. This conundrum applies to all factors implicated in EV biogenesis, but it is particularly obvious for the ESCRT machinery with its wide variety of cellular functions [9,10,31]. At the present date, there is simply no reagent that unambiguously allows to selectively interfere with EV biogenesis independently of other cellular processes [1].

Exosomes were initially discovered in maturing reticulocytes, where their release ensures the extracellular disposal of transferrin receptors to terminate iron import and prevent iron-mediated toxicity [14–16]. Of particular interest, subsequent

studies revealed that MHCII-containing exosomes secreted by antigen-presenting cells elicited T-cell responses, establishing therefore a function of these EVs in cell-to-cell communication [32]. Since these initial discoveries, exosomal and ectosomal EVs have been implicated in numerous processes including the transport of developmental signaling molecules, embryonic morphogenesis, the clearance and/or propagation of neurotoxic protein aggregates, social behavior and host-pathogen interactions [3,4,6–8]. Cancer research has implicated EV-mediated signaling in tumor-stroma and tumor-immune cell interactions and suggested that EV could be of both diagnostic and therapeutic value [1,5].

In the following, we describe specifically the formation and proposed functions of ESCRT-dependent EVs. We first review data implicating ESCRT components in different aspects of exo- and ectosomal biogenesis. We then describe the functions that have been proposed for ESCRT-dependent EVs in different physiological and pathological contexts.

2. Biogenesis of ESCRT-dependent extracellular vesicles

2.1. ESCRT function in exosome biogenesis

The ESCRT machinery was initially discovered in yeast for its essential role in the sorting of ubiquitinated endocytic cargo towards the ILVs of MVEs which traffic internalized molecules towards further lysosomal degradation [9,10]. The components of the ESCRT machinery, which in vertebrates comprises around 30 proteins, assemble into 5 functional subcomplexes. The ESCRT-0 subcomplex sequesters ubiquitinated cargo, ESCRT-I/II/III direct ILV budding and the Vps4 complex ensures final membrane scission and/or ESCRT recycling [9–11].

In addition to their role in the trafficking towards lysosomes, MVEs can exert other activities according to the biological context. As already mentioned for reticulocyte-mediated transferrin receptor shedding [14–16], MVEs can exert a secretory function by fusing with the plasma membrane and liberating their ILVs as exosomal EVs. In melanocytic pigment cells, a subpopulation of MVEs matures further into melanosomes, which are lysosome-related organelles that are essential for melanin biosynthesis [33,34]. Different MVEs have been shown to rely on ESCRT-dependent or ESCRT-independent mechanisms for their ILV biogenesis [25,30,35–38].

It remains to be fully understood whether different MVEs represent entirely distinct organelle populations, or arise through the context-dependent modification of a common endosomal template. The analysis of molecular markers suggests that different MVEs can co-exist within a cell [34,39]. While pigment cell-specific proteins can be used to identify melanosomal MVEs [33,34,40], there are presently no markers to unambiguously distinguish degradatory and secretory MVEs.

Of particular importance for the biology of secretory MVEs, a number of ESCRT proteins have been detected in exosome preparations from different sources [17,19,22,41–44]. The ESCRT-I component Tsg101 and the ESCRT-accessory protein Alix are moreover among the most frequently used exosomal markers. Are ESCRT proteins just present on exosomes, or are they themselves required for their formation? During the biogenesis of degradative MVEs, the ESCRT machinery governs both the selection of endocytic cargo that is to be incorporated into ILVs, and the physical membrane remodeling and scission required for ILV formation [9–12,31]. While our understanding of exosome biogenesis is still fragmentary, ESCRTs appear once again to be implicated in both exosomal ILV budding and cargo loading.

2.1.1. The Alix/Syntenin/Syndecan pathway of exosomal biogenesis

Studies in human breast cancer cells have revealed that Alix uses protein motifs that are also required for ESCRT-dependent viral budding to interact with the cytoplasmic adapter protein Syntenin [25]. The PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain of Syntenin in turn binds the cytoplasmic tail of the transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG) Syndecan. This tripartite Alix/Syntenin/Syndecan complex acts as a hub bridging exosomal cargo selection and ILV formation (Fig. 1). Through their HSPG chains, Syndecans can interact with molecules implicated in cell adhesion and signaling [45] and may therefore recruit specific cargo. Alix/Syntenin/Syndecan also direct the physical biogenesis of exosomal ILVs: While overexpression of these factors enhances their own exosomal secretion and the one of the exosomal marker CD63, gene knock-down reduces ILV formation and exosome release [25]. HSPGs seem to be required not only in exosome-releasing cells, but also at the surface of recipient cells, where they would act as receptors for exosome internalization [46].

Genetic screens in yeast initially identified essential roles of all five different ESCRT subcomplexes in MVE biogenesis [9,11,31]. Subsequent studies in different metazoan systems revealed however that, in some instances, specific MVE trafficking pathways use only a fraction of all ESCRT components [47,48]. Similarly, other ESCRT-dependent processes such as viral budding or cytokinesis can bypass part of the machinery [9,13,31,49]. These observations raise the question which ESCRTs are required for exosome biogenesis?

Exosome formation by the Syntenin/Syndecan system requires a direct interaction of Alix with CHMP4 proteins (ESCRT-III) [25] that are the main component of polymeric spiral-shaped filaments that drive membrane remodeling [50–52]. This interaction could directly bridge Alix/Syntenin/Syndecan-mediated cargo selection with ESCRT-III-dependent membrane remodeling. Additional experiments suggest however that components of the ESCRT-I (Tsg101) and ESCRT-II (Vps22) complexes are also important for the formation of Syntenin/Syndecan exosomes [25]. The mechanistic sequence of ESCRT action in this process remains to be established.

The exosomal sorting and secretion of Syndecan is further regulated by Heparanase, an enzyme that is capable of cleaving Syndecan's Heparan Sulfate chains. It has been proposed that this event may favor cargo clustering [53], a process that promotes exosomal secretion of Transferrin receptor [54] and MHCII molecules [55], as well as the targeting of proteins to viral-like particles budding from the cell surface [56].

The formation of Alix/Syntenin/Syndecan exosomes requires the small GTPase Arf6 and one of its effectors, the lipid-metabolizing enzyme Phospholipase D2 (PLD2) which is enriched on exosomes [57,58]. PLD2 metabolizes phosphatidylcholine into phosphatidic acid, a lipid whose cone shape may promote the budding of exosomal membranes into the endosome lumen. Accordingly, inactivation of Arf6 or PLD2 inhibits exosomal ILV biogenesis [57].

Studies in different cell types suggest that mechanisms of exosomal biogenesis are dependent on the biological context [59–61]. While Alix has been shown to govern both exosomal biogenesis and cargo content in breast cancer cells [25], its function in other cell types appears to be essentially the selection of specific exosomal cargo [59,61]. Similarly, the depletion of Tsg101 impairs exosome secretion in HeLa cells [59] while affecting exosomal cargo content in Retinal Pigmented Epithelial cells [61]. The situation is even more confusing for the central ESCRT disassembly factor Vps4 which, dependent on the biological context and the methods used,

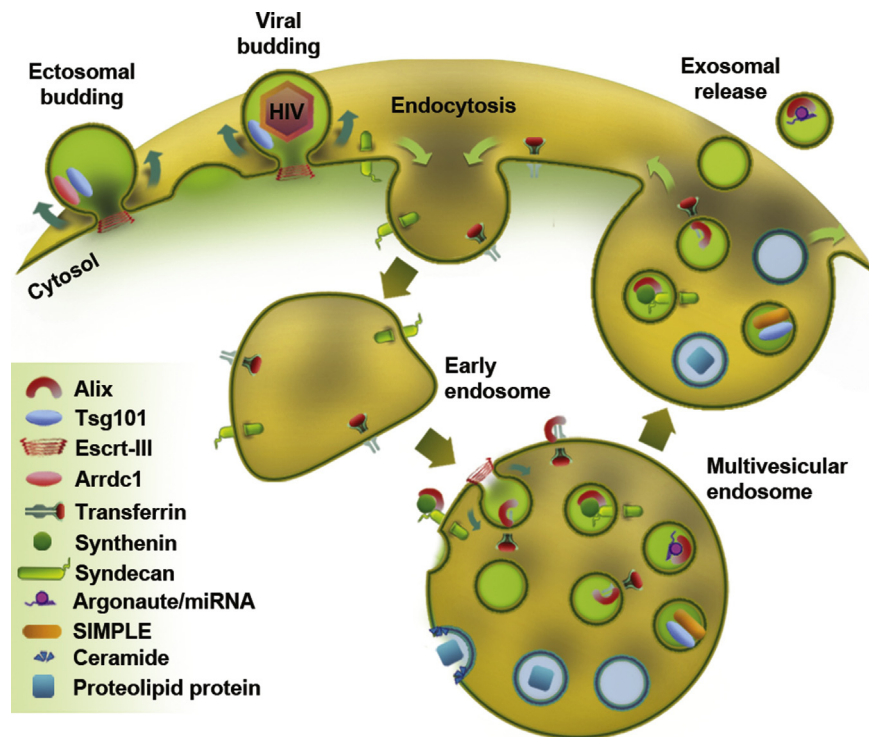


Fig. 1. ESCRT-dependent biogenesis of extracellular vesicles. ESCRT proteins promote the formation of extracellular vesicles through virus-like ectosomal budding from the cell surface or through the exosomal release of the intraluminal vesicles of multivesicular endosomes. Additional ESCRT-independent mechanisms of exosomal biogenesis include ceramide-dependent exosome formation. In addition to promoting extracellular vesicle biogenesis, ESCRT proteins also contribute to exovesicular cargo selection. Arrdc1: Arrestin domain-containing protein1, SIMPLE: Small Integral Membrane Protein of the lysosome/Late Endosome, HIV: Human Immunodeficiency Virus.

has been described to decrease, have no effect, or even increase exosome secretion [25,59,61].

The fact that exosomes can be generated through different mechanisms in different biological contexts suggests that these processes must be tightly regulated. The ubiquitin-like protein Interferon-Stimulated Gene 15 (ISG15) inhibits exosome secretion [62]. Conjugation to ISG15 induces the degradation of Tsg101, which impairs MVE biogenesis and exosomal secretion.

2.1.2. ESCRTs and exosomal cargo loading

The manipulation of the activity of different ESCRT proteins affects ILV size during the formation of both degradative and secretory MVEs [18,36,59,63]. It remains to be understood whether or how alterations in exosome size are linked to the presence or absence of specific cargoes. Is ILV size determined by different ESCRT proteins to accommodate a given cargo, or do ESCRT proteins recognize specific cargoes, the size of which then “passively” determines vesicle size? In degradative MVEs, ubiquitinated endocytic cargo promotes ESCRT-dependent ILV biogenesis [64]. The mechanisms of exosomal cargo loading are just beginning to be understood [2,65].

The Ubiquitin-binding ESCRT proteins Hrs, STAM and Tsg101 have been implicated in exosomal biogenesis [27,59,60]. It is however not entirely clear to what extent ubiquitin contributes to exosomal cargo sorting. During the biogenesis of degradative MVEs, de-ubiquitinating enzymes ultimately remove ubiquitin from endocytic cargo prior to its incorporation in mature ILVs [10]. Exosomal ILVs do however contain ubiquitinated proteins [66]. Ubiquitination of the RNA-binding protein Y-box1 has been suggested to promote its interaction with Tsg101 and subsequent exosomal secretion [67,68]. In contrast, the incorporation of MHCII into exosomes produced by antigen-presenting dendritic cells is not dependent on ubiquitin, but rather on its incorporation into detergent-resistant membrane domains containing the tetraspanin

CD9 [69]. Additional post-translational modifications such as the conjugation to Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) have been implicated in exosomal cargo sorting [65,70].

At least two ESCRT proteins can recruit exosomal cargo through direct molecular interactions (Fig. 1). In rat reticulocytes, interaction with Alix has been suggested to promote exosomal sorting of Transferrin receptor [44]. In human liver cells, the binding of Alix to the miRNA-processing protein Argonaute2 is required for miRNA loading onto exosomal carriers [71]. Tsg101 binds Small Integral Membrane Protein of the lysosome/Late Endosome (SIMPLE), a causative factor of Charcot-Marie-Tooth disease and promotes its exosomal secretion [72]. The analysis of SIMPLE gives a first glimpse of the potential complexity of the regulation of exosomal secretion: While SIMPLE secretion is positively regulated by its binding to Tsg101, it is antagonized by NEDD4, an E3-Ubiquitin ligase promoting lysosomal degradation. Overexpression of wild-type SIMPLE promotes exosomal secretion. Conversely, exosome release is inhibited in a mouse model carrying a disease-causing SIMPLE variant [72].

2.1.3. ESCRT-independent exosome biogenesis

Studies in mammalian cell culture have revealed that a complete disruption of ESCRT function does not abolish ILV formation [36], but rather affects the formation of specific ILV populations [2,38]. Proteomic characterizations of purified EVs [20,22] suggest moreover that mixed vesicle populations can be released even by a single cell type. It is therefore not surprising that exosomal biogenesis can involve both ESCRT-dependent and ESCRT-independent pathways. Functional studies have implicated both lipids and proteins in ESCRT-independent exosome formation.

The biophysical properties of lipids are crucial for cellular membrane remodeling [73]. In late endosomes, ILV biogenesis is promoted by the interaction of Alix with LysoBisPhosphatidic Acid (LBPA) [74], a phospholipid that is however not found in

exosomes. In contrast, the sphingolipid ceramide is present in exosomes (Fig. 1). In mouse oligodendroglial cells, exosome release does not require ESCRT function, but depends on the activity of the ceramide-generating enzyme neutral Sphingomyelinase (nSMase) [35]. Through its cone shape, ceramide may directly promote ILV membrane budding. In addition, ceramide can be metabolized into Sphingosine1-Phosphate (S1P), which binds to S1P-receptors that are present on the membrane of MVEs and promote exosomal biogenesis [75].

The discovery of a ceramide-based mechanism of ILV biogenesis initially led to the proposal that exosome formation occurs independently of ESCRT function [35]. Accordingly, ceramide and the tetraspanins CD9 and CD82, but not ESCRTs, promote the exosomal disposal of β -catenin [76]. A ceramide-dependent, ESCRT-independent pathway also mediates exosomal miRNA secretion [77]. Different pathways may however act in parallel, or even together, to promote exosome release. The study that led to the discovery of the Alix/Syntenin/Syndecan pathway indeed showed that the knock-down of neutral nSMase also inhibits the exosomal secretion of Alix, Syntenin and Syndecan [25]. A second study in cancer cells similarly suggested that ESCRTs and ceramide function in a single exosomal pathway [78]. Both ceramide and ESCRT proteins are required for the exosomal secretion of Phospholipid Scramblase 3 [79] and for Hepatitis Virus-induced exosomal transfer of viral RNA [80].

Melanosomes are multivesicular, lysosome-related organelles that provide a specialized cellular compartment for melanin synthesis in the melanocytes of the skin and retina [33]. The study of the PreMELanosome protein PMEL exemplifies how ESCRT-dependent and ESCRT-independent mechanisms can cooperate for the trafficking of a single protein. PMEL is a transmembrane protein that forms intraluminal fibers onto which melanin is subsequently deposited [40]. Following a proteolytic cleavage that separates the PMEL luminal domain from the membrane-anchored C-Terminal Fragment (CTF) [81], the luminal domain undergoes ESCRT-independent sorting onto ILVs [82]. This process involves the tetraspanin CD63 [37] as well as ApolipoproteinE which anchors PMEL on ILVs, allowing therefore its subsequent exosomal secretion [83]. In contrast, ESCRT activity is required for the further sorting of the CTF towards lysosomal degradation [37].

Small GTPases of the Rab and Ral families are key regulators of endo- and exocytic vesicular trafficking and a number of these proteins have been involved in exosome secretion. Rab11 promotes the calcium-dependent exovesicular secretion of transferrin receptor molecules in K562 leukemia cells [84,85]. RNAi screening in HeLa cells has moreover revealed essential roles of Rab27a and Rab27b in exosome secretion [86]. Rab27 proteins are required for the docking of MVEs to the plasma membrane, but not for the regulation of exosomal protein composition. While Rab27a and Rab27b are both required for exosome secretion, they act through distinct downstream effectors to regulate different steps of exosomal biogenesis. Inactivation of Rab27a inhibits the release of Alix/Tsg101/CD63-positive exosomes but does not affect the secretion of other EVs that may originate from endosomal compartments or the cell surface [21]. Finally, a third type of Rab protein, Rab35, has been shown to promote the exosomal secretion of proteolipid protein in oligodendrocytes, likely by promoting the recruitment of MVEs to the plasma membrane [87].

In addition to the role of different Rab proteins, a recent study has implicated *C.elegans* Ral1 as well as mammalian RalA and RalB in exosome secretion [88]. Ral1 controls the biogenesis of MVEs, as well as their fusion with the plasma membrane. This later step occurs independently of the exocyst complex, but requires the target-SNARE Syntaxin-5 that provides a docking site for Ral1-positive MVEs at the plasma membrane. Studies in *Drosophila* have suggested that another SNARE protein, Ytk6, is required for

ESCRT-dependent exosomal secretion of Hedgehog (Hh) and Wingless (Wg) ligands [27,28]. Ytk6 has however also been involved in ER/Golgi transport [89], and in non-exovesicular conventional secretion [90]. The precise role of Ytk6 in EV secretion remains therefore to be established. At the present state, the fusion of secretory MVEs with the plasma membrane remains one of the most poorly understood aspects of exosomal biogenesis.

A major challenge for the future will be to understand how different regulators of exosomal biogenesis interact with each other. As an example, it has been proposed that Ral1 could stimulate the Alix/Syntenin/Syndecan pathway through its ability to activate Arf6 and Phospholipase D [57,88].

2.2. ESCRT proteins in ectosome formation

Even before the discovery of the importance of the ESCRT machinery for exosomal biogenesis, selected ESCRT proteins had been shown to be required for the cell surface budding of enveloped viruses, including HIV [13]. While ESCRT-dependent cell surface budding was initially considered to be a pathological process, subsequent studies revealed that the regulated ESCRT-dependent release of ectosomes from the cell surface is essential for organismal morphogenesis, cell signaling in development and immunity, as well as the maintenance of cellular integrity [91–96].

The cell biological analysis of ectosome secretion has revealed striking similarities between viral and ectosomal budding. During HIV budding, a PTAP tetrapeptide sequence in the viral Gag protein recruits Tsg101 [97]. In non-infected mammalian cells, Arrestin Domain-Containing protein 1 (ARRDC1) acts as an adaptor that binds the plasma membrane through its arrestin domain, and Tsg101 through a PSAP motif [30] (Fig. 1). The presence of ARRDC1 diverts Tsg101 from its endosomal localization to the plasma membrane and promotes the release of ectosomes containing Tsg101 and ARRDC1 itself, but not the exosomal marker CD63. Conversely, misexpression of ARRDC1 mutants that do not localize to the plasma membrane, or do not bind Tsg101, inhibits ectosome production [30].

In the light of these observations, it is not surprising that the ESCRT-dependent release of ectosomes is often assimilated to virus-like budding. ESCRT proteins can however not only promote viral budding from the cell surface, but are also involved in the biogenesis of virions at the level of MVEs [98–100]. This endosomal pathway allows the virus to hide within exosomes, where it may escape detection by the immune system [101].

As is the case for exosomes, lipids play an important role in ectosomal biogenesis. P4 family ATPases act as transmembrane lipid flippases that translocate phospholipids from the outer to the inner leaflet of the plasma membrane to maintain the physiological asymmetry of the lipid bilayer. *C.elegans* mutants for the P4 ATPase TAT-5 present an inappropriate exposure of Phosphatidylethanolamine (PE) on the outer cell surface [91]. The presence of cone-shaped, potentially curvature-generating, PE in the outer membrane leaflet is accompanied by an excessive release of ectosomes whose presence interferes with cell adhesion and morphogenesis. In TAT-5 mutants, Rab11 and ESCRT proteins accumulate at the cell surface. The production of deleterious ectosomes involves Rab11, ESCRT-0 & -I, but surprisingly not later-acting ESCRT components [91].

Like exosomal biogenesis, ectosome formation can occur through ESCRT-dependent and ESCRT-independent mechanisms. ESCRT-independent ectosome shedding from ciliated sensory neurons controls *C.elegans* mating behavior [102–104]. A recent study has moreover documented the importance of ectosomes for the shedding of G Protein-Coupled Receptors [105]. In this context, actin-regulators release CD81-positive, Tsg101-negative vesicles from the ciliary tip. The importance of ESCRTs for this pro-

cess remains to be investigated. While ectosomal secretion has been reported in non-ciliated tissues [91,92], ciliary and flagellar structures often represent prominent sites of ectosome release [94,103,105–108].

2.3. Additional modes of ESCRT-dependent secretion

While secretory ESCRT functions have been mostly linked to exo- and ectosomal EVs, recent studies suggest that ESCRTs are also important for the so-called “unconventional secretion” of proteins that do not present a peptide leader sequence for ER entry. Unconventional secretion has been proposed to rely on direct membrane translocation or on poorly understood vesicular carriers [109]. The starvation-induced secretion of yeast Acyl CoA binding protein1 (Acb1) involves a novel, multivesicular Compartment for Unconventional Protein Secretion (CUPS) [110]. This compartment comprises a set of ER-derived internal vesicles containing Grh1 (a yeast Golgi Reassembly And Stacking Protein) that are encased by a second set of membrane sacculae. Acb1 loading onto CUPS occurs concomitantly with the assembly of the outer sacculae, through a yet unknown mechanism. The formation and sealing of the sacculae requires ESCRT-I, II & III but not ESCRT-0. CUPS formation appears to be the first membrane remodeling event that does not require the function of the AAA-ATPase Vps4 [110]. As the outer sacculae are themselves vesicular structures, Grh1-positive ILVs are ultimately surrounded by a double lipid bilayer. In this respect, CUPS are topologically similar to autophagosomes [111], but distinct from degradative or secretory MVEs. How CUPS mature to secrete their internal content remains to be understood.

An unconventional secretion pathway is also involved in the release of the pro-inflammatory cytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) [112]. The chaperone protein Heat Shock Protein 90 promotes an unfolding of IL-1 β that translocates the protein in between the two lipid bilayers that encase an autophagosomal phagophore [111]. The ESCRT proteins Hrs and Tsg101 are both required for IL-1 β secretion [112], maybe through their ability to promote the formation of MVEs that can fuse with autophagosomes to give rise to amphisomes [111] which may then undergo fusion with the plasma membrane to release their content in the extracellular space.

ESCRT function and autophagy are intimately linked [111] (see also review by Lefebvre et al. in the current issue). In this context, the autophagy proteins ATG12 and ATG3 interact directly with Alix and promote Alix-dependent exosomal biogenesis [113]. Future studies will have to address the regulation and biological significance of different CUPS- and autophagy-related modes of ESCRT-dependent secretion.

Taken together, current studies suggest that ESCRT proteins must be considered as important regulators of cellular secretion. In the following, we will illustrate different biological roles that have been assigned to secretory ESCRT functions. While numerous studies have merely used ESCRT proteins as exovesicular markers, we will specifically focus on data that address the biological importance of ESCRT-dependent EVs.

3. ESCRT-positive extracellular vesicles in cell communication

3.1. Exovesicular transport of developmental signaling molecules

A number of recent studies have revealed that the transport of signaling molecules by EVs is important for both intercellular and inter-organismal communication [3,4]. Of particular interest for embryonic development are so-called morphogens, that elicit concentration-dependent responses to induce distinct short- and long-range target genes. To pattern developing tissues,

morphogens must often travel over considerable distances. Surprisingly, morphogens of the Wingless (Wg)/Wnt and Hedgehog (Hh) families are subject to lipidations that hinder free diffusion in the hydrophilic extracellular space [114,115]. The secretion of these molecules has therefore been proposed to rely on their packaging into lipoprotein particles [116] or long filopodial extensions (cytonemes) [28,117,118]. Interestingly, a number of studies suggest that Wg/Wnt and Hh are secreted on EVs.

3.1.1. Exovesicular transport of Wingless

Drosophila Wg and their vertebrate Wnt homologues can be secreted on exosomes [27,119–122]. At the *Drosophila* Neuro-Muscular Junction (NMJ), transsynaptic transport of Wg-containing EVs coordinates synaptic growth with muscle size [120]. The presence of MVEs at NMJ synaptic boutons supports an endosomal origin of these vesicles, but functional analysis shows that exovesicular release occurs independently of ESCRTs [119]. The importance of exosomal Wg secretion for the patterning of the fly wing primordium remains debated: Two studies have documented that *Drosophila* cells secrete exosomes that can stimulate Wg signal transduction, but obtained conflicting evidence as to whether exosomal secretion is ESCRT-dependent and relevant under physiological conditions [27,121]. Exosomal Wnt secretion has moreover been shown to regulate the motility of breast cancer cells through an activation of the Planar Cell Polarity pathway. The importance of ESCRTs for this process was however not addressed [122].

Beyond the secretion of Wg/Wnt ligands, Wnt signal transduction can be terminated through the exovesicular discharge of β -catenin, a process that requires tetraspanins and ceramides, but not ESCRTs [76]. ESCRT-dependent MVE biogenesis has been suggested to be essential for Wnt signal transduction [123] and Wnt5 regulates ESCRT recruitment during cytokinesis [124]. Unambiguous evidence for the importance of ESCRT-dependent EVs in Wg/Wnt secretion is however still lacking.

3.1.2. Hedgehog secretion and transport

Three independent studies corroborate an essential function of ESCRT-dependent EVs in Hh secretion in the *Drosophila* wing, albeit with differences in the proposed cellular mechanisms. Matussek et al. suggest that Hh secretion is based on ESCRT-dependent ectosome release [92] (Fig. 2). Similar to viral cell surface budding, Hh secretion requires ESCRT-I & –III, Alix and Vps4, but not ESCRT-II. Partial knock-down of different ESCRT-components allows moreover to generate conditions that affect degradative MVE biogenesis without impairing Hh secretion, or affect Hh secretion but not MVE trafficking. These findings argue that the ESCRT-dependent release of Hh- is not linked to MVE biogenesis. Finally, the inhibition of Vps4, which is expected to inhibit EV scission in both exosomal and ectosomal biogenesis, traps Hh at the outer leaflet of the apical plasma membrane of Hh-producing cells. Exovesicular Hh secretion is required for activation of long-range Hh-target genes, but dispensable for short-range targets [92].

This last conclusion is also reached by Parchure et al., which do however favor an exosomal origin of ESCRT-dependent Hh-EVs [125] (Fig. 2). This conclusion is based on the presence of endocytosed Hh in MVEs, as well as on the observation that strong perturbations of the endo-lysosomal system result in intracellular Hh retention. Interestingly, this study also shows that Hh oligomerization is required for exovesicular secretion, adding therefore to the growing evidence that cargo clustering is important for incorporation into EVs [54–56,125].

A third study suggests that the ESCRT-dependent secretion of Hh-containing EVs is mediated by exosomes that travel on cytonemal extensions that are present on the basal surface of the wing primordium [28] (Fig. 2). In this work, the disruption of ESCRTs, ceramide-generating sphingomyelinase, SNAREs, and TAT-

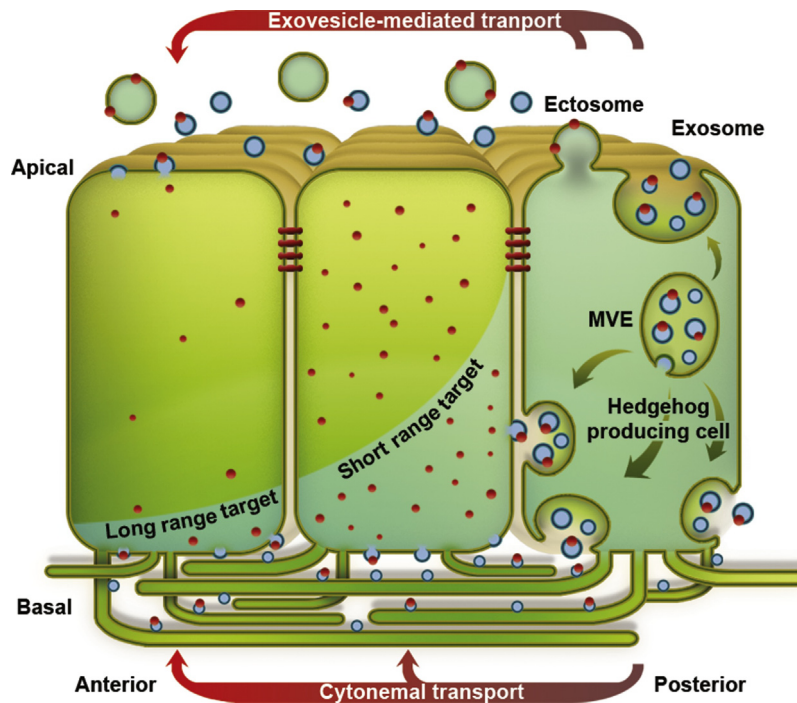


Fig. 2. The ESCRT machinery promotes exovesicular Hedgehog secretion. In the *Drosophila* wing imaginal disc, Hedgehog (Hh) is transported from posterior Hh-producing to anterior Hh-receiving cells to activate different short- and long-range target genes. Hh secretion occurs through the ESCRT-dependent release of extracellular vesicles. Hh-containing vesicles have been proposed to be of exo- or ectosomal origin, and to move in the apical lumenal space or travel on baso-lateral cytonemes. MVE: MultiVesicular Endosome.

5 (which in *C.elegans* inhibits ESCRT-dependent EV release [91]) all impair induction of both short- and long-range Hh target genes [28]. How exosomes are loaded and transported on cytonemes remains to be established. Taken together, these three studies make a strong point that ESCRT-dependent EVs are required for Hh secretion *in vivo* [28,92,125], but they also illustrate the difficulty to mechanistically dissect exovesicular transport processes using currently available tools.

The importance of EV for Hh release is further underscored by a study of Sonic hedgehog (Shh) secretion in human cell lines and chick notochord cells. While the importance of the ESCRT machinery is not addressed by this work, it reveals that Shh is secreted on two types of exosomal vesicles that differ in their protein composition. While both types of EV can activate synthetic Shh-reporters, only Integrin-positive vesicles can trigger Shh-dependent differentiation in mouse Embryonic Stem cells [126], suggesting therefore an additional regulation of the signaling competence of Shh-positive EVs.

3.1.3. Eph/Ephrin signaling

In contrast to Wnt and Hh, Eph receptor tyrosine kinases and their cognate Ephrin ligands have been classically implicated in contact-dependent juxta-membrane signaling between adjacent cells. Among the particularities of this pathway is the fact that it involves both forward (i.e. from ligand to receptor) and reverse (from receptor to ligand) signaling. EphB2 interacts with ESCRT proteins that promote its secretion in EVs that are then internalized into Ephrin1-positive neurons where they elicit reverse signaling and growth cone collapse [127]. Like the previously described release of exosomes from cortical neurons [128,129], the secretion of EphB2-positive EVs is dependent on neuronal activity, suggesting that ESCRT-dependent vesicular carriers are important for neuronal remodeling.

Of particular importance, this study shows that the transport of signaling molecules on EVs blurs established distinctions between secreted signaling molecules acting at a distance, and short-range interactions based on cell–cell contacts. An additional example for the exovesicular transfer of a classical cell-contact signaling molecule is provided by endothelial Delta-like 4 (Dll4), which is secreted on EVs and incorporated into receiving cell membranes where it inhibits Notch receptor activation [130]. It remains to be established whether this process involves ESCRT-dependent EV biogenesis.

3.2. Extracellular vesicles in morphogenesis

In addition to signaling molecules involved in cell communication, EVs convey components that are essential for morphogenesis. In the nematode *C.elegans*, MVE-derived exosomes transport Hh-related proteins that are required for cuticular morphogenesis. This process is regulated by the VO sub-complex of the vacuolar H⁺-ATPase, the small GTPase Ral1 and ESCRT proteins [88,131]. Excessive secretion of ESCRT-dependent EVs in a mutant for the lipid flippase TAT-5 causes morphogenetic defects and embryonic lethality [91]. These deleterious phenotypes highlight the importance of a tight control of EV formation.

ESCRT-dependent EV cannot only contribute to the formation, but also to the disassembly of morphological structures. In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, Vps4 and the Alix-interacting protein ALG-2 (also called PDCD6) direct the release of ciliary ectosomes to promote flagellar shortening under specific physiological conditions [94].

3.3. Inter-organismal communication by extracellular vesicles

ESCRT-dependent EV can also ensure the exchange of biological information among different organisms. In the *Drosophila* male

genital tract, BMP signaling stimulates the secondary cells of the reproductive accessory glands to secrete MVE-derived, ESCRT-dependent, exosomes [132]. Upon mating, these exosomes interact with the epithelium of the female reproductive tract to inhibit female receptivity to subsequent re-mating with other males.

In the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*, environmental stress induces ESCRT-dependent exosomal secretion of the spliced leader RNA, which is normally implicated in the splicing of all cellular mRNAs [133]. The internalization of these EVs by recipient trypanosomes promotes a repulsive social mobility that causes parasites to migrate away from potentially harmful environments.

4. ESCRT-dependent extracellular vesicles and disease

In addition to their normal physiological functions, EV have been implicated in different aspects of human pathology including cancer, neurodegenerative diseases and host-pathogen interactions [1,5,7,8]. In the following we review currently available data that support functional links between ESCRT-dependent EVs and different disease conditions.

4.1. Exovesicular transport of viral proteins

As already mentioned, ESCRT proteins promote the release of different viruses both at the level of the plasma membrane [97] and within exosome-generating endosomal compartments [98–100] (for comprehensive reviews on ESCRT function in viral biogenesis see [13,101]). Beyond the recruitment of ESCRTs for their biogenesis, viruses can induce the secretion of EVs that do not contain the virus itself, but are nevertheless important for pathogen spreading.

Ebola virus promotes the ESCRT-dependent secretion of its VP40 protein in exosomes that trigger the death of host immune cells, likely through a deregulation of the cellular RNAi machinery [134]. ESCRT protein levels and exosome release are increased by VP40, revealing that the virus actively regulates ESCRT-dependent EV formation. In contrast, human papillomavirus inhibits exosome production by triggering the proteolytic degradation of p53 [135], a factor that promotes *chmp4c* transcription and consequently CHMP4C-dependent exosome production [136]. Papillomavirus additionally alters exosomal cargo content to favor the secretion of apoptosis inhibitors [135]. The ability of viruses proteins to control ESCRT-dependent EV formation is further illustrated by the presence of an inhibitory budding signal in HIV, that impairs the interaction of Vps4 with the tetraspanins CD63 and CD81 [137].

4.2. ESCRT-dependent extracellular vesicles and cancer

While a large number of studies suggest that EV can exert either cancer-promoting or anti-tumoral activities [1,5], the importance of ESCRT-dependent EVs for cancer biology remains largely to be investigated. Ras-transformed cancer cells secrete exosomes that favor invasion in non-transformed cells [138]. EV released by glioblastoma cells moreover contain activated Ras complexed to Vps4 and Alix [41]. It is not yet clear whether in the context of cancer-derived EV formation, ESCRT-proteins are required for exosomal Ras secretion, for Ras-mediated signaling in receiving cells, or both [139]. A function for ESCRT-dependent EVs in tumoral invasion is further supported by the observation that ESCRT-dependent EV release is required for the formation and function of invadopodia, actin-rich cellular protrusions that promote cancer cell dissemination through the secretion of extracellular matrix-degrading proteases [78].

4.3. ESCRTs, extracellular vesicles and neurodegenerative diseases

Many neurodegenerative diseases involve the formation of toxic protein aggregates, the clearance of which involves ESCRT-dependent MVEs [140]. In addition to clearance by lysosomal and autophagosomal degradation, deleterious proteins can be secreted by EVs [7].

Alzheimer's disease involves the processing of the Amyloid Precursor Protein (APP) into Amyloid- β (A β), that accumulates intracellularly and in extracellular amyloid plaques. A fraction of the total A β peptide is secreted in exosomes and the ESCRT protein Alix has been detected on amyloid plaques [141]. In contrast to the CD63-dependent ILV-sorting of the physiological melanosomal amyloid PMEL [37], APP is ubiquitinated and sorted into ILVs in an ESCRT-dependent fashion [142–144]. A model of Alzheimer's disease shows that the accumulation of A β in MVEs impairs endo-lysosomal EGFR degradation [145]. Different studies have led to conflicting views as to whether ESCRT depletion promotes or inhibits A β production and/or secretion [142–144].

Accumulations of α -synuclein cause Parkinson's disease and other so-called synucleinopathies. Mutations in the P-type ATPase ATP13A2/PARK9 trigger Kufor-Rakeb syndrome and early onset parkinsonism. PARK9 localizes to MVEs and promotes ILV formation and ESCRT-dependent exosomal synuclein secretion [146]. α -synuclein trafficking towards lysosomal degradation is ubiquitin- and ESCRT-dependent [147]. Exovesicular secretion depends on synuclein conjugation to SUMO, identifying hence SUMOylation as a sorting signal for ESCRT-dependent EV secretion [70]. Surprisingly, inhibition of Vps4 was shown to not only inhibit lysosomal α -synuclein degradation, but also to promote its direct, non-exovesicular, secretion through a Rab11-dependent pathway [148].

Both the normal cellular Prion protein and the abnormally folded, disease-causing Prion scrapie are secreted by exosomes [149]. ESCRT-dependent MVEs are important for the generation of infectious Prions and Tsg101 is required for exosomal Prion secretion [150,151].

A better understanding of EV in neurodegenerative conditions will be of major medical interest. In particular, it will be important to determine whether, for a given pathology, exovesicular secretion lowers the toxic load of secreting cells, transmits pathogenic aggregates to non-infected neighbouring cells, or both.

4.4. ESCRT-dependent extracellular vesicles in immune responses and host-pathogen interactions

Immune cells were among the first described sources of EVs [32]. Functional studies have since revealed that ESCRTs promote the formation of both ecto- and exosomal carriers that are important for immune communication. During the formation of the immunological synapse between T-cells and antigen-presenting B cells, Tsg101 directs the ubiquitination-dependent incorporation of T-cell receptors (TCR) into ectosomes that bud from the center of the synapse and are released upon membrane scission by Vps4 [96,152] (Fig. 3). The release of these EV serves a dual purpose: On one hand, the shedding of TCR ectosomes shuts down TCR signaling in the vesicle-emitting T-cell. On the other hand, the binding of TCR vesicles to antigen-presenting MHC complexes triggers calcium-dependent downstream signaling events that result in the proliferation of vesicle-receiving B-cells [96].

In the context of another type of host defense mechanism, cells that have been infected by Hepatitis C virus use the ESCRT machinery to promote the exosomal secretion of Viral RNA [80]. The reception of these EVs by dendritic cells triggers an interferon-based antiviral response.

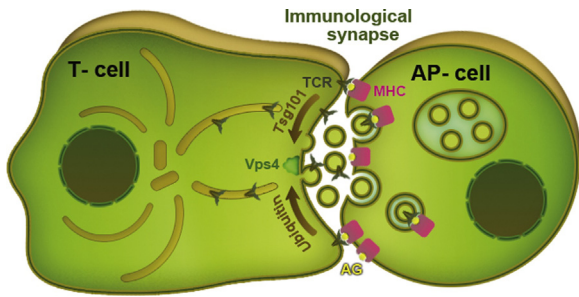


Fig. 3. ESCRTs promote ectosomal T-cell receptor release at the immunological synapse. Antigen presenting cells establish contact with T-cells through a specialized communication interface, the immunological synapse. Tsg101 ensures the ubiquitin-dependent sorting of T-Cell Receptor (TCR) molecules to ectosomes that undergo Vps4-dependent release into the synaptic cleft. TCR ectosomes stimulate antigen-presenting MHC molecules present on the surface of antigen-presenting B cells. AG: AntiGen, AP-cell: Antigen-Presenting cell, MHC: Major histocompatibility complex.

While these examples illustrate the use of ESCRT-dependent EVs for the establishment of host immune responses, additional studies have revealed that ESCRT proteins are also present in immunosuppressive EVs that are released by parasites to exert an action on their host [153,154]. It remains to be established how ESCRTs contribute to the formation and function of these EVs.

A striking example of a pathogen taking advantage of exosomal EVs is provided by the lethal toxin of *Bacillus anthracis*, which is composed of two subunits: the Lethal Factor (LF) which cleaves Mitogen Activated Protein Kinases, and its Protective Antigen (PA). Following receptor-mediated endocytosis and trafficking to MVEs, PA can translocate LF either into the cytoplasm, or into the lumen of ILVs [61]. This later step allows the toxin to persist for a prolonged time in an environment where it is protected from proteolytic degradation. LF-containing ILVs can then either back-fuse with the MVE limiting membrane to liberate their content into the cytosol, or be secreted as exosomes that deliver LF to naïve cells upon endocytic internalization. As both ILV formation and ILV back-fusion depend on ESCRTs [155], these proteins are important modulators of anthrax virulence [61].

5. Extracellular vesicles and beyond

Our current thinking of EVs is largely dominated by the concept of vesicular carriers that are released to transport biological signals, often to trigger a response in distant target cells. Beyond exo- and ectosomal biogenesis, we propose that two other processes that result in the ESCRT-dependent shedding of membrane-bound entities in the extracellular space, cytokinetic abscission and plasma membrane repair, should be considered as additional secretory functions of the ESCRT machinery.

Studies of the final stage of cell division have revealed that the ESCRT machinery is essential for the final abscission of the cytokinetic bridge [49] (see also review by Stoten and Carlton in the present issue). Depending on the biological context, scission can occur on one or both sides of the mitotic midbody. Accordingly, the midbody remnant is either retained in one of the two daughter cells, or released into the extracellular space. Interestingly, a comparative analysis of midbody-release in different cell types suggests that cellular differentiation correlates with increased midbody release [156]. The inactivation of Alix or Tsg101 prevents midbody release and enhances responsiveness to differentiation-inducing signals, suggesting therefore that the regulated disposal of a “midbody EV” is an important event for cell fate specification. In addition, the midbody itself is an additional source of EV production [157].

Beyond cell signaling, the ability of ESCRTs to promote the extracellular release of fragments of the plasma membrane is essential for the regulation of cellular integrity and survival [158]. Plasma membrane wounding with toxins, detergents or laser beams triggers a rapid calcium-dependent relocalisation of Alix (which itself harbors a calcium-binding domain), ESCRT-III components and Vps4 from the cytoplasm. These components then promote the budding and extracellular release of the damaged membrane fragment [93,95]. This type of activity also allows ESCRT-III components to ensure an essential negative control of necroptosis, a regulated form of necrosis [159]. Upon activation of the necroptosis pathway, Mixed Lineage Kinase-Like disrupts plasma membrane integrity. ESCRT-III components counteract this process and prolong cellular survival through the release of damaged membrane fragments.

In conclusion, the biogenesis of membrane-bound vesicular entities that are released into the extracellular space has emerged as an important function of the ESCRT machinery. A major challenge for the future will be to develop approaches to specifically target different EVs and establish their precise biological function. The analysis and manipulation of extracellular vesicles is expected to be of major medical interest for diagnosis and therapeutic delivery. The recently reported engineering of artificial exovesicular carriers that take advantage of the membrane-deforming capabilities of the ESCRT machinery highlights the potential of this approach [160].

Acknowledgements

The lab of M.F. has benefited from support by the CNRS / INSERM ATIP/Avenir program, an HFSP Career Development Award and a Projet ARC grant. The PhD of T.J. is funded by Région PACA / INSERM and the Labex SIGNALIFE.

References

- [1] M. Tkach, C. Théry, Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go, *Cell* 164 (6) (2016) 1226–1232.
- [2] M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 255–289.
- [3] K.B. Beer, A.M. Wehman, Mechanisms and functions of extracellular vesicle release in vivo—What we can learn from flies and worms, *Cell Adh. Migr.* 11 (2) (2017) 135–150.
- [4] I.J. McGough, J.P. Vincent, Exosomes in developmental signalling, *Development* 143 (14) (2016) 2482–2493.
- [5] L.M. Desrochers, M.A. Antonyak, R.A. Cerione, Extracellular vesicles: satellites of information transfer in cancer and stem cell biology, *Dev. Cell* 37 (4) (2016) 301–309.
- [6] C. Gutiérrez-Vázquez, et al., Transfer of extracellular vesicles during immune cell–cell interactions, *Immunol. Rev.* 251 (1) (2013) 125–142.
- [7] A.G. Thompson, et al., Extracellular vesicles in neurodegenerative disease – pathogenesis to biomarkers, *Nat. Rev. Neurol.* 12 (6) (2016) 346–357.
- [8] L. Brown, et al., Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (10) (2015) 620–630.
- [9] W.M. Henne, N.J. Buchkovich, S.D. Emr, The ESCRT pathway, *Dev. Cell* 21 (1) (2011) 77–91.
- [10] C. Raiborg, H. Stenmark, The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins, *Nature* 458 (7237) (2009) 425–452.
- [11] W.M. Henne, H. Stenmark, S.D. Emr, Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5 (9) (2013).
- [12] J. McCullough, L.A. Colf, W.I. Sundquist, Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway, *Annu. Rev. Biochem.* 82 (2013) 663–692.
- [13] J. Votteler, W.I. Sundquist, Virus budding and the ESCRT pathway, *Cell Host Microbe* 14 (3) (2013) 232–241.
- [14] B.T. Pan, R.M. Johnstone, Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor, *Cell* 33 (3) (1983) 967–978.
- [15] R.M. Johnstone, et al., Vesicle formation during reticulocyte maturation: Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes), *J. Biol. Chem.* 262 (19) (1987) 9412–9420.
- [16] C. Harding, J. Heuser, P. Stahl, Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes, *J. Cell Biol.* 97 (2) (1983) 329–339.

- [17] C. Théry, et al., Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles, *J. Immunol.* 166 (12) (2001) 7309–7318.
- [18] D.P. Romancino, et al., Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells, *FEBS Lett.* 587 (9) (2013) 1379–1384.
- [19] S. Mathivanan, et al., Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature, *Mol. Cell. Proteomics* 9 (2) (2010) 197–208.
- [20] Q. Chen, et al., Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35562.
- [21] A. Bobrie, et al., Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation, *J. Extracell. Vesicles* 1 (2012).
- [22] J. Kowal, et al., Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (8) (2016) E968–77.
- [23] A. Forterre, et al., Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk? *PLoS One* 9 (1) (2014) e84153.
- [24] A.F. Ellen, et al., Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components, *Extremophiles* 13 (1) (2009) 67–79.
- [25] M.F. Baietti, et al., Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nat. Cell Biol.* 14 (7) (2012) 677–685.
- [26] M.Z. et al. Trikić, Regulation of zebrafish hatching by tetraspanin cd63, *PLoS One* 6 (5) (2011) e19683.
- [27] J.C. Gross, et al., Active Wnt proteins are secreted on exosomes, *Nat. Cell Biol.* 14 (10) (2012) 1036–1045.
- [28] A.C. Gradilla, et al., Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5649.
- [29] A.M. Booth, et al., Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane, *J. Cell Biol.* 172 (6) (2006) 923–935.
- [30] J.F. Nabhan, et al., Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (11) (2012) 4146–4151.
- [31] M. Alonso Y Adell, S.M. Migliano, D. Teis, ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission, *FEBS J.* 283 (18) (2016) 3288–3302.
- [32] G. Raposo, et al., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J. Exp. Med.* 183 (3) (1996) 1161–1172.
- [33] G. Raposo, M.S. Marks, Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (10) (2007) 786–797.
- [34] T. Burgoyne, et al., Expression of OA1 limits the fusion of a subset of MVBs with lysosomes – a mechanism potentially involved in the initial biogenesis of melanosomes, *J. Cell Sci.* 126 (Pt 22) (2013) 5143–5152.
- [35] K. Trajkovic, et al., Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes, *Science* 319 (5867) (2008) 1244–1247.
- [36] S. Stuffers, et al., Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs, *Traffic* 10 (7) (2009) 925–937.
- [37] G. van Niel, et al., The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis, *Dev. Cell* 21 (4) (2011) 708–721.
- [38] J.R. Edgar, E.R. Eden, C.E. Futter, Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles, *Traffic* 15 (2) (2014) 197–211.
- [39] I.J. White, et al., EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation, *EMBO J.* 25 (1) (2006) 1–12.
- [40] C. Bissig, L. Rochin, G. van Niel, PMEL amyloid fibril formation: the bright steps of pigmentation, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (9) (2016).
- [41] N. Luchtala, et al., Secreted glioblastoma nanovesicles contain intracellular signaling proteins and active ras incorporated in a farnesylation-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 292 (2) (2017) 611–628.
- [42] Z. Wang, et al., Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT), *Proteomics* 12 (2) (2012) 329–338.
- [43] D. Chiasserini, et al., Identification and partial characterization of two populations of prostasomes by a combination of dynamic light scattering and proteomic analysis, *J. Membr. Biol.* 248 (6) (2015) 991–1004.
- [44] C. Géminard, et al., Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes, *Traffic* 5 (3) (2004) 181–193.
- [45] F.E. Poulain, H.J. Yost, Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development* 142 (20) (2015) 3456–3467.
- [46] H.C. Christianson, et al., Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (43) (2013) 17380–17385.
- [47] A. Mamińska, et al., ESCRT proteins restrict constitutive NF- κ B signaling by trafficking cytokine receptors, *Sci. Signal.* 9 (411) (2016) (p. ra8).
- [48] N. Ali, et al., Recruitment of UBPY and ESCRT exchange drive HD-PTP-dependent sorting of EGFR to the MVB, *Curr. Biol.* 23 (6) (2013) 453–461.
- [49] M.S. Bhutta, C.J. McInerney, G.W. Gould, ESCRT function in cytokinesis: location, dynamics and regulation by mitotic kinases, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (12) (2014) 21723–21739.
- [50] S. Lata, et al., Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4, *Science* 321 (5894) (2008) 1354–1357.
- [51] N. Chiaruttini, et al., Relaxation of loaded ESCRT-III spiral springs drives membrane deformation, *Cell* 163 (4) (2015) 866–879.
- [52] S. Tang, et al., Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments, *Elife* 4 (2015) (e12548).
- [53] G. David, P. Zimmermann, Heparanase tailors syndecan for exosome production, *Mol. Cell Oncol.* 3 (3) (2016) e1047556 (p).
- [54] M. Vidal, P. Mangeat, D. Hoekstra, Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation, *J. Cell Sci.* 110 (Pt 16) (1997) 1867–1877.
- [55] A. Muntasell, A.C. Berger, P.A. Roche, T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes, *EMBO J.* 26 (19) (2007) 4263–4272.
- [56] Y. Fang, et al., Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes, *PLoS Biol.* 5 (6) (2007) e158.
- [57] R. Ghossein, et al., Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3477.
- [58] K. Laulagnier, et al., PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes, *FEBS Lett.* 572 (1–3) (2004) 11–14.
- [59] M. Colombo, et al., Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles, *J. Cell Sci.* 126 (Pt 24) (2013) 5553–5565.
- [60] K. Tamai, et al., Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs: an ESCRT-0 protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399 (3) (2010) 384–390.
- [61] L. Abrami, et al., Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin, *Cell Rep.* 5 (4) (2013) 986–996.
- [62] C. Villarroya-Beltri, et al., ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins, *Nat. Commun.* 7 (2016) 13588.
- [63] D.P. Nickerson, et al., Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles, *Mol. Biol. Cell* 21 (6) (2010) 1023–1032.
- [64] C. MacDonald, et al., Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation, *EMBO Rep.* 13 (4) (2012) 331–338.
- [65] O. Moreno-Gonzalo, C. Villarroya-Beltri, F. Sánchez-Madrid, Post-translational modifications of exosomal proteins, *Front. Immunol.* 5 (2014) 383.
- [66] S.I. Buschow, et al., Exosomes contain ubiquitinated proteins, *Blood Cells. Mol. Dis.* 35 (3) (2005) 398–403.
- [67] M.J. Shurtleff, et al., Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction, *Elife* 5 (2016) e19276.
- [68] V.R. Palicharla, S. Maddika, HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion, *Cell. Signal.* 27 (12) (2015) 2355–2362.
- [69] S.I. Buschow, et al., MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways, *Traffic* 10 (10) (2009) 1528–1542.
- [70] M. Kunadt, et al., Extracellular vesicle sorting of α -Synuclein is regulated by sumoylation, *Acta Neuropathol.* 129 (5) (2015) 695–713.
- [71] A. Iavello, et al., Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis, *Int. J. Mol. Med.* 37 (4) (2016) 958–966.
- [72] H. Zhu, et al., Mutation of SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth 1C alters production of exosomes, *Mol. Biol. Cell* 24 (11) (2013) 1619–1637 (S1–3).
- [73] G.J. Doherty, H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 857–902.
- [74] H. Matsuo, et al., Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization, *Science* 303 (5657) (2004) 531–534.
- [75] T. Kajimoto, et al., Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2712.
- [76] A. Chairoungdua, et al., Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling, *J. Cell Biol.* 190 (6) (2010) 1079–1091.
- [77] N. Kosaka, et al., Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells, *J. Biol. Chem.* 285 (23) (2010) 17442–17452.
- [78] D. Hoshino, et al., Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior, *Cell Rep.* 5 (5) (2013) 1159–1168.
- [79] T. et al. Inuzuka, ALG-2-interacting Tubby-like protein superfamily member PLSCR3 is secreted by an exosomal pathway and taken up by recipient cultured cells, *Biosci. Rep.* 33 (2) (2013) e00026.
- [80] M. Dreux, et al., Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity, *Cell Host Microbe* 12 (4) (2012) 558–570.
- [81] L. Rochin, et al., BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (26) (2013) 10658–10663.
- [82] A.C. Theos, et al., A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis, *Dev. Cell* 10 (3) (2006) 343–354.
- [83] G. van Niel, et al., Apolipoprotein e regulates amyloid formation within endosomes of pigment cells, *Cell Rep.* 13 (1) (2015) 43–51.
- [84] A. Savina, et al., Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner, *Traffic* 6 (2) (2005) 131–143.
- [85] A. Savina, M. Vidal, M.I. Colombo, The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11, *J. Cell Sci.* 115 (Pt 12) (2002) 2505–2515.

- [86] M. Ostrowski, et al., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat. Cell Biol.* 12 (1) (2010) 19–30 (sup 1–13).
- [87] C. Hsu, et al., Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C, *J. Cell Biol.* 189 (2) (2010) 223–232.
- [88] V. Hyenne, et al., RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion, *J. Cell Biol.* 211 (1) (2015) 27–37.
- [89] J.A. McNew, et al., Ykt6p: a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport, *J. Biol. Chem.* 272 (28) (1997) 17776–17783.
- [90] D.E. Gordon, et al., VAMP3/Syb and YKT6 are required for the fusion of constitutive secretory carriers with the plasma membrane, *PLoS Genet.* 13 (4) (2017) e1006698.
- [91] A.M. Wehman, et al., The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos, *Curr. Biol.* 21 (23) (2011) 1951–1959.
- [92] T. Matuszek, et al., The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog, *Nature* 516 (7529) (2014) 99–103.
- [93] A.J. Jimenez, et al., ESCRT machinery is required for plasma membrane repair, *Science* 343 (6174) (2014) 1247136.
- [94] H. Long, et al., Comparative analysis of ciliary membranes and ectosomes, *Curr. Biol.* 26 (24) (2016) 3327–3335.
- [95] L.L. Scheffer, et al., Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5646.
- [96] K. Choudhuri, et al., Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse, *Nature* 507 (7490) (2014) 118–123.
- [97] J.E. Garrus, et al., Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding, *Cell* 107 (1) (2001) 55–65.
- [98] K. Tamai, et al., Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway, *Virology* 422 (2) (2012) 377–385.
- [99] Z. Feng, et al., A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes, *Nature* 496 (7445) (2013) 367–371.
- [100] L. Corless, et al., Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles, *J. Gen. Virol.* 91 (Pt 2) (2010) 362–372.
- [101] M.R. Anderson, F. Kashanchi, S. Jacobson, Exosomes in viral disease, *Neurotherapeutics* 13 (3) (2016) 535–546.
- [102] J. Wang, et al., Cell-specific transcriptional profiling of ciliated sensory neurons reveals regulators of behavior and extracellular vesicle biogenesis, *Curr. Biol.* 25 (24) (2015) 3232–3238.
- [103] J. Wang, et al., *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication, *Curr. Biol.* 24 (5) (2014) 519–525.
- [104] M. Silva, et al., Cell-specific α -tubulin isotype regulates ciliary microtubule ultrastructure, intraflagellar transport, and extracellular vesicle biology, *Curr. Biol.* 27 (7) (2017) 968–980 (p).
- [105] A.R. Nager, et al., An actin network dispatches ciliary GPCRs into extracellular vesicles to modulate signaling, *Cell* 168 (1–2) (2017) 252–263 (e14).
- [106] D.R. Diener, P. Lupetti, J.L. Rosenbaum, Proteomic analysis of isolated ciliary transition zones reveals the presence of ESCRT proteins, *Curr. Biol.* 25 (3) (2015) 379–384.
- [107] C.R. Wood, et al., The cilium secretes bioactive ectosomes, *Curr. Biol.* 23 (10) (2013) 906–911.
- [108] M. Cao, et al., Uni-directional ciliary membrane protein trafficking by a cytoplasmic retrograde IFT motor and ciliary ectosome shedding, *Elife* 4 (2015) e05242.
- [109] M. Zhang, R. Schekman, Cell biology. Unconventional secretion, unconventional solutions, *Science* 340 (6132) (2013) 559–561.
- [110] A.J. Curwin, et al., ESCRT-III drives the final stages of CUPS maturation for unconventional protein secretion, *Elife* 5 (2016) e16299.
- [111] A. Simonsen, S.A. Tooze, Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes, *J. Cell Biol.* 186 (6) (2009) 773–782.
- [112] M. Zhang, et al., Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion, *Elife* 4 (2015) e11205.
- [113] L. Murrow, R. Malhotra, J. Debnath, ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function, *Nat. Cell Biol.* 17 (3) (2015) 300–310.
- [114] J. Briscoe, P.P. Théron, The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (7) (2013) 416–429.
- [115] K. Willert, R. Nusse, Wnt proteins, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 4 (9) (2012) a007864.
- [116] D. Panáková, et al., Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling, *Nature* 435 (7038) (2005) 58–65.
- [117] E. Stanganello, et al., Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning, *Nat. Commun.* 6 (2015) 5846.
- [118] T.A. Sanders, E. Llagostera, M. Barna, Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning, *Nature* 497 (7451) (2013) 628–632.
- [119] K. Koles, et al., Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons, *J. Biol. Chem.* 287 (20) (2012) 16820–16834.
- [120] C. Korkut, et al., Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless, *Cell* 139 (2) (2009) 393–404.
- [121] K. Beckett, et al., *Drosophila* S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes, *Traffic* 14 (1) (2013) 82–96.
- [122] V. Luga, et al., Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration, *Cell* 151 (7) (2012) 1542–1556.
- [123] V.F. Taelman, et al., Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes, *Cell* 143 (7) (2010) 1136–1148.
- [124] K. Fumoto, et al., Wnt5a signaling controls cytokinesis by correctly positioning ESCRT-III at the midbody, *J. Cell Sci.* 125 (Pt 20) (2012) 4822–4832.
- [125] A. Parchure, et al., Oligomerization and endocytosis of Hedgehog is necessary for its efficient exovesicular secretion, *Mol. Biol. Cell* 26 (25) (2015) 4700–4717.
- [126] N. Vyas, et al., Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7357.
- [127] J. Gong, et al., Exosomes mediate cell contact-independent ephrin-Eph signaling during axon guidance, *J. Cell Biol.* 214 (1) (2016) 35–44.
- [128] J. Fauré, et al., Exosomes are released by cultured cortical neurones, *Mol. Cell. Neurosci.* 31 (4) (2006) 642–648.
- [129] G. Lachenal, et al., Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity, *Mol. Cell. Neurosci.* 46 (2) (2011) 409–418.
- [130] H. Sheldon, et al., New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes, *Blood* 116 (13) (2010) 2385–2394.
- [131] S. Liégeois, et al., The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*, *J. Cell Biol.* 173 (6) (2006) 949–961.
- [132] L. Corrigan, et al., BMP-regulated exosomes from *Drosophila* male reproductive glands reprogram female behavior, *J. Cell Biol.* 206 (5) (2014) 671–688.
- [133] D. Eliaz, et al., Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*, *PLoS Pathog.* 13 (3) (2017) e1006245.
- [134] M.L. Pleet, et al., Ebola VP40 in exosomes can cause immune cell dysfunction, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1765.
- [135] X. Yu, T. Riley, A.J. Levine, The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene, *FEBS J.* 276 (8) (2009) 2201–2212.
- [136] X. Yu, S.L. Harris, A.J. Levine, The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein, *Cancer Res.* 66 (9) (2006) 4795–4801.
- [137] X. Gan, S.J. Gould, Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins, *Mol. Biol. Cell* 22 (6) (2011) 817–830.
- [138] M. Demory Beckler, et al., Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS, *Mol. Cell. Proteomics* 12 (2) (2013) 343–355.
- [139] Z.Y. Zheng, et al., CHMP6 and VPS4A mediate the recycling of Ras to the plasma membrane to promote growth factor signaling, *Oncogene* 31 (43) (2012) 4630–4638.
- [140] M. Filimonenko, et al., Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease, *J. Cell Biol.* 179 (3) (2007) 485–500.
- [141] L. Rajendran, et al., Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (30) (2006) 11172–11177.
- [142] J.R. Edgar, et al., ESCRTs regulate amyloid precursor protein sorting in multivesicular bodies and intracellular amyloid- β accumulation, *J. Cell Sci.* 128 (14) (2015) 2520–2528.
- [143] R.W. Choy, Z. Cheng, R. Schekman, Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β (A β) production in the trans-Golgi network, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (30) (2012) E2077–82.
- [144] E. Morel, et al., Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2250.
- [145] C.G. Almeida, R.H. Takahashi, G.K. Gouras, Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system, *J. Neurosci.* 26 (16) (2006) 4277–4288.
- [146] T. Tsunemi, K. Hamada, D. Krainc, ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and α -synuclein, *J. Neurosci.* 34 (46) (2014) 15281–15287.
- [147] G.K. Tofaris, et al., Ubiquitin ligase Nedd4 promotes alpha-synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (41) (2011) 17004–17009.
- [148] T. et al. Hasegawa, The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein, *PLoS One* 6 (12) (2011) e29460.
- [149] B. Fevrier, et al., Cells release prions in association with exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (26) (2004) 9683–9688.
- [150] D. Vilette, et al., Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway, *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (22) (2015) 4409–4427.
- [151] Y.I. Yim, et al., The multivesicular body is the major internal site of prion conversion, *J. Cell Sci.* 128 (7) (2015) 1434–1443.
- [152] S. Vardhana, et al., Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster, *Immunity* 32 (4) (2010) 531–540.
- [153] A.H. Buck, et al., Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5488.

- [154] K. Cwiklinski, et al., The extracellular vesicles of the helminth pathogen, *fasciola hepatica*: biogenesis pathways and cargo molecules involved in parasite pathogenesis, *Mol. Cell. Proteomics* 14 (12) (2015) 3258–3273.
- [155] T. Falguières, P.P. Luyet, J. Gruenberg, Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics, *Exp. Cell Res.* 315 (9) (2009) 1567–1573.
- [156] A.W. Ettinger, et al., Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour, *Nat. Commun.* 2 (2011) 503.
- [157] V. Dubreuil, et al., Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1, *J. Cell Biol.* 176 (4) (2007) 483–495.
- [158] A.J. Jimenez, F. Perez, Physico-chemical and biological considerations for membrane wound evolution and repair in animal cells, *Semin. Cell Dev. Biol.* 45 (2015) 2–9 (p).
- [159] Y.N. Gong, et al., ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences, *Cell* 169 (2) (2017) 286–300 (e16).
- [160] J. Votteler, et al., Designed proteins induce the formation of nanocage-containing extracellular vesicles, *Nature* 540 (7632) (2016) 292–295.

Résumé

Notre fascination pour l'asymétrie droite/gauche (D/G) remonte à plusieurs siècles, avec les premières descriptions de maladies liées à des défauts de latéralité comme la dextrocardie. Ce n'est que récemment cependant que les premières preuves moléculaires à l'initiation d'un développement latéralisé se sont accumulées avec la découverte de l'expression asymétrique du gène nodal chez le poulet. Depuis, des progrès majeurs ont été réalisés avec la mise en évidence de la conservation de nodal et de la voie de signalisation qui s'établit en aval pour permettre une morphogenèse asymétrique chez les vertébrés. Malgré cela, l'évènement initial de brisure de symétrie reste un mystère, et la diversité des mécanismes de mise en place de l'asymétrie dans les différents phylums font s'interroger sur la conservation d'un même évènement initial au cours de l'évolution.

J'ai utilisé au cours de ma thèse le poisson-zèbre comme organisme modèle afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions. J'ai travaillé dans cette optique sur deux projets séparés qui m'ont permis d'étudier de façon indépendante deux aspects du D/G. (1) La façon dont la machinerie cellulaire ESCRT participe à la cassure de symétrie. (2) La conservation des mécanismes de mise en place du D/G à travers l'étude de la protéine Myo1D.

Dans un premier temps, je me suis ainsi intéressé aux premiers évènements de cassure de la symétrie chez les vertébrés. Chez le poisson-zèbre, la région organisatrice de l'asymétrie D/G consiste en un organe embryonnaire transitoire, appelée vésicule de Kupffer (KV), qui apparaît au début des phases de segmentation et se situe au niveau du bourgeon de queue. La KV est formée de cellules épithéliales, qui font face à une lumière sphérique remplie de liquide. Ce liquide est mis en mouvement de façon circulaire antihoraire pas les battements de cils motiles présents sur les cellules épithéliales, et le courant ainsi généré est responsable de la cassure de symétrie d'une manière qui reste mal comprise. Nous avons observé dans la lumière de la KV la présence de vésicules positives pour la protéine Chmp1b, qui appartient au complexe ESCRT. De plus, la perte de fonction par morpholino d'un autre composant d'ESCRT, Vps4b, entraîne une diminution du nombre de ces vésicules et des défauts de latéralité des organes. Ces défauts de latéralité suite à la perte d'un composant ESCRT ont été ensuite confirmés par l'observation du phénotype associé à la mutagenèse de Chmp1a, un paralogue de Chmp1b, qui présente des défauts similaires à Vps4b. Ces observations suggèrent un rôle potentiel des vésicules dans la mise en place de l'asymétrie D/G, mais soulèvent également la question de leur adressage, comment un flux circulaire peut-il promouvoir leur transport asymétrique ? Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une analyse quantitative de la dynamique de transport de vésicules dans la KV. Ces mesures m'ont permis de montrer que des gradients de vitesses de déplacement du flux de la KV étaient responsables du transport directionnel de ces vésicules. Ainsi, ces résultats permettent de proposer un modèle dans lequel des vésicules ESCRT-positive assureraient le transport directionnel de signaux essentiels à la cassure de symétrie.

Dans un deuxième temps, je me suis focalisé sur la conservation des évènements de cassure de symétrie au cours de l'évolution. J'ai travaillé pour cela sur le phénotype associé à la perte de fonction de la protéine Myo1D, qui entraîne chez la Drosophile une inversion totale de l'axe D/G de tous les organes latéralisés. Myo1D est une myosine non-conventionnelle qui a été montré comme interagissant avec le cytosquelette d'actine afin d'initier une cassure de symétrie à l'échelle de la cellule chez la Drosophile. Ces informations sont ensuite propagées à l'ensemble du tissu par l'intermédiaire de la signalisation PCP. Chez le poisson-zèbre, j'ai montré que la perte de Myo1D avait également un impact sur la latéralité de tous les organes embryonnaires, ainsi que sur les signaux les plus précoces d'initialisation de la latéralité. J'ai ainsi montré que Myo1D interagissait de façon fonctionnelle avec la protéine VanGogh-like2 (Vangl2), un composant de la voie PCP contrôlant le positionnement et l'orientation des cils de la KV pour permettre l'établissement d'un flux fonctionnel. Myo1D, son paralogue Myo1G et leur antagoniste Myo1Cb font partis d'un réseau fonctionnel contrôlant l'asymétrie D/G chez le poisson-zèbre. Ces découvertes établissent ainsi que le système Myo1D représente une machinerie conservée au cours de l'évolution pour l'établissement d'une latéralité chez les animaux.

Mots-clés: Poisson-zèbre – Organisateur droite/gauche – ESCRT – Myo1D – Flux extracellulaire