



HAL
open science

Forme et croissance dans le Vivant : Morphogénèse du Pétale de Nigelle (*Nigella damascena*) : Morphogénèse des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes

Pierre Galipot

► To cite this version:

Pierre Galipot. Forme et croissance dans le Vivant : Morphogénèse du Pétale de Nigelle (*Nigella damascena*) : Morphogénèse des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes. Biologie cellulaire. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2021. Français. ⟨NNT : 2021MNHN0019⟩. ⟨tel-04870742⟩

HAL Id: tel-04870742

<https://theses.hal.science/tel-04870742v1>

Submitted on 7 Jan 2025

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.



HAL Authorization

MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE



École Doctorale 227
Sciences de la nature et de l'Homme : évolution et écologie

Année 2021

N°attribué par la bibliothèque

|||||

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Biologie

présentée et soutenue publiquement par

Pierre GALIPOT

le 22/09/21

Forme et croissance dans le Vivant

Morphogenèse du pétale de nigelle de Damas (*Nigella damascena*)

Morphogenèse des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes

Sous la direction de : **Monsieur Jabbour, Florian, Maître de conférences,**

et de : **Madame Damerval, Catherine, Directrice de recherche**

JURY :

Mme Elias, Marianne

M. Jabbour, Florian

Mme Damerval, Catherine

Mme Moyroud, Edwige

M. Städler, Yannick

Mme. Monniaux, Marie

Directrice de Recherche, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075)

Maître de conférences, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075)

Directrice de Recherche, CNRS

Research group Leader, University of Cambridge (United Kingdom)

Senior scientist, University of Vienna (Austria)

Chargée de recherche, ENS de Lyon

Examinatrice

Directeur de Thèse

Directrice de Thèse

Rapporteur

Rapporteur

Invitée

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres du jury, et en particulier Edwige Moyroud, Yannick Städler, Marie Monniaux et Marianne Elias d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie également Raphaël Cornette pour avoir donné son accord initial.

J'adresse tous mes remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse : Vincent Debat, Natalia Conde e Silva, Adrienne Ressayre et Philippe Andrey pour leurs conseils et leurs points de vue complémentaires qui ont grandement fait avancer le projet.

Je remercie également l'ENS de Lyon pour le financement de cette thèse, sous la forme d'un contrat doctoral spécifique normalien. Je remercie l'Université Paris Sciences & Lettres (PSL) et le Collège de France pour m'avoir accueilli durant la première année de thèse. Je remercie le Muséum national d'Histoire naturelle de m'avoir accueilli durant ces deux dernières années de thèse.

Merci également aux deux écoles doctorales : « Complexité du Vivant » (ED 515), et « Sciences de la nature et de l'Homme : évolution et écologie » (ED 227) pour leur aide au cours de ces trois années de doctorat. Un remerciement tout particulier à Emmanuèle Mouchel-Vielh et à Nathalie Machon pour leur écoute et leurs conseils, et pour avoir rendu cette transition aisée.

Je remercie L'Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB) pour son accueil, pour son aide au financement des expériences de microscopie électronique à balayage, ainsi que pour le financement de l'Open Access de l'article de revue publié au cours de cette thèse. Je remercie également Philippe Grandcolas, directeur de l'ISYEB pour ses conseils et son accompagnement pour la publication de cet article.

Je remercie la plateforme de microscopie du MNHN pour m'avoir permis de recueillir les données qui auront été au cœur des analyses de mon article de thèse. Je remercie également l'UMR GQE- Le Moulon pour avoir hébergé les serres où ont été récoltés les boutons de nigelle ayant servi à cette étude. Je remercie à ce titre Catherine Damerval, Florian Jabbour et Beatriz Gonçalves pour avoir participé en amont à la récolte et à la préparation du matériel biologique ayant servi à cette étude.

Je remercie les conservateurs du MNHN (Emmanuel Delfosse, Barbara Buge, Nicolas Vidal) qui m'ont permis d'accéder à des spécimens biologiques afin d'illustrer l'article de review.

Ce travail de thèse commencé en novembre 2019 mais n'est que l'aboutissement des 27 années qui ont précédées, et à ce titre j'aimerais remercier un grand nombre de personnes sans qui ce parcours n'aurait pas existé ou aurait plus compliqué à vivre !

Je remercie tout d'abord très chaleureusement tous les membres de ma famille, pour m'avoir offert un environnement familial exceptionnellement aimant, ouvert et enthousiaste. Tout est plus aisé quand on peut se reposer sur une famille pareille, alors merci à vous ! Une pensée particulière pour mes grands-parents Abuelo, Abuela, Mamé et Papère. Un merci plus que reconnaissant à mes parents, à Pauline et à Lucas. Merci à Caroline, Denis, Francisco, Gilles, Isabelle, Julian, Laurent, Marie et Nathalie. Et merci bien sûr à Nicolas, Hélène, Estéban, Hugo, Maël, Numa et Juliane. Merci également à celles et ceux qui sont présents depuis quinze ans : Thomas, Pauline, à celles et ceux qui ont rejoint en cours de route, Jérémie et Mégan. Et une pensée toute particulière pour celui et celle qui sont plus qu'un +1, Robin et Élise. Merci également à toute ma belle-famille, en particulier à Pascale et Guy, Yohann, Marion et Jérémie.

Si mon attrait pour la Biologie remonte au collège voire à la primaire (Nicolas et les BFS, c'est à vous que je pense), les choses sérieuses ont commencé juste après le baccalauréat avec trois

années de prépa intenses, mais cruciales. La dernière, la fameuse « 5/2 » a été contre toute attente mon année préférée de toute ma scolarité, et pour rien au monde je n'ai regretté ce « redoublement » ! Et à nouveau, c'est grâce à une poignée de personnes, dont je ne peux taire les noms. Profitez-en, c'est votre tour ! Un merci tout particulier d'abord à Élodie pour m'avoir accueilli pendant toute ma période d'internat, ces soirs de révisions/discussions ont grandement rendu mon passage à Malherbe plus agréable. Merci évidemment à Jean-Charles, Ronan, Côme, Alice, Servane, Anthony, Maël, Thomas, Matthieu, Camille, Liza et à tous les autres habitant(e)s ou squatteurs de ce fameux couloir d'internat pour cette incroyable année.

Malgré le quotidien parfois compliqué de ces trois années de prépa, mon attrait pour la science et la Biologie se sont accentués grâce notamment à des professeur(e)s de SVT exceptionnel(le)s. Un grand merci tout d'abord à Mathieu Vartanian, c'est sûrement en grande partie grâce à vous que je dois mon entrée à l'ENS de Lyon. Merci à Catherine Varlet et Béatrice Levilly pour votre bienveillance et pour m'avoir permis de garder le cap et la flamme des SVT en deuxième (et troisième) années.

Les quatre années lyonnaises qui ont suivi ont également été très enrichissantes et surtout très agréables grâce à la compagnie exceptionnelle de Hugo, Rémy, Margaux, Juliana, Salomé, Lilian, Victor, Marine, et tou(te)s les autres. J'espère que Lyon sera le lieu de nos retrouvailles pour de nombreuses années encore. Parmi les professeur(e)s, chercheuses et chercheurs que j'ai eu l'immense chance de côtoyer durant ses années à l'ENS de Lyon, je tiens à remercier particulièrement Marie Sémon, Jean-Pierre Moussus, Pierre Thomas, Déborah Prevot, Cyril Langlois et David Busti pour avoir personnifié la science que j'aimerais pratiquer plus tard. Beaucoup de ces personnes inspirantes font partie de l'équipe de la prépa agrégation SV-STU de l'ENS de Lyon, une formidable année encore, à la fois scientifiquement et humainement (à croire que les concours ne sont pas que des sources de stress et de travail !). Je remercie également Abderrahman Khila, de l'IGFL et Haruhiko Fujiwara de l'Université de Tokyo, pour avoir accueilli le stagiaire inexpérimenté que j'étais, d'avoir entretenu mon intérêt pour la science et de m'avoir permis de garder l'espoir de pouvoir mener une carrière académique un jour.

J'ai maintenant une pensée particulière pour toutes les personnes que j'ai croisées pendant ces trois ans de thèse, qui n'ont pas été de tout repos !

Tout d'abord merci à Marie pour m'avoir proposé ce sujet de stage et de m'avoir accueilli dans ton laboratoire, et un grand merci à Nico, Camille, Magda, Richard, et bien sûr Nicole et Carole, j'ai beaucoup apprécié votre compagnie pendant cette année et demi mouvementée ! Une pensée également à tous les jeunes chercheuses et chercheurs du CIRB, et en particulier au bureau des Chadoc. Il est toujours agréable de repasser faire un coucou au Collège, et j'espère que nos chemins se recroiseront d'une manière ou d'une autre.

Un énorme merci également à mes collègues de fortune, Tian, Julie, Carlos, Simon, Marwan, Karen, Matthieu, Lucile qui m'avez si bien accueilli pour ces deux années de thèse au Muséum. J'ai adoré passer ces redéconfinements à vos côtés dans le bureau du 3^{ème} de la Phanéro !

Un merci également à mes chers compagnons de jeu qui ont rendu les périodes de confinement beaucoup plus agréables, merci à Pauline, Adam, Numa, Jean-Charles et David !

Pour clore cette longue séquence, viennent maintenant des remerciements tout particuliers, que je pourrais nommer, sans leur manquer de respect, les « éléphants au milieu de la pièce ».

Tout d'abord, Florian et Catherine, mes encadrants de thèse, qui ont recueilli l'oiseau tombé du nid que j'étais pour en faire une belle plante (du moins je l'espère). Un merci empli de gratitude pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour m'avoir soutenu pour écrire cet article de revue,

ainsi pour votre accompagnement constant et bienveillant. Vous êtes des encadrants de thèse exceptionnels, je crois avoir beaucoup grandi scientifiquement et humainement à vos côtés !

Et enfin, une personne que j'aurais pu citer dans la plupart des paragraphes précédents tant elle a su se rendre indispensable depuis ces huit (+ 2) années ! Merci à Lauren, dont le délicieux compagnonnage durant ces années d'études, de césure et de thèse m'aura rendu la vie bien douce. Arigatō gozaimasu !

Il y a beaucoup de noms qui n'ont pu être cités, mais je pense bien à vous !

Form and growth in living beings. Morphogenesis of *Nigella damascena* petal. Morphogenesis of repeated color patterns in Eukaryotes

Summary:

Shape changes and growth are two processes which co-occur during the development of organisms. Local processes such as cell proliferation can influence both shape and size of a tissue, organ or organism, which raises the question of the interactions between size and shape during development. Through a geometric morphometric and cellular study of the elaborate petal of love-in-a-mist (*Nigella damascena* L., Ranunculaceae, Angiosperms), and the classification of the mechanisms responsible for repeated color patterns in Eukaryotes, we questioned the great diversity of the relationships between morphogenesis and growth during development.

The study of *Nigella damascena* presented in chapter 1 demonstrated an allometric link between petal shape and growth during development. The complementary study of cellular characteristics showed that the two main processes involved in petal growth and morphogenesis - cell expansion and cell proliferation - have different contributions. Cellular proliferation is the predominant process in shape changes while cell expansion is more involved in petal growth.

In the study presented in chapter 2, if the main objective was the classification of the mechanisms of formation of repeated color patterns, it also showed a major role of growth for the formation of at least two families of color patterns (out of the seven listed), as well as a role of pattern modifier, increasing the geometric diversity of the color patterns of Eukaryotes. These two studies contribute to deepening the links between form and growth during the development of Eukaryotes.

Keywords: morphogenesis, growth, petal, color patterns, *Nigella*, Ranunculaceae, Eukaryotes

Forme et croissance dans le Vivant. Morphogenèse du pétale de nigelle de Damas (*Nigella damascena*). Morphogenèse des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes

Résumé :

Les changements de forme et la croissance sont deux processus qui coexistent pendant le développement des organismes. Certains processus locaux comme la prolifération cellulaire peuvent influencer à la fois la forme et la taille d'un tissu, d'un organe ou de l'organisme entier, ce qui pose la question des interactions entre taille et forme au cours du développement. À travers une étude de morphométrie géométrique et des caractéristiques cellulaires du pétale élaboré de la nigelle de Damas (*Nigella damascena*, Ranunculaceae, angiospermes) et de la classification des mécanismes de formation des patrons de couleurs répétés des Eucaryotes, nous avons interrogé la grande diversité des relations entre morphogenèse et croissance au cours du développement. L'étude de la nigelle de Damas présentée au chapitre 1 a permis de mettre en évidence un lien allométrique entre forme et croissance du pétale au cours du développement. L'étude complémentaire des caractéristiques cellulaires a permis de montrer que les deux processus principaux participant à la croissance et à la morphogenèse du pétale -expansion cellulaire et prolifération cellulaire- ont des contributions différentes. La prolifération cellulaire est le processus prépondérant dans les changements de forme, alors que l'expansion cellulaire participe plutôt à la croissance du pétale.

L'étude présentée au chapitre 2, dont l'objectif principal était la classification des mécanismes de formation des patrons de coloration répétés, a permis de mettre en évidence un rôle prépondérant de la croissance pour la formation d'au moins deux familles de patrons de couleurs sur les sept répertoriées ainsi qu'un rôle de modificateur de patron, augmentant la diversité géométrique des motifs de couleurs portés par les Eucaryotes. Ces deux études ont permis d'approfondir les liens entre forme et croissance au cours du développement des êtres vivants, dont de nombreuses relations restent à mettre à jour.

Mots clés : morphogenèse, croissance, pétale, patrons de coloration, *Nigella*, Ranunculaceae, Eucaryotes

Table des matières

Remerciements	2
Form and growth in living beings. Morphogenesis of <i>Nigella damascena</i> petal. Morphogenesis of repeated color patterns in Eukaryotes.....	5
Forme et croissance dans le Vivant. Morphogénèse du pétale de nigelle de Damas (<i>Nigella damascena</i>). Morphogénèse des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes.....	6
Table des matières	7
Introduction générale.....	8
Forme et croissance au cours du développement, quelles relations possibles ?	9
Le pétale de <i>Nigella</i> (Ranunculaceae), un modèle d'étude pour la formation d'organes élaborés	17
Les patrons de couleurs répétés des tissus externes des Eucaryotes, des traits concourant à de nombreuses fonctions biologiques cruciales	24
Le pétale de <i>Nigella damascena</i> et les patrons de couleur répétés, des modèles complémentaires pour éclairer les relations entre forme et croissance au cours du développement	32
Chapitre I	35
Morphométrie géométrique et analyses cellulaires révèlent une relation allométrique entre taille et croissance pendant le développement du pétale de la nigelle de Damas (<i>Nigella damascena</i> , Ranunculaceae) et mettent en évidence le rôle morphogénétique de la prolifération cellulaire et le rôle de croissance de l'expansion cellulaire.	35
Chapitre II	66
Les sept façons de produire des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes	66
Chapitre III	85
Discussion.....	85
Les rôles des phénomènes cellulaires (microscopiques) dans l'établissement de caractéristiques macroscopiques, (la taille et la forme du pétale), et leur implication dans les liens entre forme et taille, révélés par l'étude menée sur le pétale de <i>Nigella damascena</i>	85
Entre indépendance et génération de l'une par l'autre, différentes nuances de relations entre forme et croissance	94
Quelles explications évolutives et/ou mécanistiques aux liens entre forme et croissance ? Éclairage de l'étude du pétale de <i>Nigella damascena</i> et des patrons de couleur répétés.....	102
Chapitre 4	105
Retours sur les principaux apports des études, Perspectives et Conclusion générale	105
Perspectives.....	106
Conclusion générale	112
Références.....	114

Introduction générale

L'acquisition des formes (morphogenèse) et la croissance sont deux processus coexistant durant le développement de la majorité des Eucaryotes (D. W. Thompson 1992), et à ce titre leurs relations méritent d'être regardées de près afin de mieux comprendre leurs rôles durant le développement et leurs contrôles respectifs. Par ailleurs, une série de processus tels que la division ou l'expansion cellulaire sont susceptibles d'entraîner à la fois une variation de forme et de taille, et suggèrent des liens forts entre morphogenèse et croissance.

Dans cette première partie introductive, à l'aide d'une littérature scientifique remontant jusqu'au début du siècle dernier, nous allons commencer à explorer les différents liens entre forme et taille chez les êtres vivants. Nous introduirons ensuite le contexte de recherche autour de *Nigella damascena*, qui fait l'objet de l'étude présentée au chapitre 1. Nous montrerons en quoi elle et son genre *Nigella* sont devenus un quasi-modèle pour l'étude du développement d'organes élaborés. Nous introduirons ensuite la thématique de la coloration chez les Eucaryotes, puis nous nous focaliserons en particulier sur les patrons de couleurs répétés, qui font l'objet du chapitre 2. Nous expliquerons enfin comment l'étude du pétale de *Nigella damascena* et des patrons de couleurs répétés peut éclairer les liens entre forme et croissance au cours du développement.

Forme et croissance au cours du développement, quelles relations possibles ?

Quelques définitions en guise de préambule

Taille (et croissance) et plus encore forme (et morphogenèse) sont des termes qui recouvrent de nombreuses identités, dont une partie sera abordée dans ce manuscrit, d'où l'importance de bien préciser leurs contours.

Si son acception la plus large désigne l'augmentation numérique d'une grandeur et donc peut recouvrir une grande variété de processus, ici le terme de croissance fera toujours référence à une augmentation de la taille (d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme). La taille, quant à elle peut désigner selon le contexte une longueur, comme c'est le cas dans la plupart des études d'allométrie (voir paragraphe « *Changements de forme, croissance et allométrie* »), une surface (d'une cellule, d'un tissu comme dans la plupart des exemples évoqués dans le chapitre 1 et chapitre 2) ou bien un volume. Dans le chapitre 1 consacré à *Nigella damascena*, le terme taille peut aussi désigner la taille du centroïde. Cette dernière est la mesure de taille utilisée presque universellement en morphométrie géométrique, et sera le proxy de la taille du pétale dans notre étude. Elle correspond à la racine carrée de la somme des distances au carré de tous les points de repère (landmarks) de l'objet à leur centroïde, qui est leur centre de gravité. Si la plupart du temps la taille des objets biologiques étudiés augmente au cours du temps développemental, des décroissances restent tout de même possibles, souvent légères. Quelques-unes seront évoquées dans le paragraphe suivant (« *Croissance sans changement de forme et changement de forme sans croissance* »).

La forme d'un objet biologique (d'une molécule à un organisme en passant par toutes les échelles possibles), désigne quant à elle l'ensemble des caractéristiques géométriques du contour de l'objet, sous réserve que celui-ci soit biologiquement repérable, le contour étant la (ou les) ligne(s) (en deux dimensions) ou la (ou les) surfaces (en trois dimensions) qui délimite(nt) l'objet dans son environnement (Bookstein 2013). La forme décrit donc la manière dont un objet biologique occupe l'espace. Les formes qui feront l'objet des études présentées

dans les chapitres 1 et 2 sont de natures relativement différentes, et seront présentées de manière plus détaillée en préambule de chaque chapitre. Les formes réelles d'un objet seront souvent approchées par un proxy, c'est-à-dire un objet plus simple, ou plus aisément accessible à l'expérimentateur. Par exemple, pour l'objet d'étude que constitue le pétale de *Nigella damascena*, le proxy de sa forme 3D (dont le contour est la surface externe de l'épiderme) sera une série de points de repères (landmarks) en deux dimensions, repérés visuellement sur les clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) grâce aux caractéristiques locales du pétale (un changement de courbure, une commissure, une arête, etc.) et permettant une analyse homologue sur une série d'échantillons d'individus différents, et correspondant à des stades différents (Figure 1).

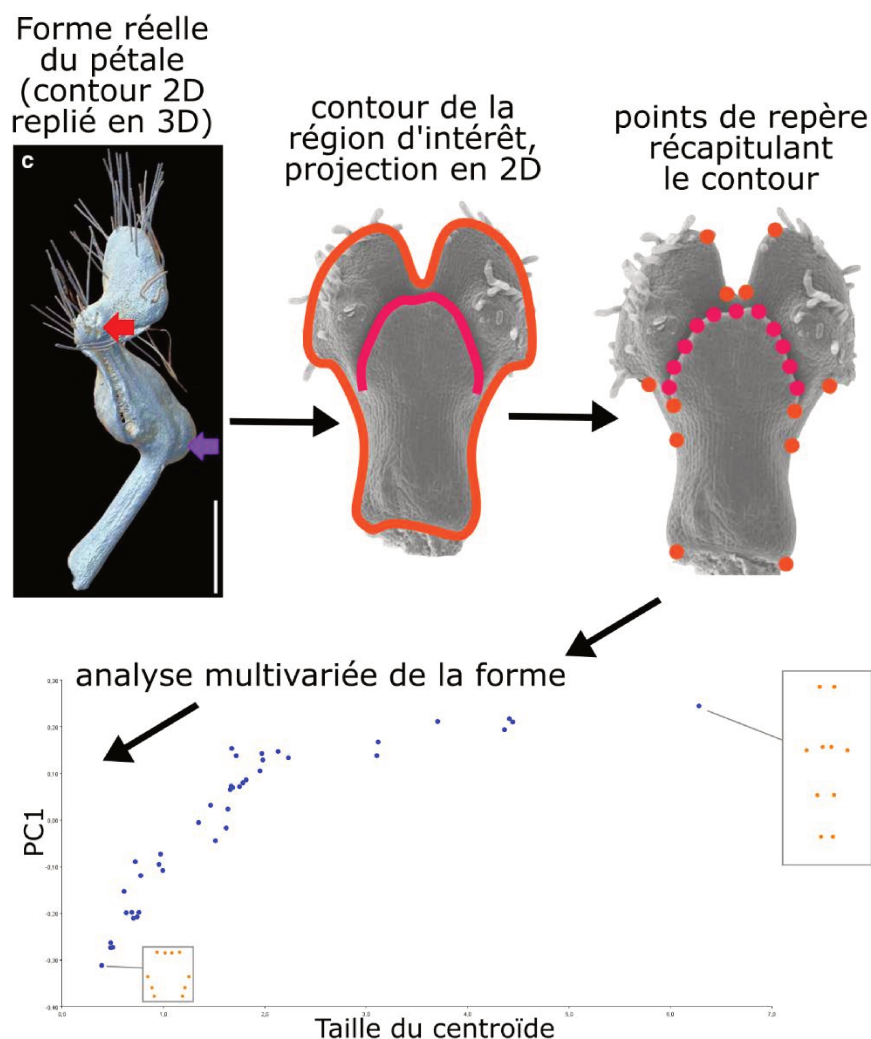


Figure 1 **Forme du pétale de *Nigella damascena* et notion de proxy** (portion de figure en haut à gauche adaptée de (Liao et al. 2020))

Pour les patrons de couleurs répétés, la forme d'un motif est déterminée par la couleur (l'ensemble des longueurs d'ondes émises par un objet, le plus souvent celles correspondant au spectre visible de l'humain), un changement de celle-ci définissant une frontière du motif. Pour un patron de couleurs répétés donné, sa forme est déterminée d'une part par la forme du motif répété (pois, rayures, ocelles, etc.) mais aussi par le nombre et la répartition des motifs les uns par rapport aux autres, la notion de forme pouvant donc recouvrir un ensemble complexe de caractéristiques. De la même manière que la croissance correspondant à la dynamique de la taille au cours du temps développemental, le corollaire de la forme est la morphogenèse. Maintenant que forme et taille, morphogenèse et croissance sont définies, intéressons-nous à leurs liens, en commençant par s'interroger si l'une peut exister sans l'autre, durant le développement.

Croissance sans changement de forme et changement de forme sans croissance

Si croissance et changement de forme coexistent pendant la plupart de la durée du développement, des exceptions notables existent chez certains groupes taxonomiques. En particulier, chez les organismes où une partie du développement se fait dans un volume donné -comme l'œuf des amphibiens-, un développement à volume constant ou quasi-constant est alors possible. Chez ces organismes, la cellule-œuf, géante, contient les réserves nutritives dans son cytosol et elle occupe ainsi la quasi-totalité de l'espace disponible. Le développement consiste dans sa première partie en des divisions cellulaires non-conservatives, où les cellules filles se partagent le volume de la cellule mère, entraînant au cours des processus de divisions une taille moyenne cellulaire de plus en plus réduite (Saka and Smith 2001). La larve qui éclore de cet œuf occupera au mieux un volume aussi important que celui de la cellule initiale. On retrouve ce type de développement chez les drosophiles (Edgar and O'Farrell 1989) où la cellule-œuf donne une larve d'une taille comparable, les deux étant limitées par la paroi de l'œuf. Ceci n'est cependant pas vrai pour tous les développements se faisant dans un œuf, car chez certains groupes comme les oiseaux, les réserves nutritives sont externes à l'embryon (Slavkin and

Bavetta 2017). Si ce dernier occupe la quasi-totalité de l'espace disponible au moment de l'éclosion, ce n'est pas le cas au début de son développement, sa cellule initiale ayant une taille réduite par rapport à l'œuf. Au cours des divisions cellulaires, plutôt conservatives, le volume occupé par l'embryon augmente, de manière souvent exponentielle, aux dépens de celui des réserves. C'est le cas également pour de nombreux autres vertébrés dont les téléostéens (Kunz 2004). On voit donc ici que la localisation des réserves peut conditionner les liens entre croissance et changement de forme. Les développements à volume constant ne concernent pas que les œufs. Chez certains taxons comme chez de nombreux Insectes dont les larves connaissent des métamorphoses, des changements de forme spectaculaires ont lieu à taille constante (Truman 2019), voire diminuante. À cause de la respiration cellulaire qui entraîne une perte nette en carbone, la masse sèche de l'organisme peut diminuer légèrement le temps de la métamorphose (Burton and Tullett 1985), ce qui peut entraîner une baisse du volume si cela n'est pas compensé par d'autres mécanismes comme l'absorption d'eau atmosphérique.

Si de nombreux exemples de changements de forme sans croissance semblent donc exister pendant le développement de nombreuses espèces, l'inverse est plus rare. Néanmoins, quelques exemples peuvent être considérés comme des séquences développementales sans changement de forme flagrant, mais pendant lequel l'organisme connaît une croissance importante. Pour reprendre l'exemple des drosophiles, la larve connaît une très grande phase de croissance entre l'éclosion de l'œuf et le passage à la pupa. Cependant, sans être complètement exempte de changements de forme, les larves de drosophile connaissent une relative stase morphologique (Minelli and Fusco 2013). Il est intéressant de noter que durant le développement de ces organismes, les phases de grande croissance ou de fort changement de forme sont disjointes dans le temps.

La plupart des téléostéens connaissent à la fois des changements de forme et de taille au cours du développement, notamment de l'allométrie, où certains organes croissent plus vite que d'autres. Cependant, parmi les 23600 espèces que compte cette infra-classe, les espèces du genre *Mola*, communément appelés poissons-lune, constituent une véritable exception. En effet,

le développement (post-embryonnaire) de leur morphologie externe est quasi-isométrique (Phillips et al. 2018). Depuis les plus jeunes stades où l'individu fait quelques millimètres de long jusqu'aux adultes qui peuvent atteindre une taille supérieure à trois mètres, la forme externe de l'individu est quasi-constante, à la dimension près. Si les auteurs de cette revue n'évoquent pas d'hypothèses sur la raison de cette exception, la morphologie très aplatie des poissons-lune pourrait avoir un impact sur la relation entre taille (ici, la longueur de l'individu) et masse, qui pourrait être beaucoup plus proche d'une proportionnalité que pour la plupart des animaux (où la masse (proportionnelle au volume) croît plus vite que la taille, ici la longueur,). Là où des allométries sur les systèmes respiratoires ou circulatoires, ou sur la taille des nageoires permettent de compenser les effets de cette relation masse/taille, nous pouvons émettre l'hypothèse que les pressions de sélections sont moins importantes chez les poissons-lune, entraînant un développement moins allométrique et plus isométrique.

En conclusion de cette sous-partie consacrée à la cooccurrence des phénomènes de changements de forme et de croissance au cours du développement, la Figure 2 présente un schéma-bilan récapitulatif des taxons évoqués sur un diagramme taille/forme au cours du développement. En écho, la Figure 2.G du chapitre I consacré à la nigelle de Damas (*Nigella damascena*) place le pétale de cette dernière dans un graphe équivalent.

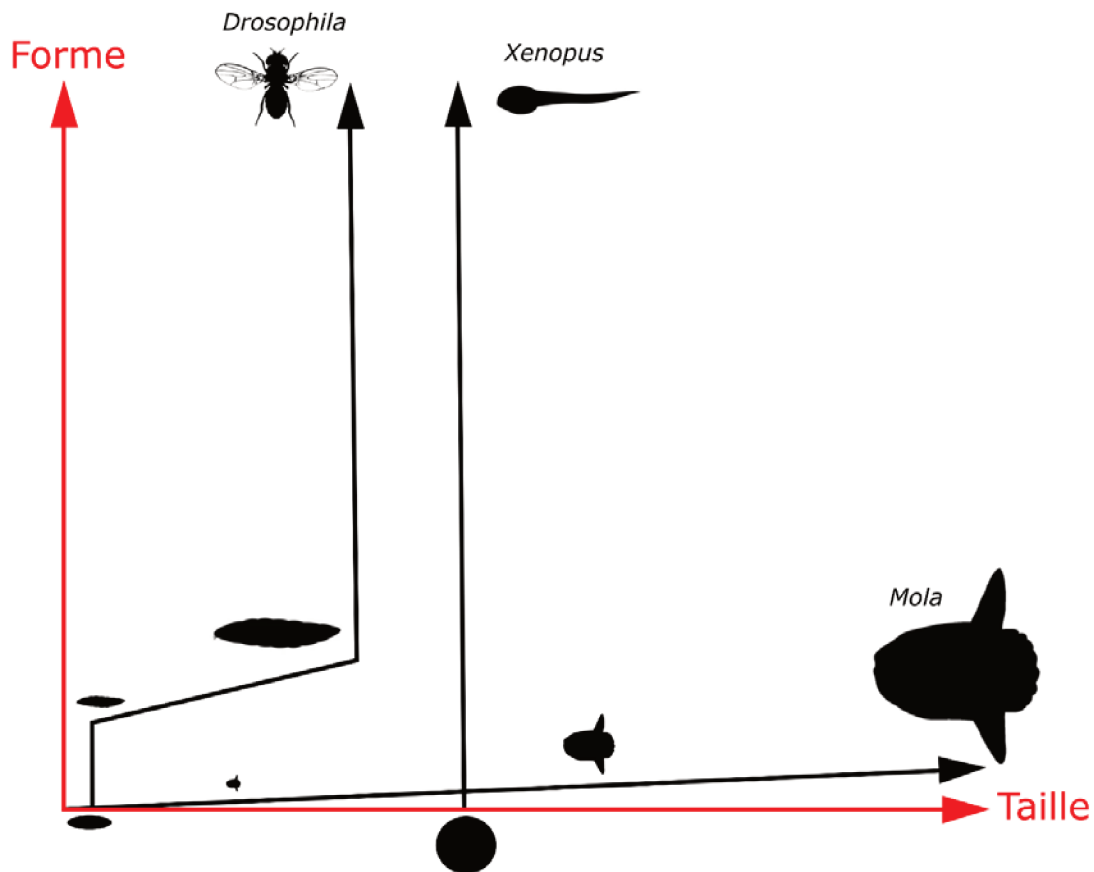


Figure 2 Croissance sans changement de forme et changement de forme sans taille à travers quelques exemples de métazoaires. Les œufs de Drosophila ainsi que sa puppe imposent un développement à volume fixé, à l'instar du développement de Xenopus. Au contraire, les poissons-lune subissent très peu de changements de forme dans leur morphologie externe, alors que la taille de leur corps traverse plusieurs ordres de grandeurs.

Changements de forme, croissance et allométrie

Les liens entre forme et croissance au cours du développement susciteront beaucoup de questionnements en commun avec les problématiques d'allométrie, bien que ces concepts ne soient pas totalement recouvrants.

Le concept d'allométrie, formalisé par Julian Huxley et Georges Tessier en 1936 (Huxley & Tessier, 1936.) puis généralisé depuis (Gayon 2000), décrit comment un trait varie avec la taille (dans son acception la plus courante, la taille de l'individu, mais c'est aussi souvent sa masse). Ce trait peut être lui-même morphométrique, par exemple la taille d'un organe particulier, mais

cela peut être aussi n'importe quelle autre caractéristique biologique quantifiable (une concentration d'un composé biochimique, une espérance de vie, un comportement).

Cette variation peut être considérée à trois niveaux (Klingenberg 2016): entre individus d'une même population ou espèce, entre taxons différents et enfin entre stades développementaux différents. En d'autres mots pour ce dernier niveau, comment un trait quantitatif varie avec la taille au cours du développement. Ce dernier cas est celui qui va nous intéresser dans le cadre de cette étude, et le trait en question est la forme du pétale de *Nigella damascena*, que l'on comparera à la taille du pétale (en l'occurrence la taille du centroïde qui est le proxy utilisé dans l'étude de morphométrie géométrique).

On dit qu'il y a relation allométrique quand la relation entre le trait en question et la taille approche une loi mathématique simple, dans le cas le plus courant quand $\log(\text{trait } 1)$ et $\log(\text{taille})$ est linéarisé, donc quand le trait et la taille sont liés par une loi de puissance :

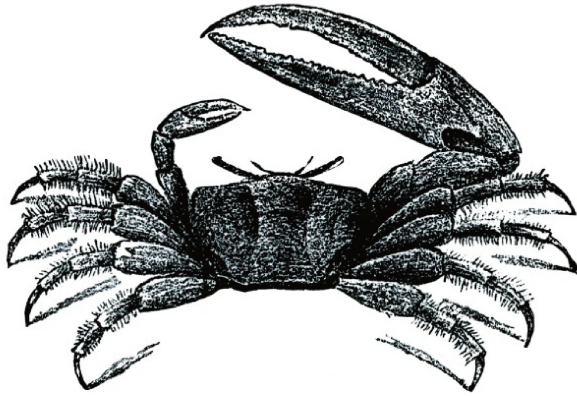
$$\text{trait } 1 = A \times \text{taille}^\alpha$$

Où α est appelé le coefficient d'allométrie.

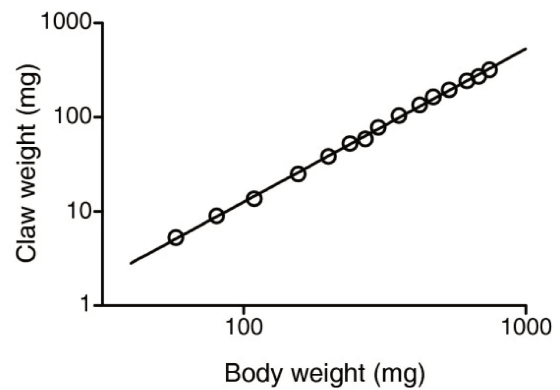
Dans les très rares cas où α est égal à 0, on parle d'isométrie, le trait et la taille sont proportionnels. On obtiendrait cette relation avec n'importe quel trait participant à la morphologie externe des poissons-lune évoqués plus haut, par exemple la taille de la nageoire dorsale, que l'on comparerait avec la taille de l'individu (sa longueur).

De très nombreux exemples de relations allométriques existent chez les êtres vivants au cours de leur développement, depuis l'exemple historique de la pince du crabe violoniste (*Minuca pugnax*, S. I. Smith, 1870) étudié par Huxley (Huxley 1924, Figure 3) jusqu'à l'allométrie générant une différenciation entre étamines et pétales à partir de primordia morphologiquement très proches (avec l'exemple de la nigelle, Greyson and Sawhney 1972)

(a)



(b)



*Figure 3 Allométrie durant la formation de la pince de **Minuca pugnax**, dont l'étude par Julian Huxley a abouti à la première formalisation du concept d'allométrie avec Georges Tessier (source : Stevens, C.F. Darwin and Huxley revisited: the origin of allometry. J Biol 8, 14 (2009). <https://doi.org/10.1186/jbiol119>)*

Nous verrons au cours du chapitre 1 que l'étude de l'évolution de la forme du pétale de nigelle de Damas par rapport à sa taille peut être considérée comme une recherche d'une loi d'allométrie entre ces deux traits. Nous verrons également que forme et taille du pétale de nigelle semblent bien liés par une loi d'allométrie, potentiellement de type exponentiel, bien qu'un échantillonnage beaucoup plus important soit nécessaire pour déterminer précisément sa nature. Il n'est pas totalement exclu que ces deux caractères soient liés par une relation allométrique plus classique, de type loi de puissance.

À l'instar du principe de la morphométrie géométrique qui nécessite des points de repère homologues pour suivre une forme au cours du développement, les analyses d'allométrie supposent de pouvoir suivre un trait particulier pendant le développement. Or, la morphogenèse d'un organisme ne se limite pas à des formes préexistantes qui subissent ou non des modifications géométriques aboutissant à la forme finale. Des formes peuvent apparaître (voire disparaître),

à l'instar des motifs des patrons de colorations de Turing évoqués au chapitre 2, ou des pseudo-nectaires du pétale de nigelle, absents au début du développement. De fait, ces productions de forme sortent ainsi du champ de l'allométrie et de la morphométrie géométrique, ou du moins obligent à restreindre l'étude aux intervalles où les homologues sont applicables.

Le pétale de *Nigella* (Ranunculaceae), un modèle d'étude pour la formation d'organes élaborés

Les Ranunculaceae et les innovations évolutives de leurs pétales

Les structures stériles de la fleur d'angiosperme sont une cible privilégiée de l'évolution, qui se traduit par une extraordinaire diversité de formes, de tailles et de couleurs. Parmi les Ranunculaceae -qui ne font pas exception-, de nombreuses espèces portent des innovations morphologiques sur leurs pétales.

La zygomorphie par exemple, qui est la particularité d'une fleur à posséder une symétrie bilatérale, a été acquise indépendamment à de nombreuses reprises dans l'évolution des angiospermes. Elle est présente chez les fleurs de la tribu des Delphinieae, où elle est portée par les pétales et les sépales. Chez ces espèces, qui sont les seules Ranunculaceae zygomorphes, seuls les pétales dorsaux et/ou médio-dorsaux se développent complètement tandis que les autres ont une croissance retardée et un développement avorté (Jabbour et al. 2009, Figure 4).

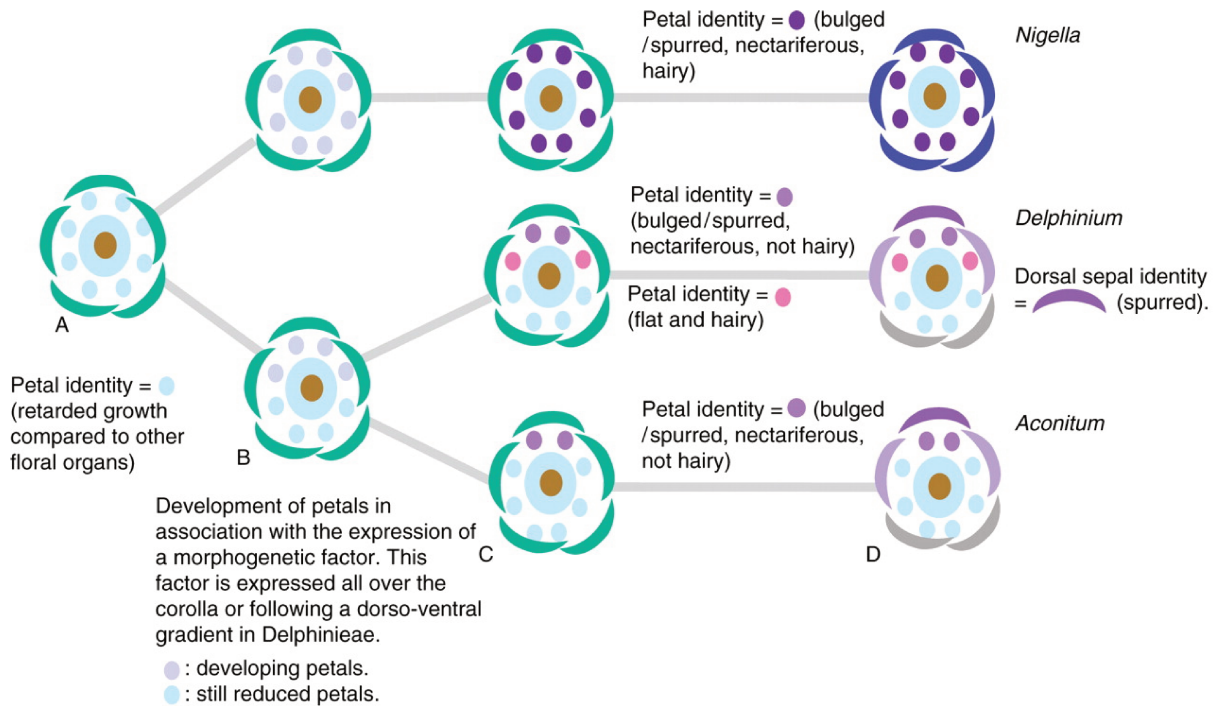


Figure 4 Evolution de la zygomorphie chez les Ranunculaceae. Elle est présente chez plusieurs clades dont **Delphinium** et **Aconitum**. Les pétales ainsi que les sépales portent la symétrie bilatérale par leur spécialisation (teintes pleines) et/ou leur réduction (teintes pastel) (source : Jabbour, Ronse De Craene, Nadot, Damerval (2009) Establishment of zygomorphy on an ontogenic spiral and evolution of perianth in the tribe Delphinieae (Ranunculaceae), Annals of Botany, 104: 809 – 822, <https://doi.org/10.1093/aob/mcp162>).

La protéine APETALA3-III (AP3-III, résultant de l'expression du gène de la fonction B AP3-3) est fortement associée à l'identité des pétales chez les Ranunculaceae (Jabbour et al. 2014), et de plus elle semble être asymétrique dans le périanthe (différence d'expression entre sépales/pétales dorsaux et ventraux). Est-ce la source des signaux morphogénétiques qui régissent l'asymétrie ou seulement une réponse/conséquence ?

Le pétale, dont la présence ou l'absence est à l'origine de deux morphes naturels chez

Nigella damascena, et son identité.

L'un des exemples les plus significatifs des structures élaborées des Ranunculaceae est le pétale de *Nigella damascena*, qui réalise la fonction biologique d'urne à nectar. La nigelle de Damas (*Nigella damascena* L.) appartient à la famille des Ranunculaceae et à l'ordre des Ranunculales, groupe frère de toutes les autres Eudicotylédones (The Angiosperm Phylogeny Group 2016, Figure 5).



Figure 5 Les Ranunculales (core Ranunculales auxquels s'ajoutent Papaveraceae et Eupteleaceae) sont le groupe frère de toutes les autres eudicots (source : Damerval and Becker 2017)

Des traits à la fois ancestraux et dérivés sont présents chez les espèces de cet ordre (Jabbour et al. 2009). *Nigella damascena* présente deux morphes naturels qui possèdent des pétales et des sépales (morphe P), ou seulement des sépales (morphe T). Le morphe T s'est probablement propagé par sélection artificielle à partir de multiples sources, grâce à l'intérêt esthétique que ses sépales supplémentaires lui confèrent (Jabbour et al. 2021, Figure 6).

Le morphe P quant à lui possède donc des pétales, entre 7 et 10 par fleur, le plus souvent 8, insérés en spirale à pas très réduit (*i.e.* avec des plastochrones courts), donnant l'impression à l'échelle macroscopique que les pétales sont insérés sur un unique verticille. Les pétales de *N. damascena* sont de taille réduite par rapport à la fleur (environ 5 mm de hauteur, pédoncule compris, contre 5 cm de diamètre pour la fleur, une dizaine de centimètres de largeur en comptant les bractées). Bien que plus sombres que les sépales, les pétales matures possèdent

une teinte violette conférée par des flavonoïdes (Tanikawa, Honma, and Tatsuzawa 2019). Jabbour et al. ont décrit précisément le développement différentiel de ces morphes en comparant le moment d'apparition des différents organes, et en définissant six stades de développement. Ces étapes ont été calibrées de manière absolue (temps écoulé après le début de l'allongement de la tige) et également de manière relative (liée à la hauteur de la tige en allongement) (Jabbour et al. 2015).

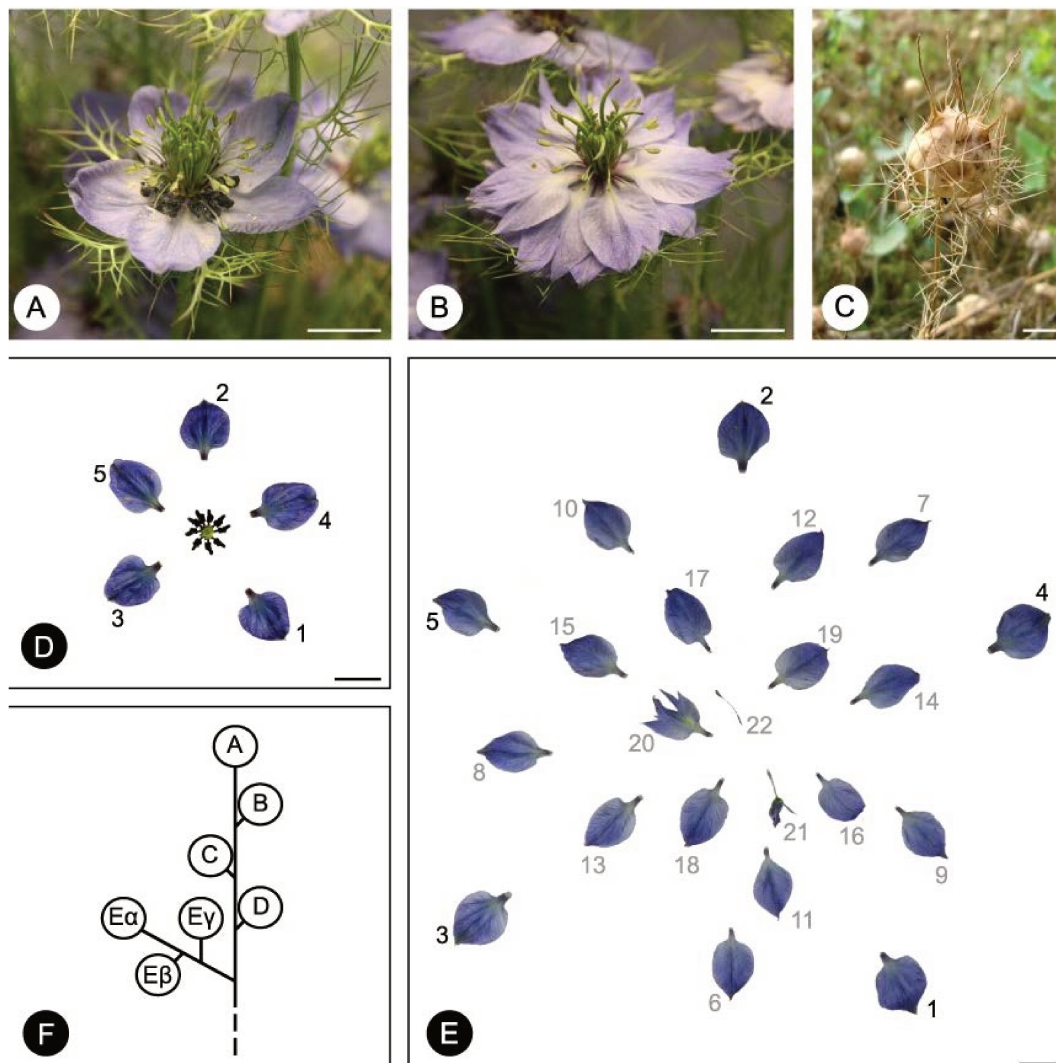


Figure 6 Dimorphisme de la fleur de Nigella damascena. A, D: morphe P (avec pétales). B, E : morphe T (sans pétales) (source : Jabbour et al. (2015) Flower development schedule and AGAMOUS-like gene expression patterns in two morphs of Nigella damascena (Ranunculaceae) differing in floral architecture, Botanical Journal of the Linnean Society, 178: 608–619, <https://doi.org/10.1111/boj.12297>).

Des études génétiques ont été réalisées pour trouver l'origine de ce dimorphisme et il semble qu'une insertion de MITE dans le locus *NdAP3-3* soit responsable du phénotype sepal-like pour au moins une partie des morphes T. En effet, *AP3-3* est seulement exprimé dans le morphe P et absent dans le morphe T, résultant en une extension du domaine d'expression d'*AGAMOUS1* & *AG2*. Des expériences d'hybridation in situ ont quant à elles révélé une expression de *AP3-3* spécifiquement dans les futurs pétales et l'inactivation par « Virus Induced Gene Silencing » de ce gène chez des lignées de morphe P engendre des phénotypes très semblables au morphe T, suggérant son importance dans l'identité pétale chez *N. damascena* (Gonçalves et al. 2013). Une autre étude a démontré la complexité de la notion d'identité pétale et sépale chez les fleurs de *N. damascena*. En effet, chez les morphes T, qui montrent des organes ressemblant à des sépales à la place des pétales, un examen plus attentif de la vascularisation révèle que chez ces organes sepal-like, les motifs vasculaires sont les mêmes que les pétales, bien qu'ayant la morphologie externe d'un sépale (Derooin et al. 2015).

Chez les espèces portant des pétales, les primordia des sépales et des pétales sont différents en termes de taille et de forme. En revanche, les primordia des étamines et des pétales sont indiscernables morphologiquement, ce qui a donné naissance à l'hypothèse de l'origine staminodiale des pétales (andropétales) chez les Ranunculaceae. En d'autres termes, les pétales sont considérés comme le verticille externe de l'androcée, c'est-à-dire des staminodes hétérotopiques (Ronse De Craene and Brockington 2013). Des hypothèses plus récentes basées sur des études génétiques suggèrent au contraire que les pétales ne sont pas des staminodes dérivés, mais des structures qui répondent aux mêmes gradients d'expression génique, avec des seuils différents induisant une morphogénèse différente (Meaders et al. 2020).

Les nombreux domaines composant le pétale de Nigella damascena, leur anatomie, leur formation et les gènes sous-tendant leur formation.

Comme d'autres espèces du genre *Nigella*, le pétale de *N. damascena* possède des pseudonectaires, nom sibyllin qui désigne des structures enflées, à la surface brillante, jouant le rôle d'attracteur visuel pour les pollinisateurs. Ils ornent la base de chacun des deux lobes portés par la lèvre inférieure du pétale (Figure 7). Cette dernière, en position dorsale, insérée sur le pédoncule, est légèrement incurvée et constitue le fond d'une urne à nectar, fermée par la lèvre supérieure, située quant à elle en position ventrale. Des poils garnissent la partie ventrale des lobes, juste au-dessus des pseudonectaires, ainsi que l'entrée de l'urne à nectar.

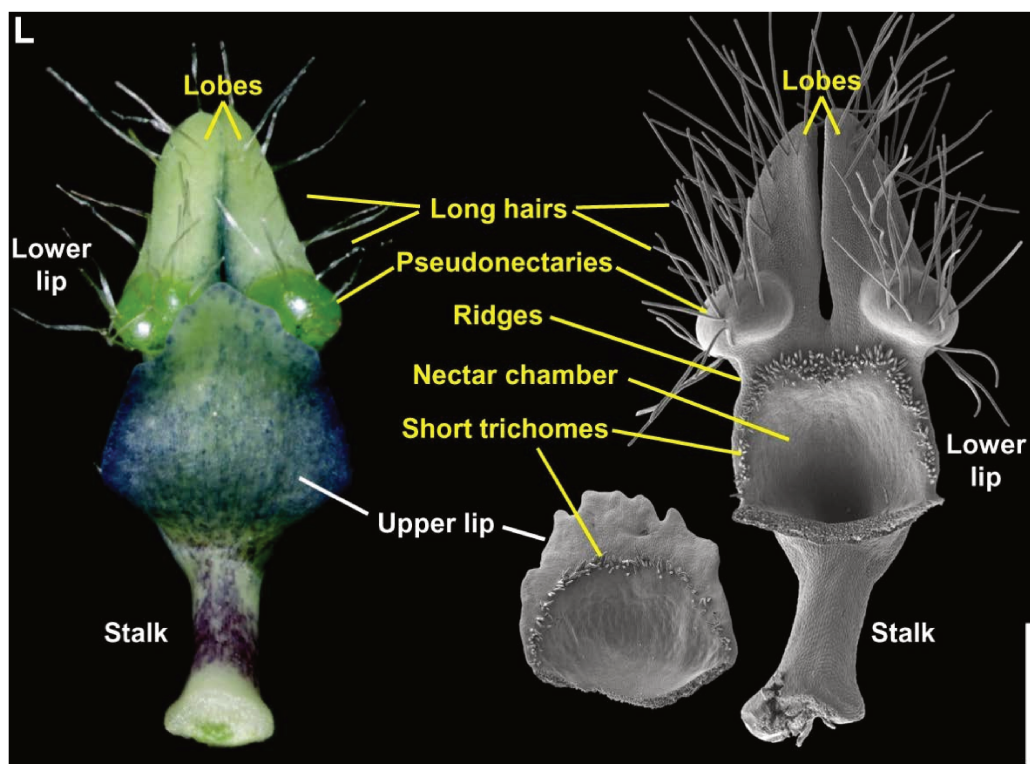


Figure 7 *Morphologie du pétale de Nigella damascena*. Lobes : lobes, Lower lip : lèvre inférieure, Upper lip : lèvre supérieure, Long hairs : longs poils, Short trichomes : trichomes courts, Pseudonectaries : pseudonectaires, Ridges : crêtes séparant lobes et urne à nectar, Nectar chamber : urne à nectar, Stalk : pédoncule du pétale. (source : Zhang et al. (2020) *Identification of the key regulatory genes involved in elaborate petal development and specialized character formation in Nigella damascena (Ranunculaceae)*, The Plant Cell, 32: 3095–3112, <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00330>)

Toutes ces caractéristiques permettent au pétale d'assurer une fonction nectarifère permettant d'attirer les insectes visiteurs (Liao et al. 2020). La position des pétales à la base des étamines favorise le contact entre pollinisateurs et pollen, permettant l'allofécondation (Figure 8).



Figure 8 La fonction d'urne à nectar et sa position dans la fleur permettent au pétale de Nigella damascena d'attirer les pollinisateurs, et de mettre en contact étamines et visiteurs, ce qui favorise l'allofécondation. (source : Liao et al. (2020) The morphology, molecular development and ecological function of pseudonectaries on Nigella damascena (Ranunculaceae) petals. Nat Commun 11: 1777. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15658-2>)

Cette complexité du pétale, notamment portée par une forme élaborée en trois dimensions est partagée par de nombreuses espèces du genre *Nigella* (Yao et al. 2019). Le gène *NidaYABBY5*, dont l'expression est ectopique chez les pseudonectaires et dont le knockdown entraîne une

disparition complète des pseudonectaires, est indispensable à leur développement (Liao et al. 2020).

D'autres domaines du pétale de *N. damascena* ont fait l'objet d'une recherche extensive des bases génétiques concourant à leur formation (Zhang et al. 2020). En particulier, les auteurs mettent en évidence le rôle important du gène *LATE MERISTEM IDENTITY1* (*NidaLM11*) codant pour un facteur de transcription de classe I à homéodomaine - leucine zipper, dont l'expression contrôle la formation des courts poils (trichomes) de l'entrée de l'urne à nectar, ainsi que la séparation de la partie supérieure de la lèvre inférieure en deux lobes.

Les patrons de couleurs répétés des tissus externes des Eucaryotes, des traits concourant à de nombreuses fonctions biologiques cruciales

Pigmentation, couleurs structurales, bioluminescence et fluorescence sont les quatre familles de coloration présentes chez les Eucaryotes

Les Eucaryotes présentent une grande variété de couleurs et de formes sur leurs tissus externes, dont les motifs répétés forment une sous-catégorie. Quatre grandes manières bio-physico-chimiques ont été retenues au cours de l'évolution pour produire de la couleur : les pigments, les couleurs physiques, la fluorescence et la bioluminescence (Cuthill et al. 2017), qui parfois coexistent chez une espèce donnée (Shawkey, Morehouse, and Vukusic 2009).

Les pigments, avec la coloration structurale, sont la manière la plus courante de produire des couleurs chez les Eucaryotes. La quasi-totalité du spectre de la lumière visible au sens large est couverte, proche UV et infrarouge inclus, soit de 400 à 800 nm. Certaines familles de pigments sont quasi universelles, comme les mélanines (Verdes et al. 2015), d'autres au contraire sont spécifiques à certains taxons, comme les ommochromes des protostomiens (Figon and Casas 2019). Les pigments sont des biomolécules qui restituent une couleur par une absorption sélective de la lumière ambiante (Figure 9).

Biological Family	Chemical Family	Synthesis pathway and precursors	Colors
Melanins^a	Polymers of dopamin (dopamin melanin), DOPA (DOPA melanin) or cysteinyl DOPA (pheomelanin)	Oxidization and polymerization of tyrosine amino acid	
Ommochromes^a	Derivatives of tryptophan amino acid	End metabolism of tryptophan	
Papiliochromes^a	Polymers of kynurenin and NBAD	NBAD is a derivative of tyrosin and β -alanin, kynurenin is a metabolite of tryptophan	
Anthraquinones^a	Polyketids	Polyketids pathway (precursors: dythranol and chrysarobin in <i>Galerucinae</i> leaf beetles)	
Aphins^a	Polycyclic quinones	Polyketids pathway	
Pterins^a	Derivatives of GTP	Metabolites of GTP	
Derivatives of tetrapyrroles^a	Tetrapyrroles	Precursors: glycin, pyridoxal phosphate and succinyl coA	
Carotenoids^b	Tetraterpenoids	Isoprenoid pathway (<i>in Planta</i>)	
Flavonoids^b	Polyphenols	Precursor: phenylalanin (<i>in Planta</i>)	

^aPigments synthesized by the insect (ranked from most ubiquitous to less ubiquitous).
^bPigments synthesized by another organism (plant) and reallocate by the insect.



*Figure 9 Pigments biologiques avec l'exemple des insectes. Tableau : diversité des familles de pigments produits par les insectes et couleurs associées. Photos : Pigments noirs (eumélanine) chez *Uroblaps prodigia* (Motchoulski, 1860), grande diversité de pigments sur l'aile de *Graellsia isabellae* (Graëlls, 1849), pigments bleus d'origine végétale utilisés par un papillon du genre *Polyommatus* (Latreille, 1804). Source : Pierre Galipot, *Color mechanisms in Insects*, unpublished.*

La coloration structurale ou physique est le deuxième moyen principal retenu au cours de l'évolution des Eucaryotes. Elle est basée sur la capacité de structures nano- ou microscopiques à interférer avec la lumière par différents mécanismes comme la diffraction, la diffusion ou les interférences lumineuses (Kinoshita 2008, Figure 10).

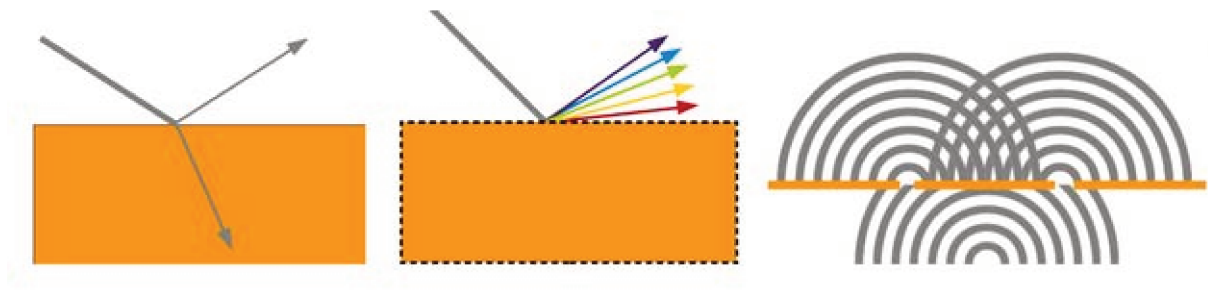


Figure 10 *Phénomènes optiques à l'origine des couleurs structurales des êtres vivants. De gauche à droite : diffusion de la lumière, diffraction de la lumière, interférences lumineuses.*

Source : Pierre Galipot, *Color mechanisms in Insects*, unpublished.

Des effets spécifiques aux couleurs structurales existent, comme l'irisation (changement de la couleur en fonction de l'angle de vue entre l'observateur et la structure émettant la teinte, Figure 11).

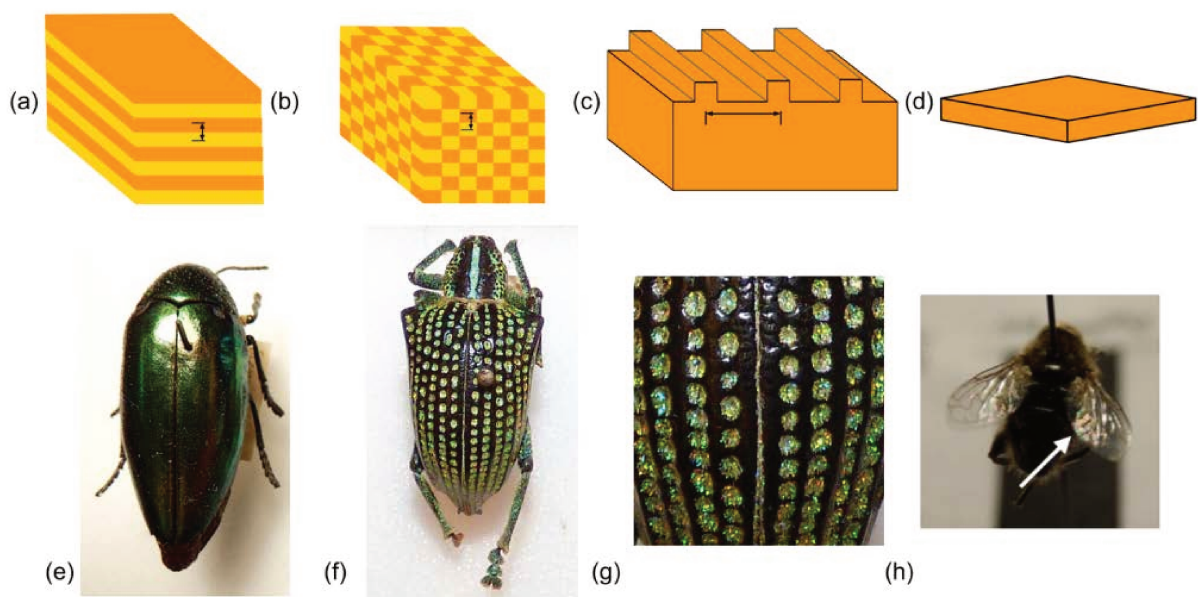
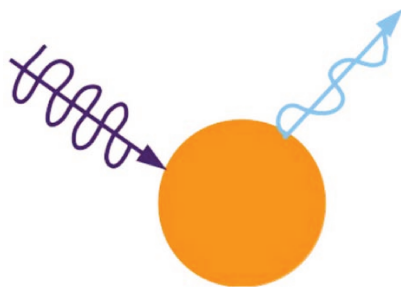


Figure 11 *Couleurs structurales, avec l'exemple des insectes. (a) et (e), réflecteur multicouche régulier chez le genre Sternocera (Eschscholtz, 1829). (b), (f) et (g), cristal photonique à trois dimensions chez Entimus imperialis (Forster, 1771). (c) Réseau de diffraction de type arêtes parallèles. (d) et (h), Patron d'interférence d'aile (WIP) chez un diptère. Source : Pierre Galipot, *Color mechanisms in Insects*, unpublished.*

Comme la couleur provient de l'organisation des molécules plutôt que leur composition chimique, les couleurs structurales sont en général plus résistantes à la dégradation chimique ou à une exposition prolongée à la lumière (Berthier 2007). Certaines longueurs d'onde, difficilement reproductibles par des pigments biologiques, sont l'apanage des colorations structurales. Par exemple, la couleur bleue chez les animaux est tout le temps d'origine structurale ou pigmentaire mais prélevée à des végétaux par herbivorie (voir figure 9, (Hendry 1996)).

Enfin, la bioluminescence et la fluorescence, bien qu'étant deux processus de coloration radicalement différents, sont tous deux des formes de luminescence, c'est-à-dire que de la lumière originale est produite, en termes de longueur d'onde. La lumière est produite lors d'une réaction enzymatique pour la bioluminescence (Hastings 1996), et après absorption d'une autre lumière pour la fluorescence (Macel et al. 2020, Figure 12).



*Figure 12 **Fluorescence** : réémission de lumière à une longueur d'onde plus importante que la longueur d'onde émise. Source : Pierre Galipot, Color mechanisms in Insects, unpublished.*

Plutôt rare chez les organismes aériens, bien que présente chez des espèces d'Insectes dont les vers luisants et les lucioles (Viviani 2002, Figure 13), et chez certains champignons (Purtov et al. 2015), la bioluminescence est bien plus fréquente en milieu marin, chez de très nombreux clades d'Eucaryotes, mais aussi d'Eubactéries et d'Archées (Haddock, Moline, and Case 2010).

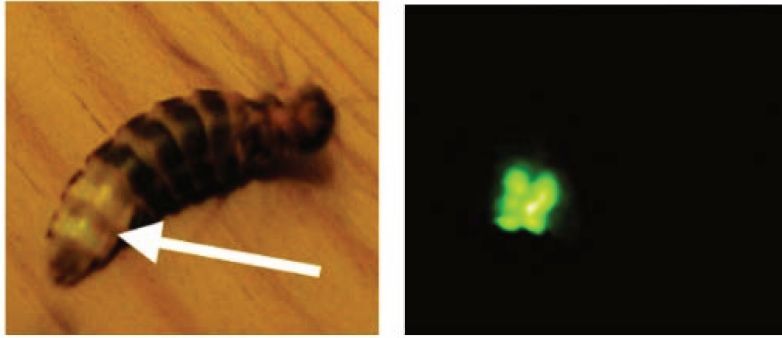


Figure 13 Bioluminescence chez le ver luisant (Lampyris noctiluca) : création de lumière à partir d'une réaction enzymatique. Source : Pierre Galipot, Color mechanisms in Insects, unpublished.

Le principal avantage de la bioluminescence par rapport aux trois autres familles de production de coloration est la production de lumière, -là où les autres utilisent la lumière ambiante-, permettant aux organismes d'être visibles en milieux sombres (eaux profondes, grottes et la nuit (Takenaka, Yamaguchi, and Shigeri 2017, Thompson and Rees 1995). Elle permet également et de manière inattendue de se rendre invisible, chez certaines espèces marines (Widder 2002) en compensant l'ombre chinoise que produit l'organisme en se situant entre l'observateur et la source de lumière, en l'occurrence le soleil ou la lune.

La production d'au moins deux colorations différentes, exprimées dans des zones distinctes du tissu externe, à l'origine des patrons de coloration répétés des Eucaryotes

Lorsque plusieurs couleurs coexistent sur un tissu externe d'un organisme, on parle de motif de couleur, et quand ceux-ci sont répétés un plus ou moins grand nombre de fois, cela constitue un patron de couleur répété. Cette répétition permet des fonctions biologiques non accessibles aux colorations unies ou permet d'en améliorer les effets (comme par exemple pour le camouflage, Troscianko, Skelhorn, and Stevens 2017). Présents chez de très nombreuses espèces d'Eucaryotes (Figure 14), les motifs de couleurs répétés ont intéressé assez tôt les

biologistes, bien que les premières études concluantes sur leur formation ne datent que des années 1950 avec Alan Turing (Turing 1952) et Barbara McClintock (McClintock 1950).

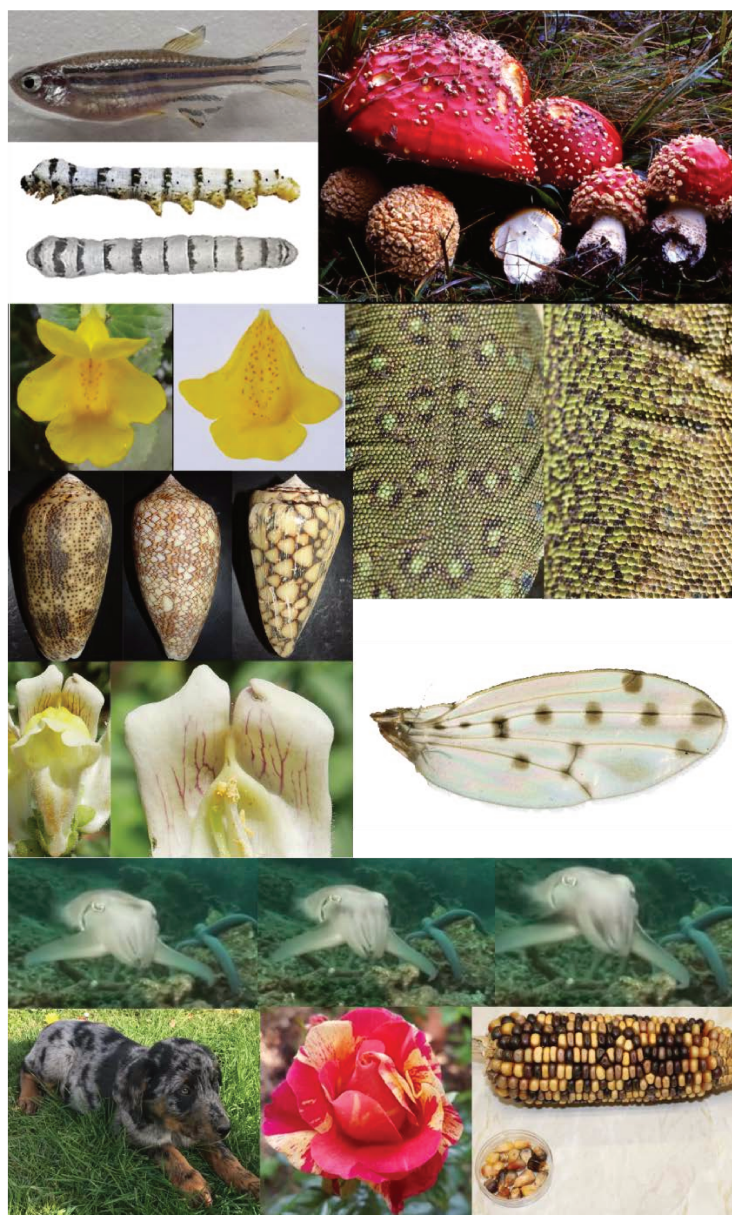


Figure 14 *Diversité des patrons de couleur répétés des Eucaryotes*. Adapté de : Galipot, Damerval, Jabbour (2021). *The seven ways eukaryotes produce repeated colour motifs on external tissues*. *Biological Reviews*. 96. Doi: 10.1111/brv.12720, à l'exception des trois photographies séquentielles de rayures mouvantes de céphalopodes (avant dernière ligne), adapté de : How, Martin et al. (2017) "Dynamic Skin Patterns in Cephalopods." *Frontiers in Physiology* 8: 393. doi:10.3389/fphys.2017.00393.

Les motifs colorés répétés ornent les tissus externes de nombreuses espèces, comme les rayures noires et blanches des zèbres, les craquelures rouges et blanches du chapeau de l'amanite tue-mouches (*Amanita muscaria*) ou les taches foncées des feuilles de l'arum tacheté (*Arum maculatum* L.). S'ils ne sont pas les seuls tissus à être colorés, des tissus internes comme le tissu sanguin pouvant également arborer des couleurs très intenses (Bonaventura and Bonaventura 1983), ils sont néanmoins la principale interface visible que les Eucaryotes présentent vers l'extérieur. En conséquence, ces tissus et leurs ornements peuvent être soumis à une multitude de pressions de sélection (Figure 15), et jouer des rôles de communication comme la reconnaissance du partenaire, l'aposématisme (signal de toxicité, exemple : Elias 2019), le mimétisme ou le camouflage (Smith and Ruxton 2020). À cela s'ajoutent la régulation thermique et la protection thermique aux UV (exemple : Stuart-Fox and Moussalli 2009).















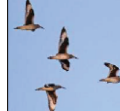
	Aposematism	Crypsis	Sexual selection	Physiological constraints	Social selection
Aposematism					
Crypsis					
Sexual selection					
Physiological constraints					
Social selection					

Figure 15 Diversité des fonctions biologiques des patrons de couleur des métazoaires. Source : (Cuthill et al. 2017). Aposematism : aposématisme, Crypsis : camouflage, Sexual selection : sélection sexuelle, Physiological constraints : contraintes physiologiques, Social selection : sélection sociale.

Bien qu'aucune tentative de recensement n'ait été effectuée à grande échelle, il est vraisemblable que des centaines de milliers d'espèces d'Eucaryotes arborent des motifs de couleur répétés, répartis dans les trois grands groupes pluricellulaires que sont les plantes (*Plantae*), les mycètes (*Fungi*) et les animaux (*Metazoa*). Néanmoins, si ce nombre d'espèces est potentiellement très élevé, il est possible qu'un nombre limité de familles de mécanismes puisse être à l'origine de cette grande diversité. L'objectif de l'article de revue présenté au chapitre II était de réaliser le recensement exhaustif (à partir de la littérature scientifique) des mécanismes de production de patrons de couleurs répétés chez les Eucaryotes, et de proposer une classification en familles, en l'occurrence au nombre de sept. Cette revue et la classification qu'elle présente ont de multiples buts dont le premier est de rassembler et de confronter des études faites sur des taxons très éloignés, concernant aussi bien les métazoaires que les végétaux ou les mycètes. Peu perméables entre elles, les différentes chapelles ont rarement abouti à des dialogues inter-« disciplinaires » alors même qu'elles s'intéressaient à des processus communs. La conséquence directe de la classification des mécanismes de production de patrons de couleurs répétés chez des organismes phylogénétiquement éloignés a été la mise en évidence de nombreuses convergences évolutives. Le deuxième objectif de cette classification était de questionner le nombre de familles de mécanismes différentes produisant des patrons de couleur répétés. Est-il élevé ou réduit, et qu'est-ce que cela dit de l'évolution des patrons de couleur répétés ? Enfin, le troisième objectif d'une telle classification qui se veut exhaustive par rapport à la littérature scientifique est de guider les futures recherches, en suggérant d'abord des voies pour découvrir de nouveaux types de familles de mécanismes. La plupart des familles de mécanismes de production de répétition présentées dans la revue ont également des rôles morphogénétiques hors du champ de la coloration, comme les mécanismes de Turing qui sont à l'origine de structures comme la forme du palais (Economou et al. 2012), la formation des doigts (Sheth et al. 2012) ou la réticulation du xylème (Nagashima et al. 2018). Une meilleure connaissance des mécanismes de formation de patrons de couleurs répétés peut donc inspirer des recherches au-delà du champ de la biologie de la coloration. Inversement, les exemples

connus de production de patrons répétés, mais non colorés, sont évidemment une source prometteuse de découvertes de nouvelles familles de patrons de coloration répétés.

Le pétale de *Nigella damascena* et les patrons de couleur répétés, des modèles complémentaires pour éclairer les relations entre forme et croissance au cours du développement

Bien que relativement éloignés d'un point de vue morphologique, les deux objets d'étude réunis dans ce manuscrit permettront de mettre en valeur des facettes complémentaires des liens entre croissance et changements de forme au cours du développement. Nous allons à présent présenter les principales problématiques auxquelles les deux études tenteront de répondre, dans ce cadre d'étude des liens entre forme et taille.

Les problématiques soulevées par l'étude du pétale de *Nigella damascena*

Tout d'abord, cette étude au chapitre 1 tentera de répondre à la problématique de la présence ou non d'un lien mathématique entre dynamique de la forme et dynamique de la taille :

- Quelle est la nature du lien entre variation de la taille (macroscopique) et variation de la forme (macroscopique) pendant le développement du pétale de la nigelle de Damas ? Ces deux traits sont-ils liés par une relation d'allométrie, et si oui quelle forme mathématique prend-elle ? Ce lien se retrouve-il chez d'autres organes, chez d'autres espèces de plantes, voire d'autres eucaryotes ?

Une fois qu'un tel lien entre ces deux caractéristiques macroscopiques est mis au jour, la question de son origine est posée. Forme et taille du pétale étant directement déterminées par le nombre, la taille, et l'arrangement des cellules composant l'épiderme (ou tout du moins la face qu'elles exhibent sur la face externe), l'étude de caractéristiques cellulaires au cours du développement peut permettre d'éclairer les mécanismes microscopiques qui en sont à l'origine.

Les frontières cellulaires étant visibles sur les clichés de MEB ayant servi à l'analyse de morphométrie géométrique, en particulier pour la face dorsale où peu de recouvrements ont lieu entre domaines (contrairement à la face ventrale où la languette recouvre et cache progressivement la lèvre inférieure), les clichés de MEB sont donc un support de choix pour étudier le lien entre caractéristiques cellulaires et macroscopiques, et permettre de répondre aux problématiques suivantes :

- Quels sont les dynamiques de la prolifération cellulaire et de l'expansion cellulaire au cours du développement de la partie dorsale du pétale de *Nigella damascena* ? Quels sont leurs rôles respectifs dans les changements de forme que connaît le pétale au cours du développement ? Quels sont les liens micro-macroscopiques qui peuvent être effectués à partir de cette étude ?
- Que suggèrent ces résultats sur le contrôle de la forme et de la taille au cours du développement ? Ces tendances se retrouvent-elles chez d'autres espèces, notamment de végétaux, et dans la morphogénèse de leurs pétales ?

Les problématiques soulevées par l'étude des mécanismes de formation des patrons de couleur répétés

La première étape sera d'évaluer l'importance de la croissance dans la formation de ces formes particulières que sont les motifs de couleurs répétés, la croissance ayant été relativement peu étudiée dans ce contexte morphogénétique. Les principales problématiques abordées seront les suivantes :

- La croissance peut-elle être un moteur morphogénétique nécessaire à la production de patrons de coloration ? Quelles sont les familles de mécanismes concernées par ce rôle de la croissance et quelle forme prend-il ?
- Quels rôles complémentaires dans l'établissement des phénotypes finaux des patrons de coloration peuvent être joués par la croissance ? Fait-elle partie des modificateurs de

patterns (pattern modifiers) présentés dans la seconde partie de l'article de revue ? Si oui, quelle est la diversité des effets géométriques qu'elle entraîne ?

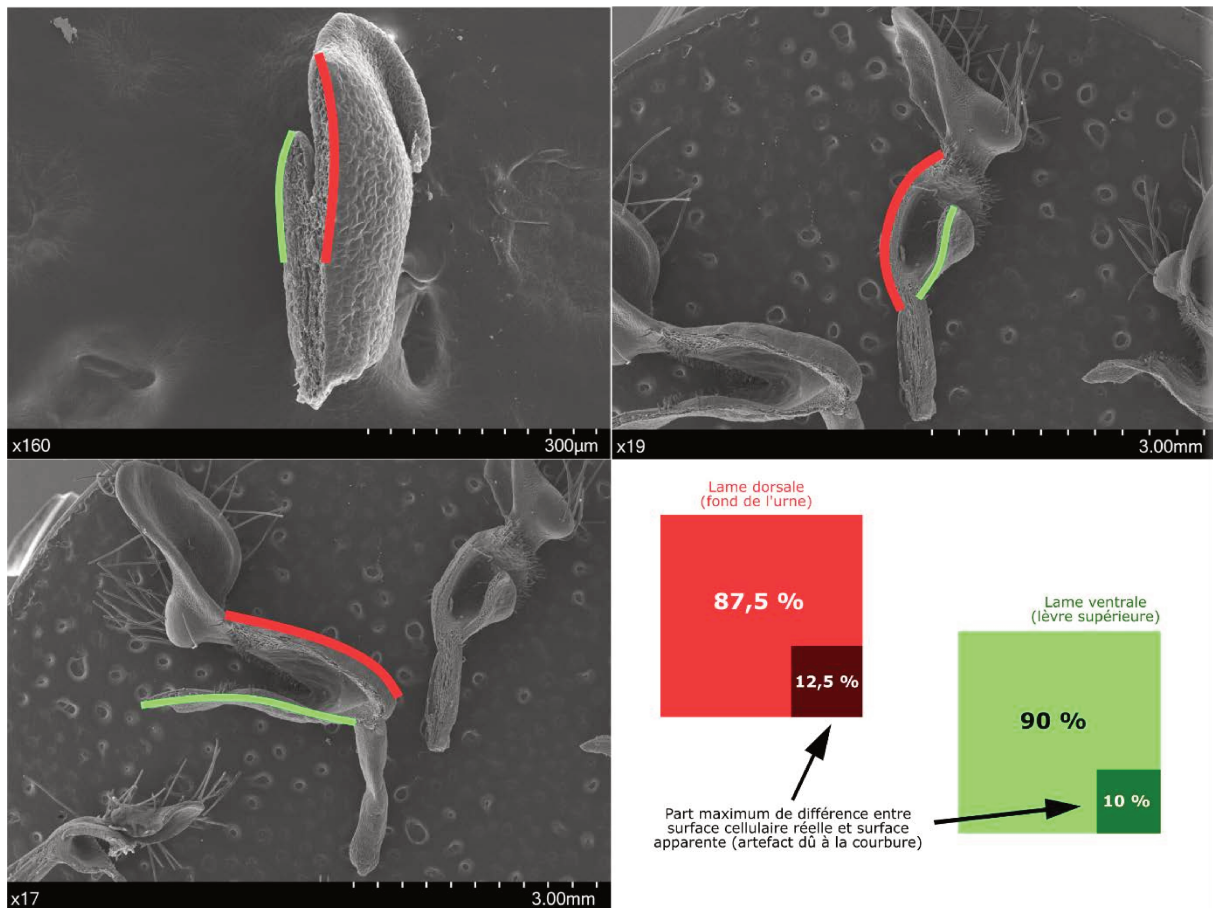
Certaines des problématiques que nous venons d'évoquer seront abordées à nouveau dans la discussion qui suivra les chapitres 1 et 2. En particulier, nous reviendrons sur ce que ces deux études peuvent mettre en exergue plus généralement sur les liens entre taille et forme au cours du développement des êtres vivants.

Chapitre I

Morphométrie géométrique et analyses cellulaires révèlent une relation allométrique entre taille et croissance pendant le développement du pétale de la nigelle de Damas (*Nigella damascena*, Ranunculaceae) et mettent en évidence le rôle morphogénétique de la prolifération cellulaire et le rôle de croissance de l'expansion cellulaire.

Le pétale de la nigelle de Damas, une forme élaborée en trois dimensions, approchée par l'étude de points de repère homologues (landmarks) sur ses contours grâce à la morphométrie géométrique en deux dimensions.

Malgré une architecture élaborée en trois dimensions, évoquée dans l'introduction, le pétale de *Nigella damascena* possède des structures lamellaires peu repliées telles que les lobes (plus précisément l'arête la plus proche du plan de symétrie, voir Figure 6), mais aussi les lèvres supérieures et inférieures, dont les surfaces sont quasiment des plans pendant toute la durée du développement (Figure 16).



*Figure 16 Les lames composant les lèvres du pétale de **Nigella damascena** conservent une forte planéité pendant le développement. De haut en bas et de gauche à droite, coupe sagittale de stades juvénile, médium et âgé montrant la courbure relativement peu prononcée des lames composant les lèvres supérieures et inférieures. En bas à droite, calcul de la part maximum (stades intermédiaires) de la différence de surface cellulaire expliquée par la courbure du tissu (artefact), qui est largement inférieure en ordre de grandeur aux différences de surface cellulaires entre différences stades (voir cartes cellulaires du Chapitre 1).*

Ces caractéristiques permettent d'effectuer des analyses de morphométrie géométrique en deux dimensions, à partir de clichés de MEB. La nature de la forme qui fait l'objet de cette étude est le contour du pétale, lui-même simplifié en une série de points de repère (landmarks), homologues entre échantillons et entre stades de développement. Quand une structure manque de points de repère facilement déterminables entre différents échantillons, comme c'est le cas

pour la lèvre supérieure, des semi-landmarks ont été utilisés. L'opérateur capture un maximum du contour de l'objet en déposant une grande quantité de points. Un nombre final de semi-landmarks est ensuite choisi, et ils sont automatiquement déposés à équidistance sur le contour. Dans l'analyse Procrustes qui suit, les semi-landmarks et landmarks sont traités de la même manière. Cette analyse consiste en un alignement des formes en ajustant tous les échantillons à la même échelle et à la même orientation, ce qui permet de comparer uniquement les formes et d'ignorer les différences de taille des échantillons (Klingenberg, Barluenga, and Meyer 2002). Le pétale possédant une symétrie bilatérale, une symétrisation a été réalisée pendant l'analyse Procrustes afin de ne travailler qu'avec la composante symétrique et d'éviter les effets potentiels d'une légère asymétrie gauche-droite que pourrait présenter le pétale.

Quatre angles de vues différents ont été retenus afin de permettre de capturer un nombre satisfaisant d'informations sur la forme élaborée du pétale. Les faces dorsales du pédoncule, de la lèvre inférieure et de ses lobes sont capturées dans la vue dorsale (*dorsal view* dans l'article). Leurs faces ventrales, ainsi que celle de la lèvre supérieure sont quant à elles capturées par la vue ventrale (*ventral view* dans l'article). Une coupe sagittale au niveau du plan de symétrie du pétale a permis de capturer la forme de l'arête centrale des lobes ainsi que les contours de l'urne à nectar, constituée pour rappel de la lèvre supérieure et de la lèvre inférieure (hors lobes). Selon que le pétale est vu directement sur la coupe sagittale, ou posé sur la coupe et vu par l'extérieur, cela constitue deux angles de vue complémentaires (respectivement *medial view* et *lateral view* dans l'article). Le premier permet de capturer la forme de l'intérieur de l'urne, de l'arête du lobe située près du plan de symétrie, ainsi que la forme de la languette au niveau du plan de symétrie.

Grâce aux quatre angles de prise de vue, des estimations des différences entre distances apparentes et distances réelles ont été effectuées, pour évaluer l'erreur due à la projection en 2D d'une forme 3D que constituent des clichés de MEB, en particulier pour les faces ventrales et dorsales (pour les faces latérales et médiales, la coupe sagittale permet de s'assurer que l'on

travaille sur une surface plane). Pour les stades intermédiaires qui sont ceux où la courbure du tissu est la plus importante, une différence maximum de 10 % entre surfaces réelle et apparente (moins de 10 % pour les différences entre distances) ont été calculées, ce qui est à la fois inférieur aux augmentations de surfaces cellulaires constatées au cours du développement, ainsi qu'aux augmentations de distances entre landmarks (points de repères). Cela implique *a minima* que la courbure des lames composant le pétale en trois dimensions et visibles sur les faces ventrale et dorsale ne peut expliquer à elle seule les changements de forme observés lors de l'analyse Procrustes et lors des analyses cellulaires, et qu'elle est vraisemblablement négligeable par rapport au réel changement de forme du pétale. Néanmoins, le choix d'étudier une forme apparente - ici la projection en deux dimensions d'une forme en trois dimensions - ne saurait uniquement être motivé par la facilité d'étude, mais également car la forme apparente a elle-même un sens biologique non négligeable. En effet c'est la forme selon laquelle le pétale se donne à voir aux organismes dotés de la vision, et en premier lieu aux pollinisateurs qui visitent la fleur de nigelle et dont la couleur du pétale et la brillance de ses nectaires facilitent la détection (voir Figure 7). Bien que très souvent dotés d'une vision permettant une estimation du relief, l'information visuelle reçue par les insectes est cette même projection en deux dimensions d'une forme en trois dimensions. Étant donnée l'architecture du pétale, la position de l'entrée de l'urne à nectar et la position du pétale sur la fleur de *N. damascena*, la vue ventrale (*ventral view*) est celle qui s'approche le plus de ce que verrait un pollinisateur qui visite le pétale (Liao et al. 2020, à noter : l'insecte pollinisateur est positionné de façon à voir le pédoncule vers le haut, c'est à dire l'inverse de la convention choisie dans l'article : pédoncule vers le bas).

Micro- and macroscale patterns of petal morphogenesis in Nigella damascena (Ranunculaceae) revealed by geometric morphometrics and cellular analyses

Pierre Galipot^{1,2}, Sylvain Gerber¹, Philippe Andrey³, Martine Le Guilloux², Florian Jabbour¹, Catherine Damerval²

Author affiliations:

¹Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles, CP39, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

²Génétique Quantitative et Evolution-Le Moulon, Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, 91190 Gif-sur-Yvette, France

³Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78000, Versailles, France

Abstract

Nectariferous floral structures exhibit an extraordinary diversity of shapes, sizes and colors. Being involved in pollinator attraction and reward, they are privileged targets of evolution. The corolla of the Ranunculaceae non-model species *Nigella damascena* consists of elaborate nectariferous petals, made of a stalk, upper and lower lips forming a nectar pouch, shiny pseudo-nectaries, and pilose ears. While the main events of petal development are properly described, little is known about the cell characteristics (number, size and anisotropy) of this organ, the pattern of size and shape covariation during development. From the 100 μm -long hemispherical primordium to the 10 mm-long organ having acquired its final shape, petal size goes through two orders of magnitude. Here, we investigate the relationships between morphogenesis and growth of *N. damascena* petal using geometric morphometrics coupled with the study of cell characteristics.

First, we found that petal shape and size are linked by an allometric relation during development, and that their covariation suggests that petal shape dynamics are exponentially slower than growth

We measured cell size, cell number, and cell anisotropy to characterize petal morphogenesis at the cellular level and we highlighted distinct cell populations within the territory corresponding to the nectar pouch.

Finally, we managed to link the microscopic scale (cellular level) with the macroscopic one (whole organ level). In particular, we estimated the relative contributions of cell expansion and cell proliferation to overall petal shape and size dynamics. We found that cell proliferation is the major driver of shape patterning during development, while petal size dynamics is mostly driven by cell expansion.

Our analyses provide a quantitative basis to characterize the relationships among shape, size and cell characteristics during the development of an elaborate structure, the *Nigella damascena* petal. Such studies lay ground for future evo-devo investigations of the large morphological diversity observed in nectariferous structures, in Ranunculaceae and beyond.

Introduction

In the flowers of most angiosperms, sterile structures, collectively called the perianth, surround fertile organs and are organized in two functionally and morphologically differentiated organ types. While the most external organs, the sepals, play a protective role for the developing stamens and carpels, the innermost perianth organs, the petals, generally carry an attractive role for pollinators, based on particular shape, size, color and sometimes fragrance. Elaborate petals as opposed to simple petals have been described in various eudicot groups (Endress and Matthews, 2006). Elaborate petals have evolved a variety of patterns, such as lobes, spurs, and specialized trichomes.

In the early-diverging eudicot family Ranunculaceae, a large diversity of petal forms is found, from simple laminas with a tiny nectariferous scale, as in *Ranunculus*, to highly elaborate nectariferous spurred organs, as in *Aquilegia*. Floral development and to a lesser extent, petal development, were already described qualitatively using classical microscopy techniques (Erbar, Kusma, and Leins 1999, Tucker and Hodges 2005, Jabbour et al. 2009, Ren et al. 2009, Zhao et al. 2011, Jabbour et al. 2015). A detailed investigation of the development of the elaborate petal has been conducted in the genus *Nigella* using histology and micro-CT as imaging techniques (Yao et al. 2019). It has been shown that petal complexity is progressively acquired during development, as different features appear sequentially, giving rise to a petal which comprises a stalk, upper and lower lips, a nectar pouch, lobes, trichomes, and color patterns. Although some of these features are present in all *Nigella* species, others are shared by few species only (Yao et al. 2019). Nevertheless, a precise quantification of petal shape transformation, as well as the covariation of petal shape with petal growth, during development, is still lacking.

From a developmental perspective, petals are lateral organs initiated as groups of cells on the flank of the floral meristem. After polarity establishment, the transitions from the period of cell proliferation to expansion and differentiation in space and time are key to shape acquisition. Shape changes during development because of variation in local growth rates and anisotropy (for review, Whitewoods and Coen 2017). In model species such as *Arabidopsis thaliana* and *Antirrhinum majus*, clonal cell analysis has provided information in the growth processes at play, opening the way to mathematical modeling (Rolland-Lagan, Bangham, and Coen 2003, Sauret-Güeto et al. 2013). When the study species is not amenable to such cell lineage marking, analyses of cell proliferation, cell counting and measurements can give clues about the processes directing shape variation, as demonstrated in the spurred petals of *Aquilegia*, *Centranthus* and *Linaria* (Puzey et al. 2012, Mack and Davis 2015, Cullen, Fernández-Mazuecos, and Glover 2018). Still at a more integrated level, the quantification of allometry during development with geometric morphometric methods provides invaluable information on form transformation (Gerber 2014, Klingenberg 2016), including between species (Strelin et al. 2018).

As in other *Nigella* species, the mature petal of *N. damascena* is composed of several differentiated domains (Fig. 1). These domains may behave differently during development. Their respective contribution to the overall petal shape and size dynamics are still to be described. Shape and size are two characteristics that may theoretically change in an independent manner during development. Nevertheless, they are in fact linked because they are governed by a certain number of common processes (*e.g.* cell proliferation or cell expansion). On the contrary, other processes like cell rearrangements, or particular cases like homogeneous cell expansion may affect only shape or size (respectively). For these reasons, there is no universal rule governing shape and size dynamics during development (Klingenberg 2016).

Here we conducted a geometric morphometric study coupled to cellular investigations to assess the pattern of shape and size variation and covariation during *N. damascena* petal development.

We found that covariation between shape and size is linearized by log transformation of size, suggesting an exponential allometric law between these variables. By repeating the study within several domains of the petal (stalk, nectar pouch) with very varied geometries, we found that this exponential law also turns out to be true at these subscales, suggesting that this exponential relationship is based on very general mechanisms. As cell expansion and cell division are the two main processes that influence petal size and shape, we follow their dynamics during petal development through cell map analysis. We then managed to measure their relative contributions to petal size and shape changes. Focusing on petal dorsal view, corresponding to the lower lip of nectar pouch, we found that cell proliferation is prevalent in the first stages, which correspond to the period when most of the mature shape is achieved. We then found that in late stages cell expansion takes over and control the petal final growth but without leading to major shape changes.

Methods

Scanning electron microscopy

One hundred and twenty-one terminal flower buds were sampled from *Nigella damascena* plants grown in a growth chamber or in a greenhouse, from 8 days after floral transition to preanthetic flowers, for a time period of about three weeks. The sampling was designed to cover petal development after the lag time following petal initiation (Jabbour et al. 2015). Floral buds were fixed in FAA (90% ethanol 70%, 5% formalin, 5% acetic acid), then dissected under a stereoscope (Nikon SMZ 745T). Petals were then dehydrated in an ethanol series (70%, 80%, absolute alcohol) and dried using an Emitech K850 critical-point dryer (Quorum Technologies). Samples were mounted on aluminium stubs with colloidal graphite, sputter-coated with platinum using an EM ACE600 fine coater (Leica), and observed using a SU3500 scanning electron microscope (Hitachi).

Four different views (dorsal, ventral, medial-sagittal and lateral-sagittal, Fig. 1) were used to satisfactorily capture the 3D form of *N. damascena* petal along development. Among the 121 dissected petals, 32 were mounted for dorsal view observation, 33 for ventral view, 36 for sagittal section observed from the medial side (hereafter medial) and 20 for sagittal section observed from the lateral side (hereafter lateral) (Fig. 1). The medial and lateral views were informative regarding the shape of both the nectar pouch and the lobes.

Geometric morphometrics

Shape and size of the growing petal were characterized morphometrically from two-dimensional configurations of landmarks defined for each of the four views. These configurations were chosen to ensure that landmarks could be unambiguously identified and digitized on all specimens across the entire developmental phase studied. Consequently, some structures not yet present at the early stages, such as pseudonectaries, had to be ignored from our morphometric scheme. We also chose not to consider the lobed structures (except for their radial ridge), since they start to fold precociously in development, thereby precluding the definition of reliable landmarks.

We used 12, 10, 8 and 7 landmarks (respectively for ventral, dorsal, medial and lateral) and 1, 3 and 1 series of 25 semilandmarks (respectively for ventral, medial side and lateral side) to capture the homologous curved outlines of the lower lip (ventral, medial and lateral sides) and the petal lobes (medial and lateral sides) (Fig. 2).

Landmark coordinates were manually recorded using tpsDig2 (Rohlf 2015) and processed following standard procedures with tpsRelw (Rohlf 2015): Landmark configurations were optimally aligned by generalized Procrustes analysis (Dryden and Mardia 2016), which extract shape data by filtering out differences in scale, location, and orientation among raw landmarks configurations. The minimum bending energy was used as a criterion to slide the semi-landmarks. Statistical analyses of shape variation were then carried out from the shape tangent

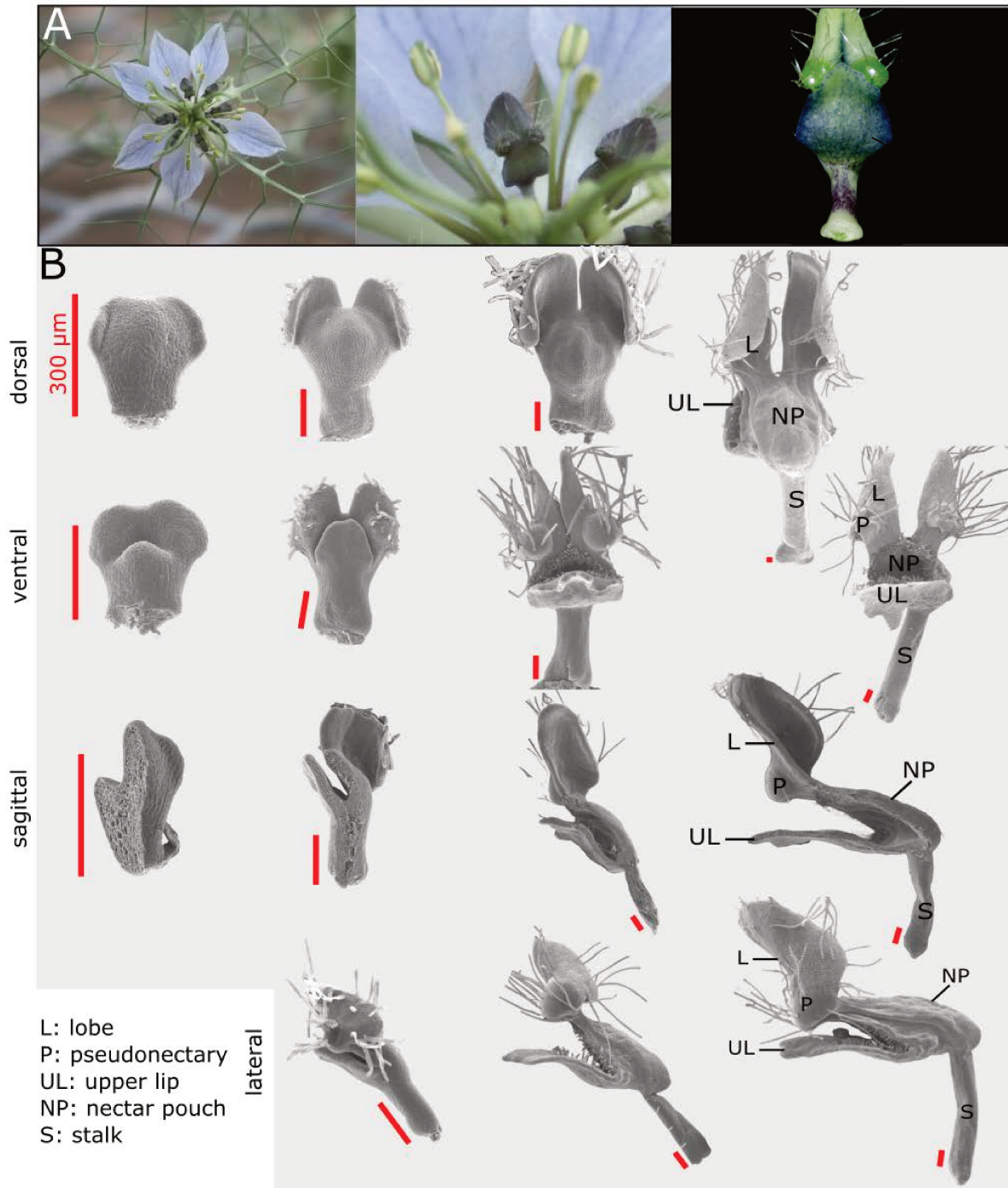


Figure 1. **The *Nigella damascena* petal and its developmental sequence.** (A) Wild-type flowers of *N. damascena* comprise 7-9 petals. (B) Four views have been used to recapitulate petal morphogenesis: dorsal, ventral, medial and lateral. On every column, petals are approximately at the same developmental stage. First column petals are taken after the restart of petal development (which undergoes a stasis after petal primordia formation). In last column petals morphogenesis is almost complete.

coordinates. Note that the landmark configurations for the ventral and dorsal view are instances of configurations exhibiting bilateral object symmetry. Landmarks have been digitized on both sides but only the symmetric component of shape variation was considered in subsequent analyses by averaging each specimen with its reflected copy. Patterns of shape variation were explored using Principal Component Analysis (Jolliffe 1986) and patterns of ontogenetic allometry were investigated with multivariate regression of shape on size (centroid size).

We applied the same protocol on subsets of landmarks corresponding to petal subdomains. The stalk and nectar pouch were the only domains of the petal that could be identified at every stage of development. They were separately analysed in order to examine their particular growth dynamics and possible contributions to the overall shape changes. To do this, we performed PCA with subsets of landmarks corresponding to each subpart (summarized in Fig 3). We then plotted the PCA first axis against the centroid size (Fig. 3C & 3D).

Cell characteristics in the nectar pouch domain

We investigated cell characteristics in the nectar pouch domain using the area delimited by six landmarks in the dorsal view. We took advantage of the fact that cell boundaries are visible on SEM images to (i) count cells and measure the total surface of the domain, making it possible to calculate the mean cell surface for each sample; (ii) transform the nectar pouch domain into a tessellating network using Fiji software (Schindelin et al. 2012), in order to visualize cell populations that may differ by shape, size and number during development. All the SEM pictures where cell boundaries were clearly visible have been used, which corresponds to 17 petals, covering the same developmental sequence as in geometric morphometric analyses.

Cell area and elongation analyses and color representations were performed with Fiji MorphoLibJ plugins (Legland, Arganda-Carreras, and Andrey 2016). Violin plots were produced with R (4.0.5) and ggplot2 library (3.3.2 version).

We used a unique cell color coding for all petals in order to be able to visually compare stages (all cell area and cell elongation maps are available in Suppl. Fig. 1). We then extracted cell

area and elongation distribution using violin plots, the latter being plotted against total cell number for each specimen.

Since the petals are not plane objects, the deviations from a perfect plane model were estimated with medial and lateral views, and they were shown to be an order of magnitude smaller than the apparent size differences among cells. This implies that the observed differences cannot be explained only by an effect of perspective and angle of view effect.

Relative contributions of cell proliferation and cell expansion to shape transformation

Geometric morphometrics and Procrustes analysis are based on the coordinates of landmarks which are aligned in order to ignore effect of scale. This implies that any shape variation not due to scale can be viewed as differential evolution of the distances between pairs of landmarks. Consequently, we use this assumption to investigate the number and size of cells that are located between every pair of landmarks (Fig. 5A). We defined three stages (early, mid, and late+mature stages, Fig. 5B) and for each stage we calculated cell number and absolute length between every pair of landmarks. Three individuals for each stage were used for averaging purposes and a left/right average was also performed to match the geometric morphometric analyses which use only the symmetric component. We then calculated what we called the cell proliferation contribution (Cp) and the cell expansion contribution (Ce) as follows:

$$Cp^{i,j}(stage\ 2 - stage\ 1) = \left(\frac{N^{i,j}(stage\ 2) - N^{i,j}(stage\ 1)}{N^{i,j}(stage\ 1)} \right) / \left(\frac{D^{i,j}(stage\ 2) - D^{i,j}(stage\ 1)}{D^{i,j}(stage\ 1)} \right) * 100$$

$$Ce^{i,j}(stage\ 2 - stage\ 1) = 100 - Cp^{i,j}(stage\ 2 - stage\ 1)$$

where $N^{i,j}$ is the cell number between landmarks i and j at a given stage, and $D^{i,j}$ is the distance between landmarks i and j at a given stage which measure, for a given pair of landmarks and between two stages, what percentage of the increase in absolute distance between these two

landmarks can be attributed respectively to cell proliferation or expansion (Fig 5B and 5C). More precisely, C_p is equal to proliferation rate (the number of supplementary cells compare to the initial amount, in percentage) dividing by the expansion rate (the supplementary length compare to the initial distance, in percentage). C_e is equal to $100 - C_p$. We did not observe any regression in the length or number of cells between two landmarks, from a young stage to an older stage, resulting in exclusively positive values for C_p and C_e .

Some landmarks target regions that contribute more than others to the shape variation during development, but the identification of these regions can be obscured by the Procrustes fit. We therefore used an alternative way to classify the contributions by attributing a "growth score" to each pair of landmarks, calculated as the ratio of the distance between them at the oldest stage divided by the length at the youngest stage.

Results

*Geometric morphometrics of the developing *Nigella damascena* petal*

The plots of PCA first axis against centroid size, which is a proxy of the petal size, revealed that dorsal view shape follows a developmental path from the youngest to the oldest organs (Fig. 2A). Shape variation of the ventral view globally shows a similar pattern than ventral and medial views, with the exception that late stages exhibit a bifurcation (Fig. 2B), explained by the presence of the upper lip either in open or closed position. For the medial view, we observe a similar case for early to intermediate stages, as later stages show a plateau in terms of shape variation (Fig. 2C). For the lateral view, although 40% and 30% of the shape variation is captured by the first and second axis, respectively, none of the first two axes shows any clear developmental trend (Fig. 2D).

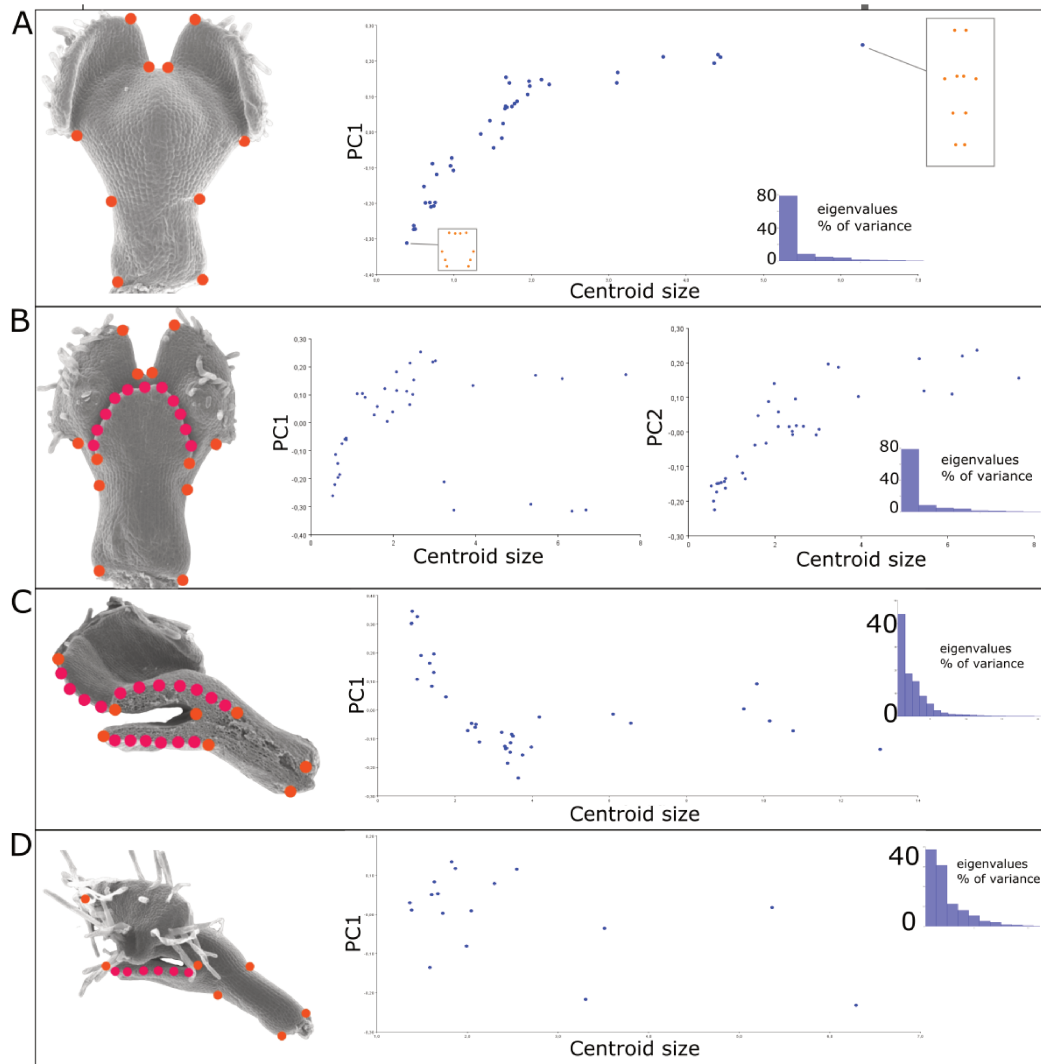


Figure 2. **Relationship between shape and size during petal development revealed by geometric morphometrics of the developing *Nigella damascena* petal in the four views (dorsal, ventral, medial, lateral).** On the left side of (A) (B) (C) and (D) panels landmarks sets are indicated, superimposed to the corresponding petal SEM pictures (landmarks are in orange dots, semi-landmarks in red dots). For the four views, Procrustes analyses are followed by PCA analysis, and its 1st axis is plotted against centroid size (proxy of petal size). Repartitions of variability for each eigenvalue are represented on right thumbnails.

Procrustes analyses done on subsets of landmarks, corresponding to the stalk (Fig. 3C, four landmarks) or the nectar pouch (Fig. 3D, six landmarks), compared to overall petal analysis (Fig. 3A, ten landmarks) reveal that, as a first approximation, each substructure of the organ seems to behave similarly to the overall petal. In particular, the covariation between shape and size is correctly approximated by an exponential relation (Fig. 3C and 3D).

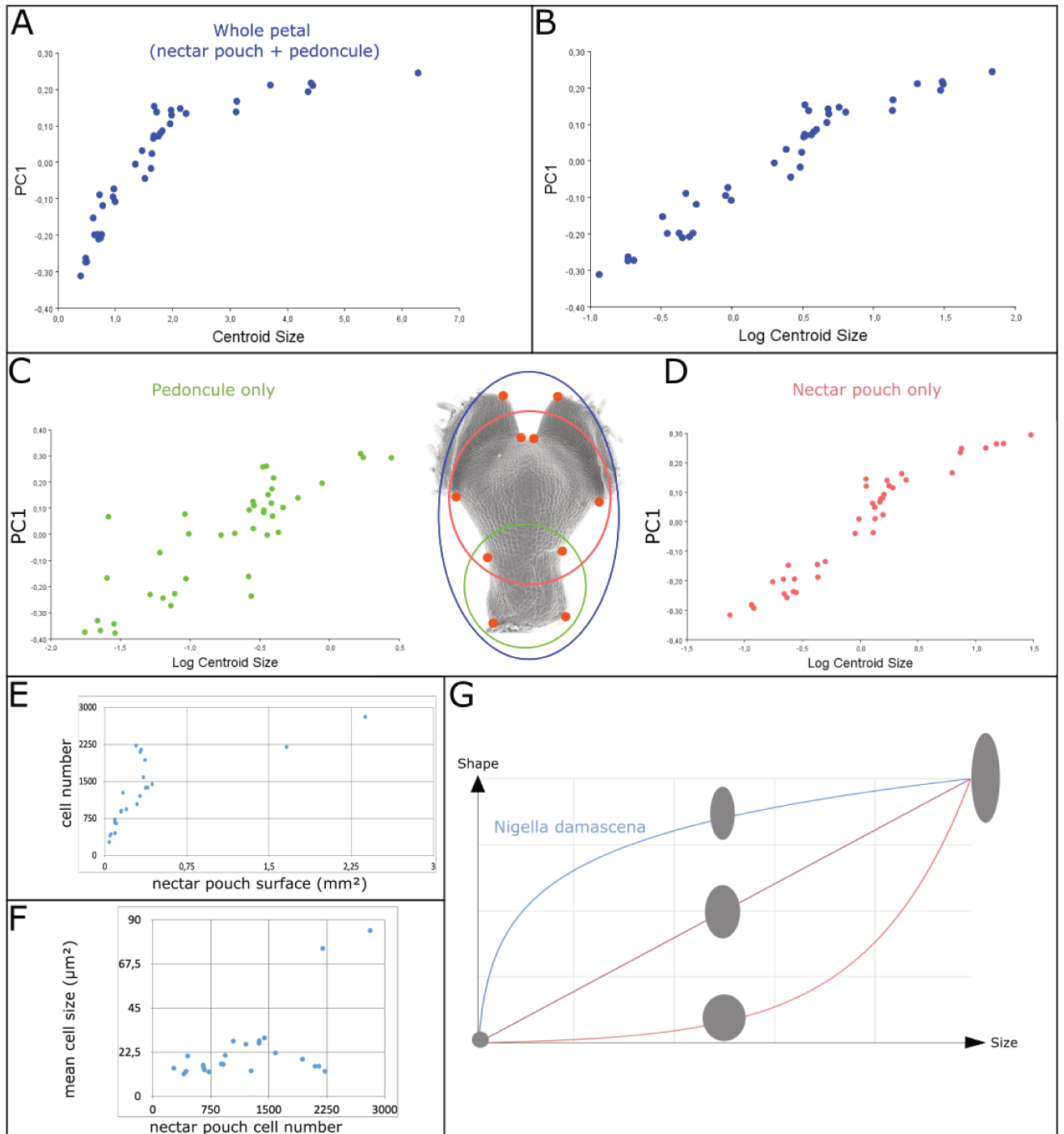


Figure 3. **An exponential relation links shape and size dynamics of *Nigella damascena* petal and its subdomains during morphogenesis.** (A) PCA 1st axis of dorsal view plotted against centroid size (proxy of petal size) and log of centroid size (B) show that their covariation is well approximated by an exponential law. Same analysis performed on subsets of landmarks delimiting peduncle only (C) and nectar pouch only (D). (E) Cell number plotted against dorsal nectar pouch surface. (F) Mean cell surface plotted against cell number. (G) *Nigella damascena* allometric relationship between shape and size, compared to other biological allometries.

An allometric law governs covariation of petal shape and size dynamics during development

Interestingly, for at least dorsal view, covariation between size and global shape variations is well approximated by an allometric law, which, at a first approximation, exponential at a first approximation as it is linearized by applying log to size. (Fig. 3B). In other words, during petal development, dorsal shape (but also ventral and medial, although to a lesser degree) show a shape acquisition exponentially slower than size. Procrustes analyses on re-samplings have been performed to confirm that this effect is not due to a sampling bias (Fig. S2)

Cell number and mean cell surface were computed on dorsal views of the nectar pouch. Despite a lack of resolution for older stages, mean cell surface is globally constant, around $20 \mu\text{m}^2$, from early to late stages, when suddenly mean cell size strongly increases to reach about $80 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3F). In parallel, in the first phase, cell number increases proportionally faster than petal size, but then it increases much slower when cells undergo cell growth (Fig. 3E).

Disparities in cell characteristics depending on their localization on the dorsal part of the nectar pouch during development

The dorsal part of nectar pouch can be clearly delimited from the neighbouring domains (lobes, stalk) from early to late stages, and as seen earlier, its shape acquisition follows a clear developmental trend. The relation between its shape and size follows the same allometric relation that the overall petal. Together, these characteristics makes the dorsal part of the nectar pouch a key model to study cellular processes (Fig. 4A).

The cell maps drawn from the dorsal views of the nectar pouch during development allowed us to highlight the diversity of cell behaviours in terms of shape and size changes, depending on their localization on the tissue. In the earliest stages, all cells have approximately the same size, but variance progressively tends to increase and while the largest cells are located in the middle of the pouch, the most elongated ones are distributed on the lateral sides (Fig. 4B and C and

Supp. Fig.1). Finally, as the pouch grows, the largest cells are also the most elongated, suggesting anisotropic expansion. Most of them are localized on the lateral sides, but central cells are also affected by elongation. Cells at the boundary between lobes and nectar pouch (i.e., the topmost cells in these maps) are characterized by a small size and a relatively limited elongation, even in the latest stages.

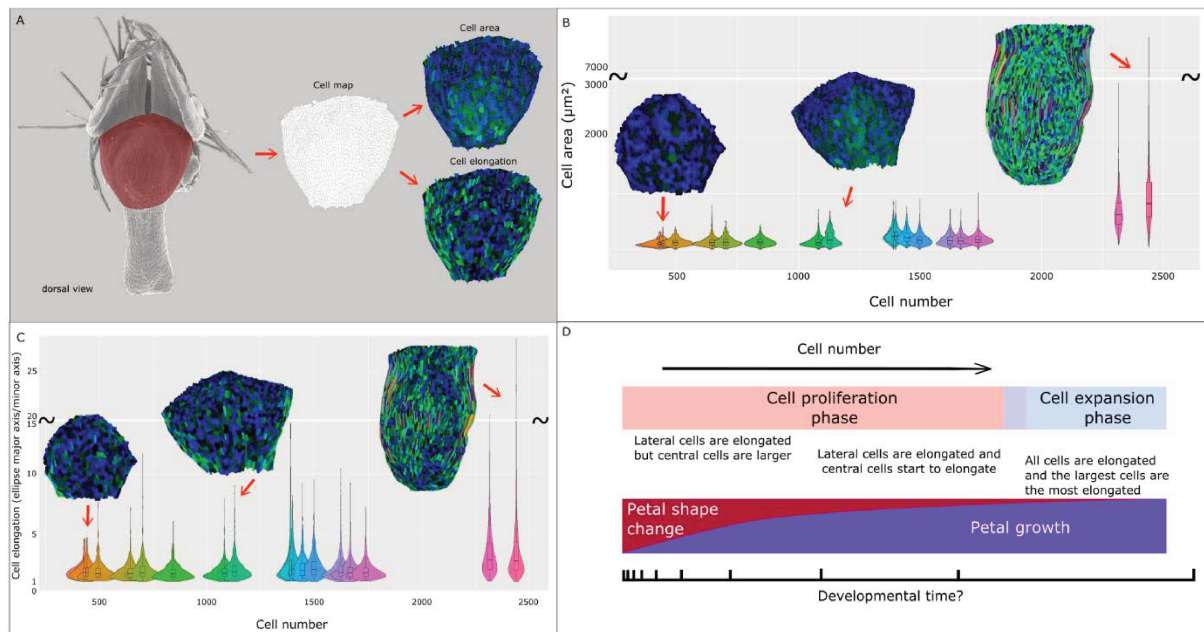


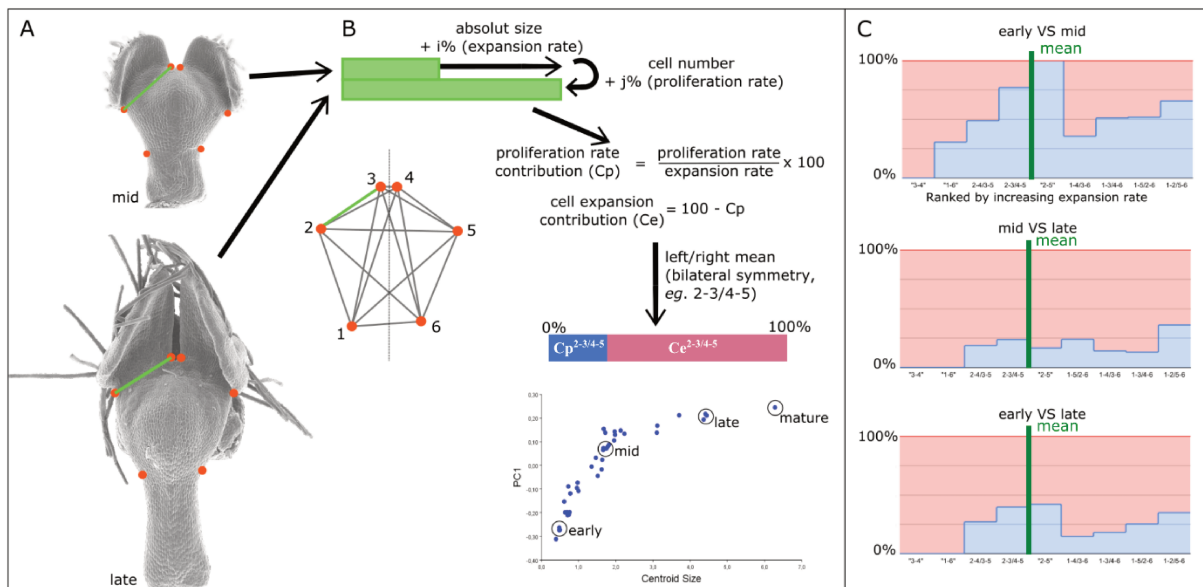
Figure 4. Cell dynamics during petal morphogenesis with focus on dorsal view of the nectar pouch. (A) Petal dorsal view of the nectar pouch has been transformed into cell maps in order to measure and visualize cell area (up) and cell expansion (down) dynamics. Color code is detailed in Figure S1. Dynamics and repartition of cell area (B) and elongation (major axis/minor axis of equivalent ellipse, (C)) are visualized through violin plots, themselves plotted against total cell number. (D) Summary of macroscopic and cellular characteristics of *Nigella damascena* petal during development

Cell proliferation contributes more to pouch shape change whereas cell expansion contributes more to petal final size

The pairs of landmarks placed to the right of the graph (Fig. 5C) are those for which the inter-landmark distance increases the most. Pairs whose score is higher or lower than the average can be considered as the ones contributing the most to the evolution of the overall shape. Interestingly, there is a great difference in cell proliferation and growth contributions depending

on the pairs of landmarks. In particular, it is interesting to note that between early and intermediate stages, which is the most important interval in terms of shape evolution, cell proliferation is predominant for landmark pairs which undergo the largest expansion (with a high growth score, located at the right of the graph) and almost absent for landmark pairs which undergo the smallest expansion (with a low growth score, located at the left of the graph). Between intermediate and late stages, cell expansion becomes predominant (> 80% for all landmarks).

Figure 5. **Relative contribution of cell proliferation and cell expansion during nectar**



pouch development. Lengths between every pair of landmarks recapitulates shape information as much as landmarks coordinates (A). Calculation of proliferation rate and cell expansion contributions to landmarks inter-distance dynamics is presented in (B). Three triplets of petals corresponding to early, mid and late stages have been used to study the contributions. For each individual, pairs of landmarks that are left-right symmetric have been averaged, and measures of each triplet have also been averaged. Cell proliferation and expansion relative contributions are summarized in (C). For each comparison (early to mid, mid to late, early to late), landmarks have been ordered according to increasing inter-distance values between the two stages.

Discussion

Playing a primary role in pollinator attraction, petals can accommodate a multiplicity of forms and ornamentations. Petals therefore are key structures to address the origin of complex forms on developmental grounds, and to investigate how the observed diversity has emerged in the course of evolution.

We addressed the question of petal shape elaboration and its relation with size increase during development in the non-model species *Nigella damascena*, using geometric morphometrics and cell characteristics analyses. We found that shape changes more rapidly than size increases at early stages, marking an allometric relation between them. The origin of such relation will be discussed thereafter. We also found that cell proliferation plays a major role in shape transformation, contrary to cell expansion, which rather contributes to petal growth. This strongly suggests that cell proliferation is the preferential target for morphogenetic signals, and that petal size establishment is controlled by cell expansion.

Developmental patterns and cellular controls of petal shape and size dynamics

To capture the complex petal shape, geometric morphometric analyses were conducted on three orthogonal views. For a given view, the PCA first axis coordinate does not encompass all petal shape information, because i) SEM pictures are 2D projections of a 3D shape, ii) the number of landmarks summarizing the overall shape is limited. Nevertheless, several clues suggest that they are good proxies to follow petal shape variation during development. First, 80% of the variation is carried by the first axis for dorsal and ventral views. Second, plots against centroid size show a clear developmental trend for three of the four views (*i.e.*, distributions are sparsely dispersed). Among the four views, dorsal view presents the clearest trend. Ventral view exhibits a bifurcation in large petals, explained by the presence of the upper lip, which is long enough in late stages to be either in an opened or closed position according to the sample, hence affecting landmark positions and so the global shape. Many factors,

including specimen preparation, could explain why upper lip is in one or the other position for a given petal. However, if it strongly affects global shape analysis, it is less relevant from a biological perspective. The medial view showed a clear trend for the young to medium individuals, and then probably exhibited a plateau, although studying additional mature specimens would be needed to confirm it. Nevertheless, as this plateau is also observed for the second and third axes, it suggests that final medial shape is reached earlier than final size. Finally, the lateral view did not show any clear developmental trend (shape variation between two different developmental stages was not higher than between two organs at the same stage), probably due to the lack of a sufficient sample of early stage petals.

PCA first axis coordinates variation and the relative distance between two individuals on the axis can be interpreted qualitatively, but also quantitatively and therefore constitutes a proxy for studying the dynamics of the variation in petal shape.

In this study, and particularly for the dorsal view, the relation observed between the dynamics of shape and the dynamics of size is allometric and seems to follow an exponential law. More precisely, these results show that shape varies exponentially slower than size. This is not a universal rule, as other types of relations have been found in other organisms (Fig. 3G, for example, a polynomial relation in mammal species Savriama and Gerber 2018).

Several scenarios can explain this relation between shape and size dynamics but the cell counts we performed suggest one scenario in particular. The relation between cell number and petal surface seems globally linear in the early to mid-stages. If we make the reasonable assumption -but not testable with a SEM sequence- that cells globally divide at a constant rate through developmental time (which generates an exponential growth), it finally implies that shape changes at a constant rate during a proliferation phase, and then stops and makes a transition to expansion phase. Such segregation between the two processes have already been observed during the morphogenesis of other plant organs, probably involving a tight control of the cell

cycle (Walcher-Chevillet and Kramer 2016), Whatever the nature of the morphogenetic signals and the precise cellular mechanisms they trigger, they seem to have a rather constant dynamic during the proliferation phase.

A complete and definitive confirmation of these assumptions would require additional studies, such as real-time tracking of cell division during petal development.

Cell division and cell expansion differential contributions to petal size and shape

Once polarity is established in the young primordium, petal shape derives from four primary events (Guillot and Lecuit 2013) cell number and size but also cell shape and arrangements. The distances between all pairs of landmarks carry an equivalent information than shape coordinates, and therefore recapitulates the shape, as the coordinates do. This is the reason why we chose to measure the number and size of cells along transects between every pair of landmarks and compare them among developmental stages. Contrary to many animal tissues, cell rearrangements (and cell deaths) are rare in plant epidermis (Dickman et al. 2017) but if they happen, they would be indistinguishable from cells that appear through cell division, and real-time tracking of cell division would be needed to distinguish between both phenomena. Nevertheless, if a cell moved and inserted in the transect between two landmarks, this event will be considered like cell proliferation as it affects the number of cells. Alternatively, cell shape variation affecting cells between two landmarks would be considered like cell expansion events (or cell size regression) as they can affect cell width on this line. The four primary events could hence be considered as two processes which are easily measurable between two landmarks. On one hand, counting the number of cells between two landmarks and comparing this number between two stages will give access to a mean value of proliferation. Dividing the absolute distance between the two landmarks by the number of cells gives on the other hand the mean cell size and so the mean value of cell expansion through comparison between two stages.

Even if cell number and cell size can be characterized, it is not trivial to deduce their relative contributions to shape dynamics because shape reflects the relative distances among landmarks and not directly the distances themselves. Furthermore, while it may appear intuitive to consider that overall shape change can sometimes be driven by local shape changes spatially limited to subregions of the overall structure. Even if Procrustes analysis does not give access to this information, we managed to build some bridges between cell characteristics (*i.e.*, microscopic level) and shape changes as reconstructed by geometric morphometrics (*i.e.*, macroscopic level). We considered that pairs of landmarks that undergo extreme variations (*i.e.*, the farthest from the mean) in terms of relative distance between two stages are the ones which participate most to shape variation. As they are ordered in ascending order of expansion in Figure 5C, the most to the right and to the left on the graphs are the most likely to intervene in shape variation (*e.g.* 1-2 (with its symmetric 5-6) and 3-4, which are the most extreme landmarks pairs).

Firstly, the comparison between early-mid and mid-late graphs shows that cell proliferation has a preponderant role in the youngest stages, which coincides with the phase where the shape changes the most. In later phases, cell expansion takes over, which supports a development in two phases: proliferation / expansion.

Secondly, in the early-mid graph, corresponding to the crucial period in terms of shape changes, the most with the most growing distance (on the right) are governed 50% or more by cell proliferation. On the contrary, in the less growing pairs of landmarks (on the left) cell proliferation is almost absent, contrary to cell growth. As a result, cell proliferation seems to be the predominant factor in shape dynamics, and could therefore be the preferential target on which morphogenetic signals act. Most growing pairs of landmarks (on the right) are mostly governed by cell proliferation. On the contrary, in the less growing pairs of landmarks (on the left) cell proliferation is almost absent, contrary to cell growth. As a result, cell proliferation seems to be the predominant factor in shape dynamics, and could therefore be the factor on which morphogenetic signals preferentially act. Biologically, the pairs of landmarks with the highest score correspond to the lateral sides of the dorsal parts of the urn, and the lesser score

landmarks correspond to the ridge separating the lobes, which undergo practically no growth during development.

Many species Angiosperm species bear nectar spurs on their petals. What are the characteristics of petal morphogenesis in these species, in comparison with N. damascena?

If *Nigella damascena* nectar pouch has a relatively small depth, many Angiosperm species exhibit petal spurs, including the Nigelleae sister group Delphinieae. While we have shown that proliferation is preponderant in comparison to cellular expansion at least in the morphogenesis of *N. damascena* dorsal part of nectar pouch, we might wonder if it is also the case for petal spur morphogenesis. The ancestors of Angiosperms and of Ranunculaceae were devoid of nectar spurs, which may imply that these structures are homoplastic and may rely on different genetic and developmental processes. Different mechanisms have been retained during evolution. However, as a first approach, increasing the number of cell divisions generates less stress on cells than increasing their size. In particular, mechanical constraints, or limiting genetic expression could impose a maximum cell size in these tissues (Roddy et al. 2020, Kondorosi, Roudier, and Gendreau 2000). Cell dynamics and genetic bases of petal spur development have been extensively studied in many plant species in the last decade. Interestingly in *Aquilegia* species which also belong to Ranunculaceae, spur first develops through anisotropic cell divisions, leading to an oriented growth of the future spur, but then cell expansion takes over and is responsible for 99% of the differences in spur elongation between species (Puzey et al. 2012, Yant et al. 2015). Spur development in the Valeraniaceae species *Centranthus ruber* appears to rely on both cell expansion and proliferation processes. However, in *Linaria*, cell division has the lead role in spur elongation, whereas cell expansion remains quantitatively secondary (Cullen, Fernández-Mazuecos, and Glover 2018). In *Delphinium*, belonging in the sister group of Nigelleae, the relative contributions of cell expansion and cell division has not yet been investigated and both scenarios remain possible: its phylogenetic vicinity with *Nigella damascena* advocates for the cell division lead but the examples of other Ranunculaceae as *Aquilegia* could suggest the opposite. Finally, balanced contributions from

cell division and expansion remains also a possibility and a similar study than the one presented in this article would confirm one or the other of these possibilities and contribute to draw the big picture of petal pouch and spur evo-devo.

Author Contributions

PG, FJ, and CD designed the experiments. PG and SG performed the morphometric geometric analyses. PG and PA designed and performed the cell map analyses. PG, FJ and CD wrote the manuscript. All authors agreed on the final version of the manuscript.

Funding

CD benefit from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS, LabEx SPS and ANR-17-EUR-0007, EUR SPS-GSR). PG was supported by a fellowship from ENS de Lyon. We thank the Institut de Systématique Evolution Biodiversité for financial support and acknowledge the ‘Plateforme de microscopie électronique’ (MNHN) where the SEM study was conducted.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Supplementary Material

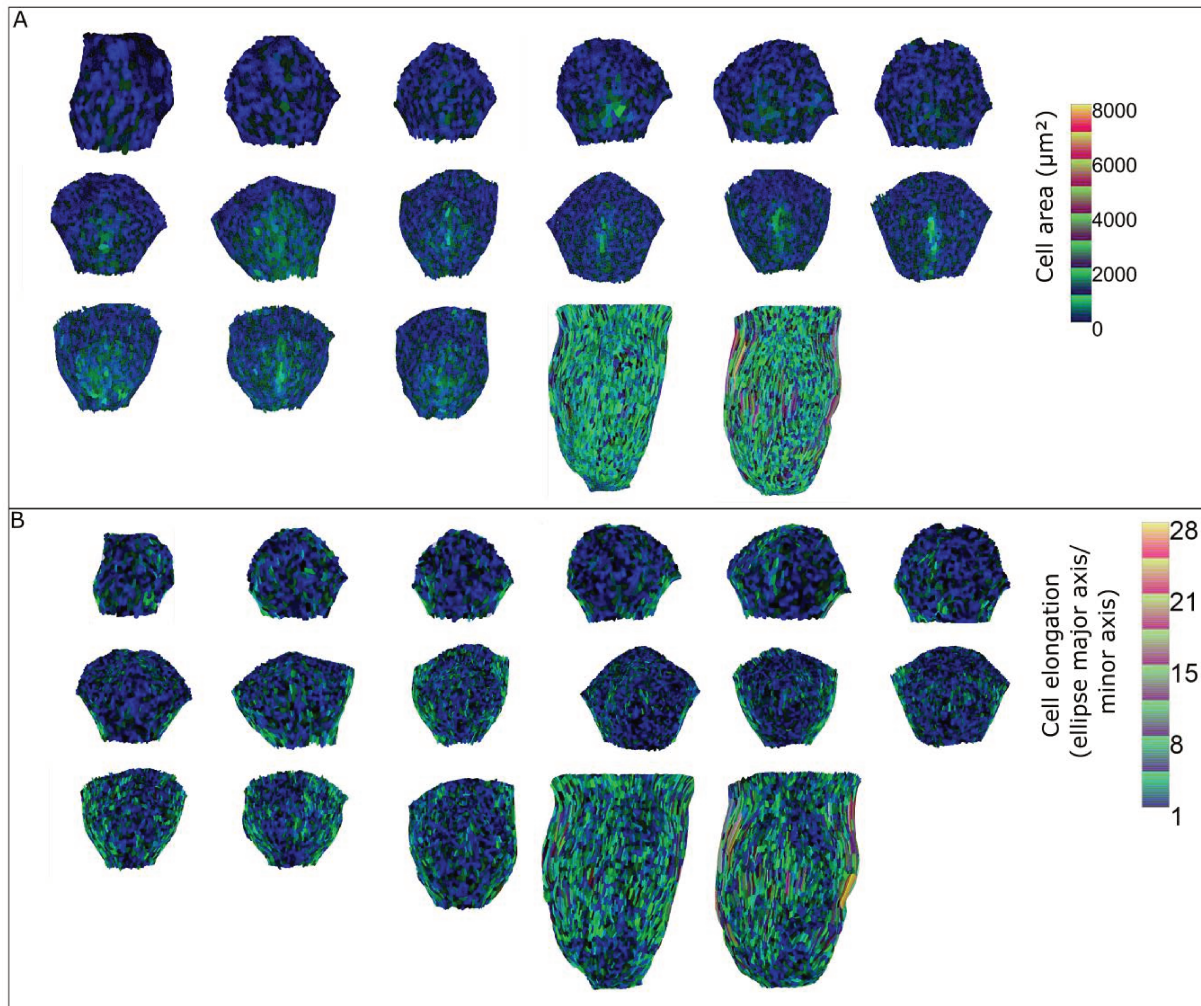


Figure S1. **Sequence of cell maps colored by cell area or cell elongation values.** Cell maps for cell area (A) and cell elongation (B) are ordered from top left to bottom right in increasing total surface. For every individual, a common color code has been used to make easier comparisons between stages.

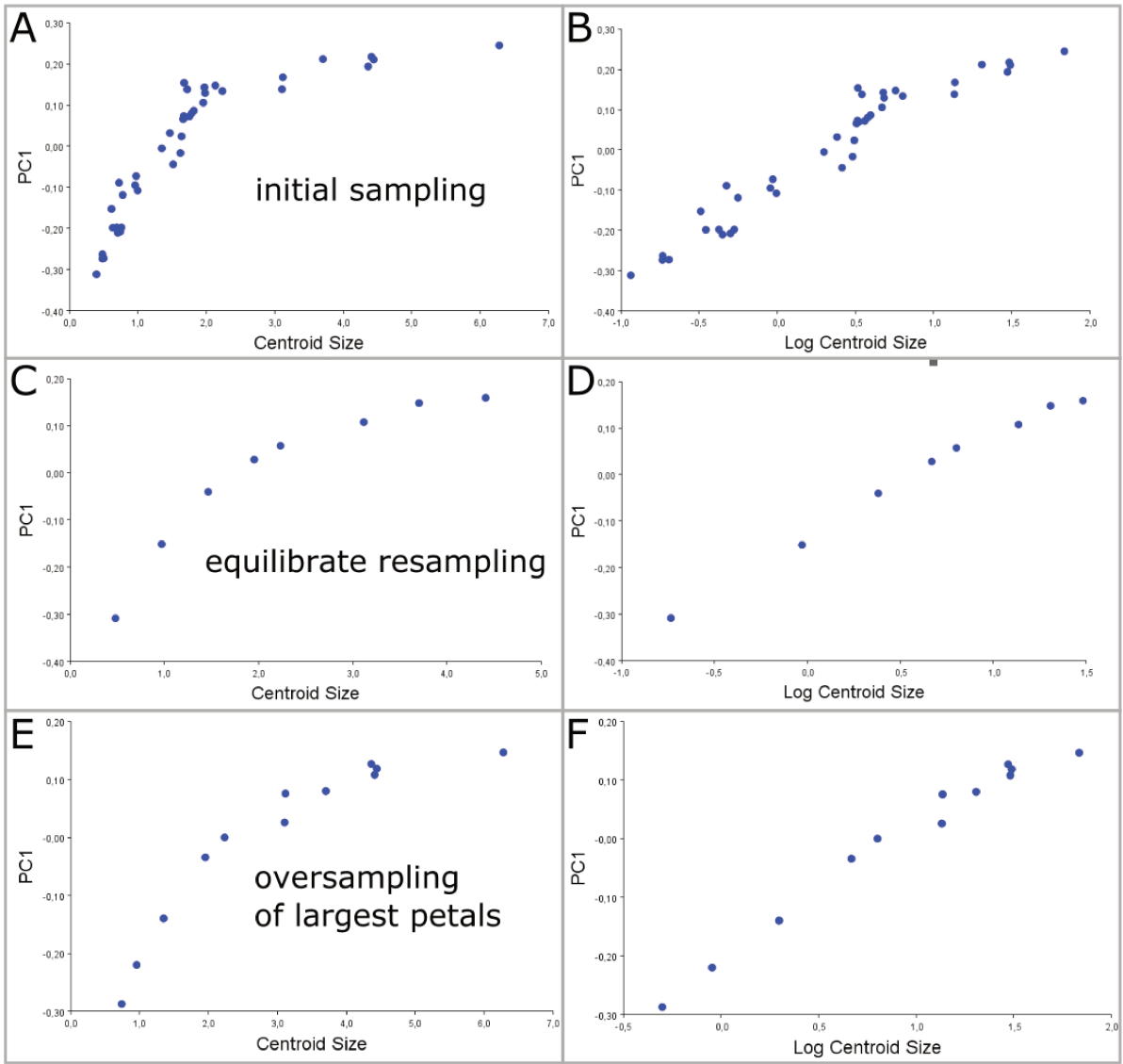


Figure S2. Re-samplings confirm the presence of an exponential law between shape and size during nectar pouch development. PC1 plots against centroid size (A, C, E) or log centroid size (B, D, F) after original sampling, equilibrate resampling and oversampling of largest petals. An exponential relation is found for every case, excluding a sampling bias and consolidating its biological origin.

References

- Bookstein, F.L. 1989. "Principal Warps: Thin-Plate Splines and the Decomposition of Deformations." *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 11 (6): 567–85.
<https://doi.org/10.1109/34.24792>.
- Bookstein, Fred L. 1997. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.
- Carrive, Laetitia, Boris Domenech, Hervé Sauquet, Florian Jabbour, Catherine Damerval, and Sophie Nadot. 2020. "Insights into the Ancestral Flowers of Ranunculales." *Botanical Journal of the Linnean Society* 194 (1): 23–46. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa031>.
- Cullen, E, M Fernández-Mazuecos, and B J Glover. 2018. "Evolution of Nectar Spur Length in a Clade of *Linaria* Reflects Changes in Cell Division Rather than in Cell Expansion." *Annals of Botany* 122 (5): 801–9. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx213>.
- Gonçalves, Beatriz, Odrade Nougé, Florian Jabbour, Céline Ridet, Halima Morin, Patrick Laufs, Domenica Manicacci, and Catherine Damerval. 2013. "An *APETALA3* Homolog Controls Both Petal Identity and Floral Meristem Patterning in *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae)." *The Plant Journal* 76 (2): 223–35. <https://doi.org/10.1111/tpj.12284>.
- Jabbour, Florian, Louis P. Ronse De Craene, Sophie Nadot, and Catherine Damerval. 2009. "Establishment of Zygomorphy on an Ontogenic Spiral and Evolution of Perianth in the Tribe Delphinieae (Ranunculaceae)." *Annals of Botany* 104 (5): 809–22.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcp162>.
- Jabbour, Florian, Mathilde Udrón, Martine Le Guilloux, Beatriz Gonçalves, Domenica Manicacci, Sophie Nadot, and Catherine Damerval. 2015. "Flower Development Schedule and *AGAMOUS*-like Gene Expression Patterns in Two Morphs of *Nigella damascena* (Ranunculaceae) Differing in Floral Architecture." *Botanical Journal of the Linnean Society* 178 (4): 608–19.
<https://doi.org/10.1111/boj.12297>.

Jolliffe, I. T. 1986. "Principal Components in Regression Analysis." In *Principal Component Analysis*, edited by I. T. Jolliffe, 129–55. Springer Series in Statistics. New York, NY: Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1904-8_8.

Kennaway, Richard, Enrico Coen, Amelia Green, and Andrew Bangham. 2011. "Generation of Diverse Biological Forms through Combinatorial Interactions between Tissue Polarity and Growth." *PLOS Computational Biology* 7 (6): e1002071. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002071>.

Klingenberg, Christian Peter. 2011. "MorphoJ: An Integrated Software Package for Geometric Morphometrics." *Molecular Ecology Resources* 11 (2): 353–57. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>.

———. 2016. "Size, Shape, and Form: Concepts of Allometry in Geometric Morphometrics." *Development Genes and Evolution* 226 (3): 113–37. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>.

Legland, David, Ignacio Arganda-Carreras, and Philippe Andrey. 2016. "MorphoLibJ: Integrated Library and Plugins for Mathematical Morphology with ImageJ." *Bioinformatics* 32 (22): 3532–34. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw413>.

Liao, Hong, Xuehao Fu, Huiqi Zhao, Jie Cheng, Rui Zhang, Xu Yao, Xiaoshan Duan, Hongyan Shan, and Hongzhi Kong. 2020. "The Morphology, Molecular Development and Ecological Function of Pseudonectaries on *Nigella damascena* (Ranunculaceae) Petals." *Nature Communications* 11 (1): 1777. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15658-2>.

Mitteroecker, Philipp, and Philipp Gunz. 2009. "Advances in Geometric Morphometrics." *Evolutionary Biology* 36 (2): 235–47. <https://doi.org/10.1007/s11692-009-9055-x>.

Puzey, Joshua R., Sharon J. Gerbode, Scott A. Hodges, Elena M. Kramer, and L. Mahadevan. 2012. "Evolution of Spur-Length Diversity in *Aquilegia* Petals Is Achieved Solely through Cell-Shape Anisotropy." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1733): 1640–45. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1873>.

Roeder, Adrienne H. K., Paul T. Tarr, Cory Tobin, Xiaolan Zhang, Vijay Chickarmane, Alexandre Cunha, and Elliot M. Meyerowitz. 2011. "Computational Morphodynamics of Plants: Integrating Development over Space and Time." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (4): 265–73. <https://doi.org/10.1038/nrm3079>.

- Rohlf, F. 2015. “The Tps Series of Software.” *Hystrix* 26 (January): 1–4.
<https://doi.org/10.4404/hystrix-26.1-11264>.
- Rolland-Lagan, Anne-Gaëlle, J. Andrew Bangham, and Enrico Coen. 2003. “Growth Dynamics Underlying Petal Shape and Asymmetry.” *Nature* 422 (6928): 161–63.
<https://doi.org/10.1038/nature01443>.
- Rolland-Lagan, Anne-Gaëlle, Lauren Remmler, and Camille Girard-Bock. 2014. “Quantifying Shape Changes and Tissue Deformation in Leaf Development.” *Plant Physiology* 165 (2): 496–505.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.231258>.
- Runions, Adam, Miltos Tsiantis, and Przemyslaw Prusinkiewicz. 2017. “A Common Developmental Program Can Produce Diverse Leaf Shapes.” *New Phytologist* 216 (2): 401–18.
<https://doi.org/10.1111/nph.14449>.
- Savriama, Yoland, Mia Valtonen, Juhana I. Kammonen, Pasi Rastas, Olli-Pekka Smolander, Annina Lyyski, Teemu J. Häkkinen, et al. n.d. “Bracketing Phenogenotypic Limits of Mammalian Hybridization.” *Royal Society Open Science* 5 (11): 180903. <https://doi.org/10.1098/rsos.180903>.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. “Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis.” *Nature Methods* 9 (7): 676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Yant, Levi, Silvio Collani, Joshua Puzey, Clara Levy, and Elena M. Kramer. 2015. “Molecular Basis for Three-Dimensional Elaboration of the *Aquilegia* Petal Spur.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282 (1803): 20142778. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2778>.
- Yao, Xu, Wengen Zhang, Xiaoshan Duan, Yi Yuan, Rui Zhang, Hongyan Shan, and Hongzhi Kong. 2019. “The Making of Elaborate Petals in *Nigella* through Developmental Repatterning.” *New Phytologist* 223 (1): 385–96. <https://doi.org/10.1111/nph.15799>.
- Zhai, Wei, Xiaoshan Duan, Rui Zhang, Chunce Guo, Lin Li, Guixia Xu, Hongyan Shan, Hongzhi Kong, and Yi Ren. 2019. “Chloroplast Genomic Data Provide New and Robust Insights into the Phylogeny and Evolution of the Ranunculaceae.” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 135 (June): 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.024>.
- Zhang, Rui, Xuehao Fu, Caiyao Zhao, Jie Cheng, Hong Liao, Peipei Wang, Xu Yao, et al. 2020. “Identification of the Key Regulatory Genes Involved in Elaborate Petal Development and Specialized

Character Formation in *Nigella damascena* (Ranunculaceae).” *The Plant Cell* 32 (10): 3095–3112.

<https://doi.org/10.1105/tpc.20.00330>.

ZHAO, LIANG, PING LIU, XIAO-FEN CHE, WEI WANG, and YI REN. 2011. “Floral Organogenesis of *Helleborus thibetanus* and *Nigella damascena* (Ranunculaceae) and Its Systematic Significance.”

Botanical Journal of the Linnean Society 166 (4): 431–43. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01142.x>.

Chapitre II

Les sept façons de produire des motifs de couleurs répétés chez les Eucaryotes

Les motifs de couleurs répétés ornant les tissus externes des Eucaryotes, des formes en deux dimensions réparties sur des surfaces plus ou moins repliées en trois dimensions

Nous avons considéré dans notre étude qu'un organisme arbore un motif répété à partir de deux répétitions, ce qui est une acception très large. Néanmoins, plus le nombre de répétitions est élevé, plus la question d'un mécanisme produisant une répétition se pose. Si les points ornant l'aile de la drosophile *Drosophila guttifera* peuvent s'expliquer par trois inductions indépendantes (Werner et al. 2010), il est très difficile d'imaginer que le millier de points ornant le tissu externe de la murène léopard (*Gymnothorax favagineus*) puissent être issus chacun d'un mécanisme indépendant et de son système de régulation associé. Produire des motifs de couleur répétés est donc la rencontre entre un mécanisme de production de structures répétées et un mécanisme de production de couleur.

Bien que les tissus externes possèdent une certaine épaisseur, l'écrasante majorité des patterns de couleurs répétés sont en deux dimensions, soit parce que les cellules colorées sont situées dans une unique couche (Sulaimon and Kitchell 2003), soit parce que l'épaisseur du tissu coloré n'est pas suffisante pour donner un rendu en trois dimensions. En revanche, les tissus externes sont parfois repliés ou possèdent des ornements en trois dimensions tels que les phanères (poils, plumes, écailles), pouvant ajouter une notion de relief au patron de couleur (Hoekstra 2006).

The seven ways eukaryotes produce repeated colour motifs on external tissues

Pierre Galipot^{1,2*} , Catherine Damerval²  and Florian Jabbour¹ 

¹*Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles, 57 rue Cuvier, CP39, Paris, 75005, France*

²*Génétique Quantitative et Evolution-Le Moulon, Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, Gif-sur-Yvette, 91190, France*

ABSTRACT

The external tissues of numerous eukaryote species show repeated colour patterns, usually characterized by units that are present at least twice on the body. These dotted, striped or more complex phenotypes carry out crucial biological functions, such as partner recognition, aposematism or camouflage. Very diverse mechanisms explaining the formation of repeated colour patterns in eukaryotes have been identified and described, and it is timely to review this field from an evolutionary and developmental biology perspective. We propose a novel classification consisting of seven families of primary mechanisms: Turing(-like), cellular automaton, multi-induction, physical cracking, random, neuromuscular and printing. In addition, we report six pattern modifiers, acting synergistically with these primary mechanisms to enhance the spectrum of repeated colour patterns. We discuss the limitations of our classification in light of currently unexplored extant diversity. As repeated colour patterns require both the production of a repetitive structure and colouration, we also discuss the nature of the links between these two processes. A more complete understanding of the formation of repeated colour patterns in eukaryotes will require (i) a deeper exploration of biological diversity, tackling the issue of pattern elaboration during the development of non-model taxa, and (ii) exploring some of the most promising ways to discover new families of mechanisms. Good starting points include evaluating the role of mechanisms known to produce non-repeated colour patterns and that of mechanisms responsible for repeated spatial patterns lacking colouration.

Key words: colour patterns, Eukaryota, pattern classification, periodic patterns, repeated patterns, Turing patterns

CONTENTS

I. Introduction	1677
(1) Diversity of repeated colour patterns displayed on eukaryotic external tissues	1677
II. Primary mechanisms	1678
(1) Turing(-like)	1678
(2) Cellular automaton	1678
(3) Multi-induction	1678
(4) Physical cracking	1680
(5) Random	1680
(6) Neuromuscular	1682
(7) Printing	1682
III. Pattern modifiers	1684
(1) Effect of initial conditions and forcing	1684
(2) Tissue growth and deformation	1686
(3) Out-of-equilibrium patterning	1686
(4) Colour production	1687
(5) 3D ornamentations	1688
(6) Rapid changes in colour and pattern	1688

* Address for correspondence (Tel: +33(0)1 40795457; E-mail: pierre.galipot@edu.mnhn.fr)

IV. Discussion	1688
(1) Distribution of the different families of mechanisms across the phylogeny of eukaryotes	1688
(2) Strengths and limitations of our classification of primary mechanisms	1688
(3) Evolutionary and mechanistic coupling between the repetition of structural units and colouration: three ways to organize colours into repeated patterns	1689
(a) <i>Type I: entanglement of repetition and colouration: when repetitions are produced directly by colouration</i>	1689
(b) <i>Type II: colouring a pre-existing repeated structure or transferring pre-existing repeated geometry, when pre-formed repeated structures are co-opted to generate repeated colour patterns</i>	1689
(4) Seven or more? Discovering novel ways for eukaryotes to produce repeated colour patterns	1691
(a) <i>Tinkering with pre-existing patterns, a promising toolkit for the evolution of repeated colour patterns</i>	1691
(b) <i>Structural colours and repeated patterning</i>	1691
(c) <i>Mechanochemical induction of repeated colour patterns</i>	1691
V. Conclusions	1691
VI. Acknowledgements	1692
VII. References	1692

I. INTRODUCTION

(1) Diversity of repeated colour patterns displayed on eukaryotic external tissues

The external tissues of many eukaryotic species are adorned with colour patterns, like the black and white stripes of the zebra, the red and white signal on the cap of the fly agaric or the black spots on the leaves of arums. Colour motifs can serve many functions, such as signalling to congeners [for partner recognition (Himstedt, 1979) or communication (Futahashi *et al.*, 2012)], attracting or repelling other species [pollination (Leonard & Papaj, 2011) and aposematism (Elias, 2019)], or avoiding detection or recognition [camouflage (Smith & Ruxton, 2020)], suggesting they may have an adaptive value. Some colour patterns may contribute to adaptation to abiotic conditions [for example through thermoregulation (Stuart-Fox & Moussalli, 2009)] or may not have any identified biological function, rather being by-products of reactions controlling other traits.

These colour patterns are extremely diverse in terms of colour [produced chemically (Kelsh *et al.*, 2009; Tanaka, Sasaki & Ohmiya, 2008) or by physical means (Berthier, 2007)] and the cell types involved (Nüsslein-Volhard & Singh, 2017), but also in terms of geometry (eyespots, stripes, spots, spattering, large colour domains). Most external colour patterns are described from tissues (skin, plant epidermis, shells) whose surface can be approximated as a two-dimensional surface that is folded, to a varying degree, in three dimensions. Repeated patterns are a well-represented category of colour patterns, and are defined by the presence of a unit (a spot, dot, stripe, hexagon, or a more complex motif) at least twice on an individual. However, it is more relevant to consider a pattern to be a repeated pattern when the motif is repeated many times. During development, repeated patterns are sometimes induced long before the production of colour: a pre-pattern is produced, which is subsequently decoded into colouration (Manceau *et al.*, 2010; Mallarino *et al.*, 2016). In other instances, colours are produced before or at the same time

as patterning (Kondo, 2017), making pattern formation easier to observe and study.

Repeated colour patterns have long interested naturalists and other biologists (Hagen, 1881) and several attempts have been made to classify biological patterns, in the broad sense (for an example, see Meinhardt, 2008). One of the first models of pattern formation during morphogenesis was proposed by the mathematician and computer scientist Alan Turing, in a brilliant paper published in 1952 (Turing, 1952). This model consisted of a (bio-)chemical reaction–diffusion system comprising one activator and one inhibitor that interact to create periodic patterns induced by symmetry breaking. Some years earlier, the genetic origin of variegated colour patterns on maize kernels was elucidated by Barbara McClintock with the discovery of transposons. This can be considered the first biological mechanism to be described for the formation of a repeated colour pattern, although this was not the original aim of her study (McClintock, 1950). Periodic patterns (where motifs are regularly spaced) and random patterns (such as the variegation of maize kernels) constitute two main categories of geometry within repeated patterns. Turing's model was forgotten for a number of decades before simulations in the 1980s proved it effective, and then later by *in vivo* studies of angelfish (*Pomacanthus* sp.) (Kondo & Asai, 1995) and zebrafish (*Danio rerio*) skin and more recently of the flowering plant genus *Mimulus* (Ding *et al.*, 2020). Beyond these examples, biological mechanisms underlying repeated colour patterns remain an important area of research in developmental biology and new mechanisms are regularly being discovered (e.g. Manukyan *et al.*, 2017).

The aim of this review is to summarize and classify the mechanisms that produce repeated colour patterns across eukaryotes. We chose to differentiate the mechanisms that are sufficient to create a repeated pattern, which we call primary mechanisms, from those that are not able to produce patterns by themselves but which influence the final pattern by acting before, during, or after pattern induction (pattern modifiers). Pattern modifiers are of great importance in producing the actual diversity of repeated colour patterns in

nature because they are able to generate patterns that primary mechanisms alone cannot produce, such as the rosettes of leopards.

We define seven families of primary mechanisms [Turing (-like), cellular automaton, multi-induction, physical cracking, random, neuromuscular and printing; see Table 1] and six families of pattern modifiers (Table 2). We discuss the links between pattern geometry and the underlying mechanisms by detailing how information can be extracted from phenotypes. We also discuss the importance of carrying out functional studies in addition to phenotype-based inferences. Placing primary mechanisms in a phylogenetic context shows that the range of eukaryotic species used as model organisms for studying colour patterns is still limited, and we advocate a better coverage of the unexplored eukaryotic diversity. As repeated colour patterns require both the production of repetitive structures and colouration, we also discuss the nature of the links between these two processes. Finally, we propose three ways to discover new families of mechanisms.

II. PRIMARY MECHANISMS

(1) Turing(-like)

This family of mechanisms was theorized by the mathematician Alan Turing in 1952 but forgotten for decades. Turing-like systems have been reproduced *in chemico* (Castets *et al.*, 1990) and have proved their ability to produce repeated patterns, named Turing patterns. Phenotypically, they are characterized by a periodicity of their motifs (i.e. regularity in the distance between two consecutive motifs, which could be dots, stripes or labyrinths) (Kierzkowski *et al.*, 2019). Over the past 20 years, these patterns have been described *in vivo* in many species, as non-colour (Sick *et al.*, 2006; Economou *et al.*, 2012; Nagashima *et al.*, 2018) and colour patterns [Kondo & Asai, 1995; with a recent example in angiosperms (Ding *et al.*, 2020)]. Turing-like mechanisms are thought to be responsible for many periodic patterns in nature, not just colour patterns. The power of these mechanisms lies in the capacity of the reaction–diffusion system to produce a pattern from scratch, or more precisely from a noisy random initial condition, through the amplification of tiny variations (Turing, 1952) (Fig. 1). While the seminal model involved the interaction of two chemical species (one activator and one inhibitor, respectively diffusing over a short and long range), theoretical advances and *in vivo* experiments have demonstrated that numerous derivative systems can give rise to similar patterns, including systems with three or more interacting species, which may include not only diffusible molecules but also cells. Indeed, in the most precisely described model (zebrafish stripes), the pattern seems to arise from a Turing-like mechanism where the interacting agents are the coloured cells themselves rather than diffusible molecules (reviewed in Watanabe & Kondo, 2015). Although these systems are very different in nature, they are linked by

common mathematical relationships (such as long-range inhibition and local activation). The Turing mechanism also explains flower colour pattern in *Mimulus* (Ding *et al.*, 2020), which shows that Turing-like systems have been used repeatedly in diverse eukaryotic lineages and confirms that, due to their simplicity and efficiency, these mechanisms can be recruited for different biological purposes. Given the diversity of the biological interacting agents in *in vivo* Turing systems, unifying models have been built to help test their properties, notably when the agents are still poorly understood (Kondo, 2017). Even though periodic colour patterns are common among eukaryotes, there are few *in vivo* examples of well-described Turing mechanisms underlying colour patterns, reflecting the fact that they are inherently difficult to study. Nevertheless, the numerous examples of Turing mechanisms described for other patterns suggest that this family of mechanisms could be responsible for many periodic colour patterns and clues suggesting Turing-like systems are regularly described, for example recently in cats (see C.B. Kaelin, K.A. McGowan & G.B. Barsh, in preparation).

(2) Cellular automaton

This family of mechanisms has so far only been described in ocellated lizards (*Timon lepidus*), which have bicoloured (green and black) scales organized in a quasi-hexagonal lattice (Fig. 2). Manukyan *et al.* (2017) showed that the colour state (green or black) of each skin scale changes over time and is determined by the state of its six neighbouring scales at the previous developmental stage. They suggest that this discrete biological cellular automaton is derived from continuous a Turing-like system by the reduction of the diffusion coefficients at the scale borders. The dotted pattern at the juvenile stage (which is also likely to be produced by a Turing-like mechanism) acts as the initial condition.

(3) Multi-induction

All families of primary mechanisms described in other subsections of Section II share the same feature: the colour motifs in a given repeated pattern have a common origin. In a Turing pattern, each stripe or dot comes from the interaction between the same activator and inhibitor. In a random pattern (see Section II.5), each spot results from a mutation affecting the same gene. Nevertheless, individual motifs in a repeated colour pattern, although they may look similar, could have different origins. Although not parsimonious, multi-induction systems are probably common in nature, like the one giving rise to the para-segments of *Drosophila* embryos (Yu & Small, 2008; Small & Levine, 1991). Although the underlying mechanism is not easy to unravel, examples of multi-induction of colour patterns have been described, notably in the fly *Drosophila guttifera*, which has black spots on its wings. This colour pattern results from the combined action of two independent induction pathways, which are under the control of two *cis*-regulatory elements of the *yellow* gene (Werner *et al.*, 2010) (Fig. 3A). Likewise, the

Table 1. Primary mechanisms involved in the production of repeated colour patterns across eukaryotes








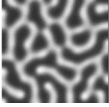



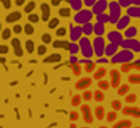
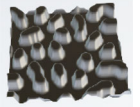
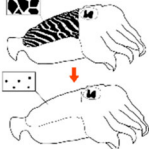
Attributes	Mechanisms						
	Turing(–like)	Cellular automaton	Multi-induction	Physical cracking	Random	Neuromuscular	Printing
Graphical examples of patterns							
Description of pattern	Periodic dots, stripes, eyespots	Labyrinths arranged in a periodic way	Variable; no intrinsic periodicity	Polygons (mostly hexagons); quasi-periodicity on a local scale	Dots, lines, stains (depends on geometry of cell lineage); no periodicity	Periodic bands	Dots, bands, broken lines, triangles; often periodic
Frequency of occurrence	Abundant (angiosperms, animals)	Rare (ocellated lizard <i>Timon lepidus</i>)	Probably frequent	Rare (fly agaric <i>Amanita muscaria</i>)	Rare in wild species, frequent in domestic breeds	Rare (Cephalopoda: flamboyant cuttlefish <i>Metasepia pfefferi</i> , common cuttlefish <i>Sepia officinalis</i>)	Abundant (Gastropoda: <i>Haliotis asinina</i> , many Conidae)
Number of evolutionary acquisitions currently known	Numerous	One	Probably numerous	One	Numerous	Probably unique	Unique
Pattern reproducibility among individuals (+++ , mostly reproducible; ++ and + , some features are reproducible but not all (e.g. distance between two motifs, positions of the motifs); – , mostly non reproducible)	+	+	+++	+/-	–	++	+
Source of the pattern	Reaction/diffusion at the molecular or cellular level	Turing system discretized into a Von Neumann cellular automaton	Multiple	Mechanical stress	Random mutations	Neural, muscular and hormonal control	Progressive deposits of colours and material by the animal mantle and mantle colour state variation over space and time

Table 2. Pattern modifiers that affect the final colour pattern in eukaryotes

Pattern modifiers	Initial conditions and forcing	Tissue growth and deformation	Out-of-equilibrium patterning	Colour production	3D ornamentations	Rapid colour and pattern changes
						
Principal effects on colour patterns	Impose a particular geometry and/or directionality, which generates anisotropic patterning (e.g. stripes)	Induce pattern dilatation and, if the pattern mechanism is active and sensitive to scaling, new motifs (rosettes, reticulations) and/or intermediate colours (in interaction with out-of-equilibrium patterning)	Generate intermediate colours and motifs (in interaction with tissue growth)	Define the colour range and the spatial extension of colour domains. Enhance pattern complexity with: (i) multiple colour domains, as a result of multiple thresholds (French Flag Model); (ii) complex motifs, derived from a second wave of patterning	Highlight and enhance the visual effects of the colour pattern	Cause the appearance or disappearance of the pattern

black and yellow striped and dotted patterns of Japanese quail (*Coturnix japonica*) juveniles also rely on several distinct mechanisms (Fig. 3B). Haupaix *et al.* (2018) showed that the first lateral stripes are induced by the somite tissue where the *agouti* gene is expressed. By contrast, the outermost lateral bands and the dots on the head, legs and wings are induced by a mechanism which is unknown to date, but which could be a Turing-like patterning mechanism.

(4) Physical cracking

One of the most iconic fungal species, the fly agaric (*Amanita muscaria*) presents white spots on a red background that act as an aposematic signal (Michelot & Melendez-Howell, 2003). The fly agaric is not the only species of the *Amanita* genus displaying this pattern (Yangt & Oberwinkler, 1999), but it may have the most visible pattern as a result of the contrast between the red and white colouration. The white dots are the remnants of a structure called the universal veil which protects the sporocarp during its early development, and which then undergoes physical cracking as the underlying structure, the red pigmented cap, grows (Yangt & Oberwinkler, 1999) (Fig. 4A). For energy-minimizing reasons, the first cracks tend to form hexagons, in exactly the same way as other instances of physical cracking such as the formation of geological mud cracks (Li & Zhang, 2011), crocodile head

scales (Milinkovitch *et al.*, 2013) and micrometric ornamentations on elephant skin (Martins *et al.*, 2018) (Fig. 4). As the cap grows, the white hexagons tend to retract, forming “warts” that gradually separate from each other. This generates a pseudo-periodic colour pattern and has only been described in fungal species (Yangt & Oberwinkler, 1999).

(5) Random

In many wild angiosperm species, but primarily in many cultivated varieties, plant organs bear mosaic or variegated patterns, which consist of coloured patches that are irregularly spaced on the tissue. These patterns are not only present in flowers, but also on leaves, fruits and seeds, like the variegated colour pattern of maize kernels which led Barbara McClintock to discover transposons (McClintock, 1950) (Fig. 5C). Transposable elements are thought to be responsible for the majority of mosaic patterns in angiosperms, such as the one described in carnation (*Dianthus carophyllus*) flowers by Itoh *et al.* (2002), although viruses, a fault in migration of coloured cells and other mechanisms are also candidates for producing these patterns in plants and animals (Caro & Mallarino, 2020). In maize kernels or in flowers, the general principle is that a transposon is inserted within or near a gene or a regulator of the anthocyanin biosynthesis pathway, suppressing (or activating if the gene/regulator is a pathway inhibitor) anthocyanin production.

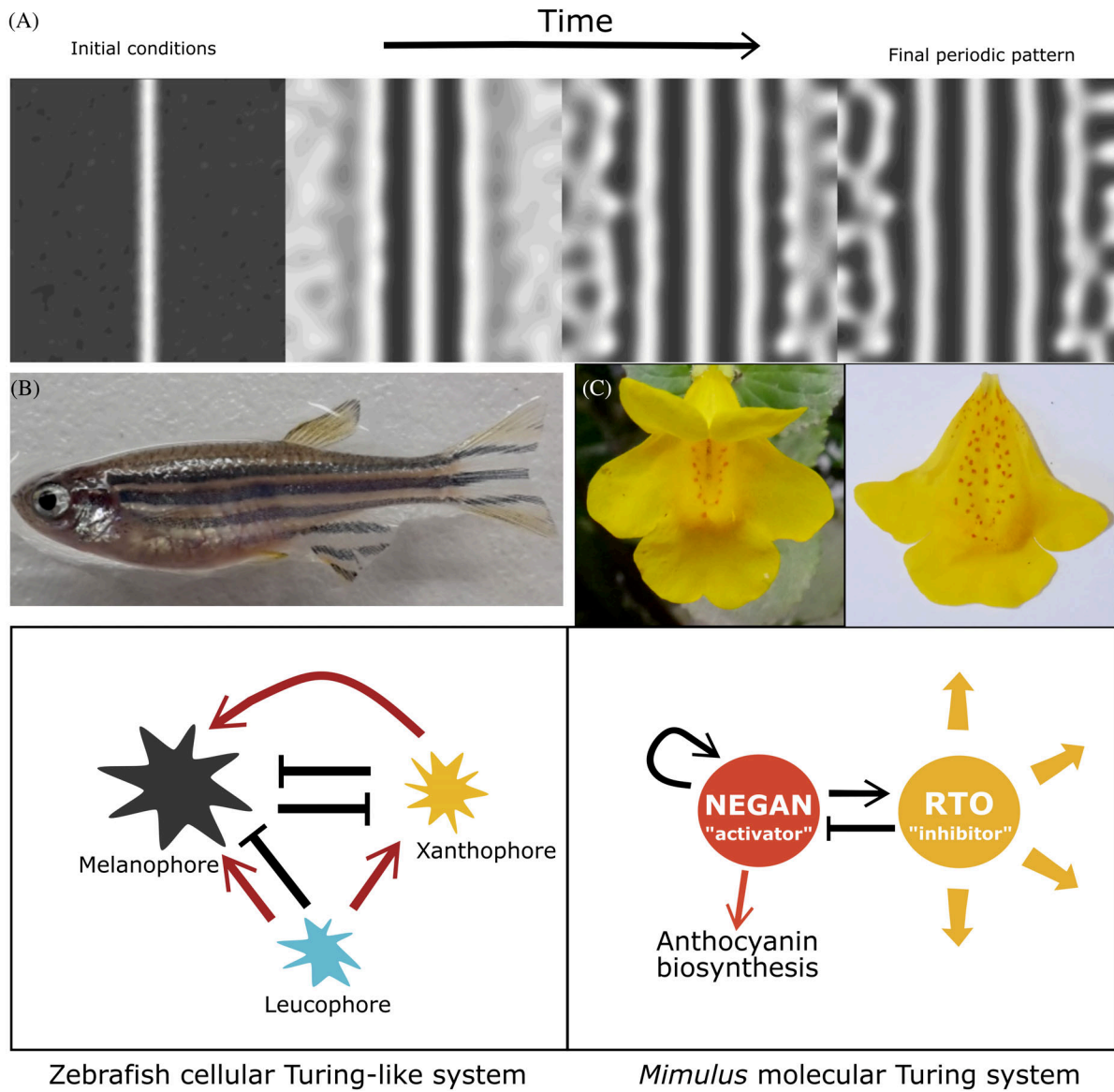


Fig 1. Turing-like mechanisms. (A) Turing systems are able to produce periodic patterns from scratch, or more precisely from random initial conditions. (B) Zebrafish (*Danio rerio*) stripes are produced by a system composed of three coloured cell types: melanophores, xanthophores and leucophores. Red arrows: activation; black T-lines: inhibition. Photograph courtesy of Christine Rampon, Collège de France. (C) *Mimulus* flowers exhibit a spot pattern produced by a Turing system composed of an activator (NEGAN) and an inhibitor (RTO) which interact to control anthocyanin biosynthesis. Red and black arrows: activation, black T-lines: inhibition; large yellow arrows: diffusion.

In every cell where the transposon is excised properly, anthocyanin synthesis can be restored (or suppressed), leading to differences in pigmentation between cells. Because excision is mostly random (but may be induced by stress factors), the distribution of ‘abnormal’ cells, and thus patches of colour, is also random. The size and shape of the coloured patches is determined by the lineage of the mutated cell and the time when excision takes place during development (Fig. 5D).

Such random patterns are also observed on animal skin, mostly on the coats of mammals (Caro & Mallarino, 2020).

The over-representation of mammals may be due to a sampling bias but the most likely hypothesis is that random patterns are rare in wild species but arise frequently in domestic breeds (widespread in mammalian species) from artificial selection (e.g. the coat of Dalmatian dogs) or genetic drift. The reason why these patterns are relatively infrequent in natural populations may be due to the genetic instability of the colouration mechanisms entailing non-Mendelian transmission from one generation to the next (Kaelin & Barsh, 2013), or alternatively these phenotypes may be counter-selected.

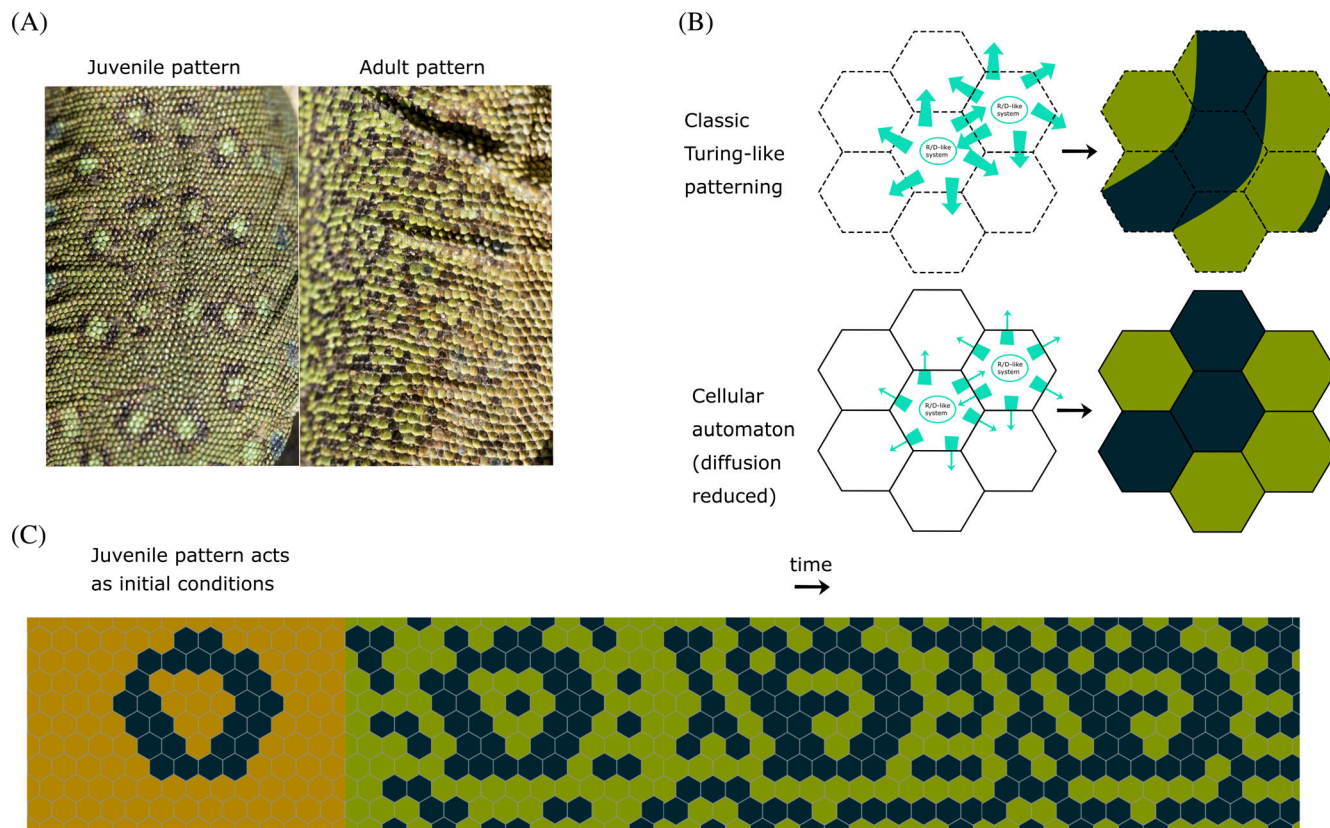


Fig 2. Cellular automaton mechanisms. A cellular automaton produces the black and green repeated pattern of the ocellated lizard *Timon lepidus*. (A) Juvenile and adult patterns. Photograph courtesy of Françoise Serre Collet, MNHN. (B) Unlike classic Turing patterning, the cellular automaton produces a discrete pattern by strongly reducing diffusion at the scale borders (R/D: reaction/diffusion). (C) The brown and white juvenile pattern acts as the initial conditions to produce the adult pattern. The colour state of a given scale is determined by the colour state of its six neighbouring scales.

(6) Neuromuscular

The skin of many cephalopods is adorned with periodic colour patterns, which are presumably produced by cellular Turing-like mechanisms and involve both pigments and structural colours (Williams *et al.*, 2019). Furthermore, like chameleons, many cephalopod species are able rapidly to change the colour of their epidermis, usually by making all or part of their pattern appear or disappear (Chiao & Hanlon, 2019) by changing the morphology of colour cells through neuromuscular control (Y.C. Liu, W.C. Wang & B. Grasse, in preparation) (Fig. 6).

In addition, and because of their ability to desynchronize the appearance and disappearance of parts of these patterns, some cephalopod species produce a unique type of repeated pattern. This consists of a striped pattern of black and white bands which appear to move in dynamic waves along their bodies (How *et al.*, 2017) (Fig. 6). Some species are characterized by bands with an antero-posterior movement, others display a postero-anterior movement and some are able to generate multi-directional waves. The processes underlying these dynamic patterns remain elusive but there are two main hypotheses: either they are generated by neuronal activity or by electrically coupled autonomous muscular

activity (Y.C. Liu, W.C. Wang & B. Grasse, in preparation) (Fig. 6). This is the only example we could find of dynamic repeated colour patterning.

(7) Printing

Shells exhibit some of the most beautiful and diverse exoskeleton colour patterns to be found in animals. Since the 1970s, extensive theoretical work has been carried out to devise models of the formation of these patterns (for a review see Meinhardt, 2009). More recently, functional studies have begun to shed some light on the biological mechanisms underlying the formation of these colour patterns (Jackson *et al.*, 2006; Budd *et al.*, 2014), which are generated by pigmented material produced by the mantle during the secretion of the mineralized structure. Like a printer, the mantle border produces a colour pattern in one dimension which gives by addition a pattern in two dimensions (Fig. 7). The colour state of the border cells is dynamic and changes during shell development, which ultimately results in complex patterns in terms of geometry and colour (see Fig. 7A). Although it is known that colours and mineralized structures are produced by a rapidly evolving secretome (Jackson

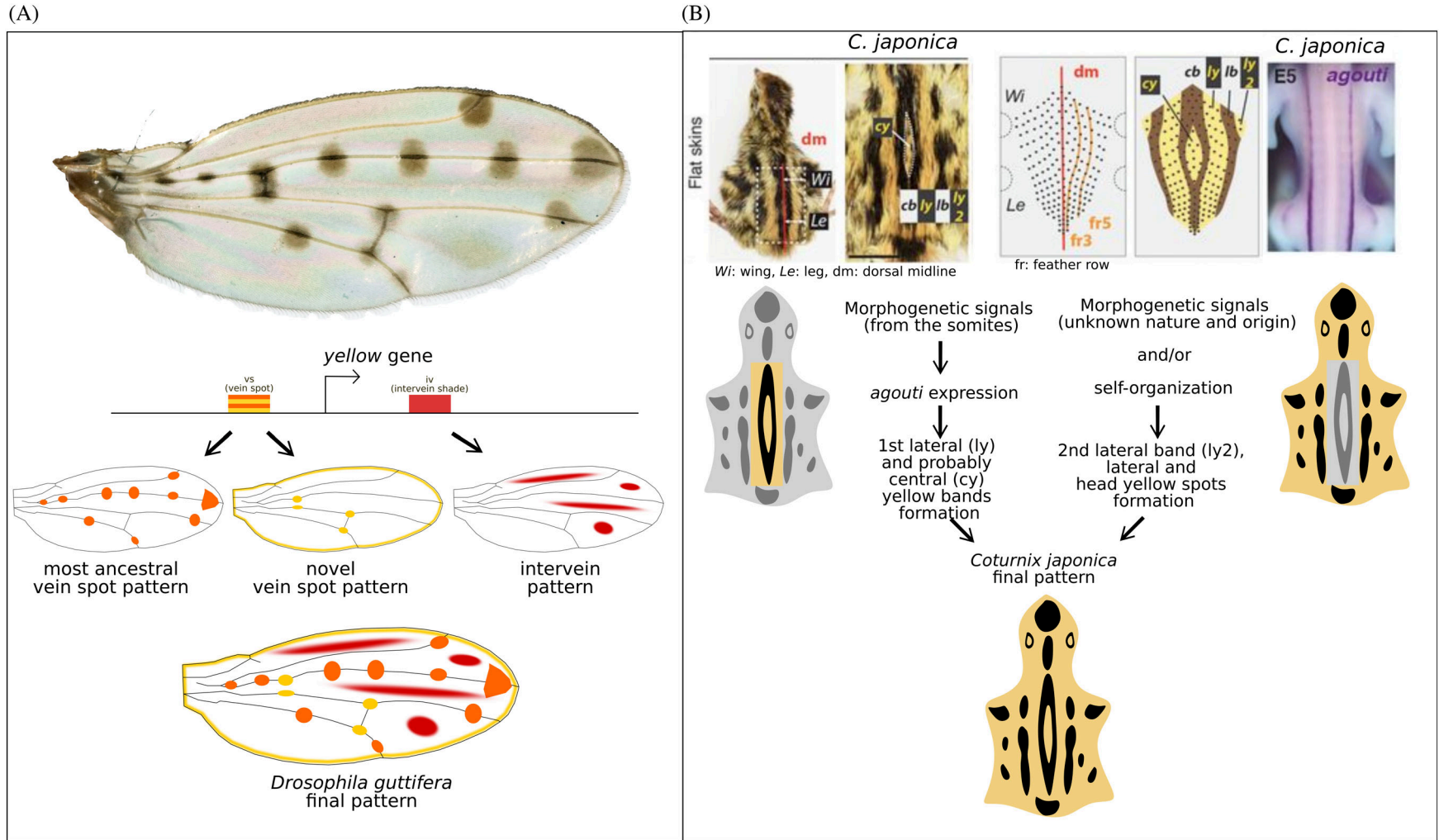


Fig 3. Multi-induction mechanisms. (A) *Drosophila guttifera* wings harbour a black spot pattern, induced by two different *cis*-regulatory elements (CREs) of the *yellow* gene: *vs* (vein spot) and *iv* (intervein shade). Photograph courtesy of Emmanuel Delfosse, MNHN). (B) The striped and dotted black and yellow pattern in quails (*Coturnix japonica*) is produced by at least two independent mechanisms: the central band (*cb*) and the first lateral (*ly*) yellow bands are induced by somite signalling through *agouti* expression. The bands that are in a more lateral position and the dotted pattern on the head, wings and legs are produced by another mechanism of unknown nature, probably a Turing-like mechanism. The upper part is adapted from Haupaix *et al.* (2018).

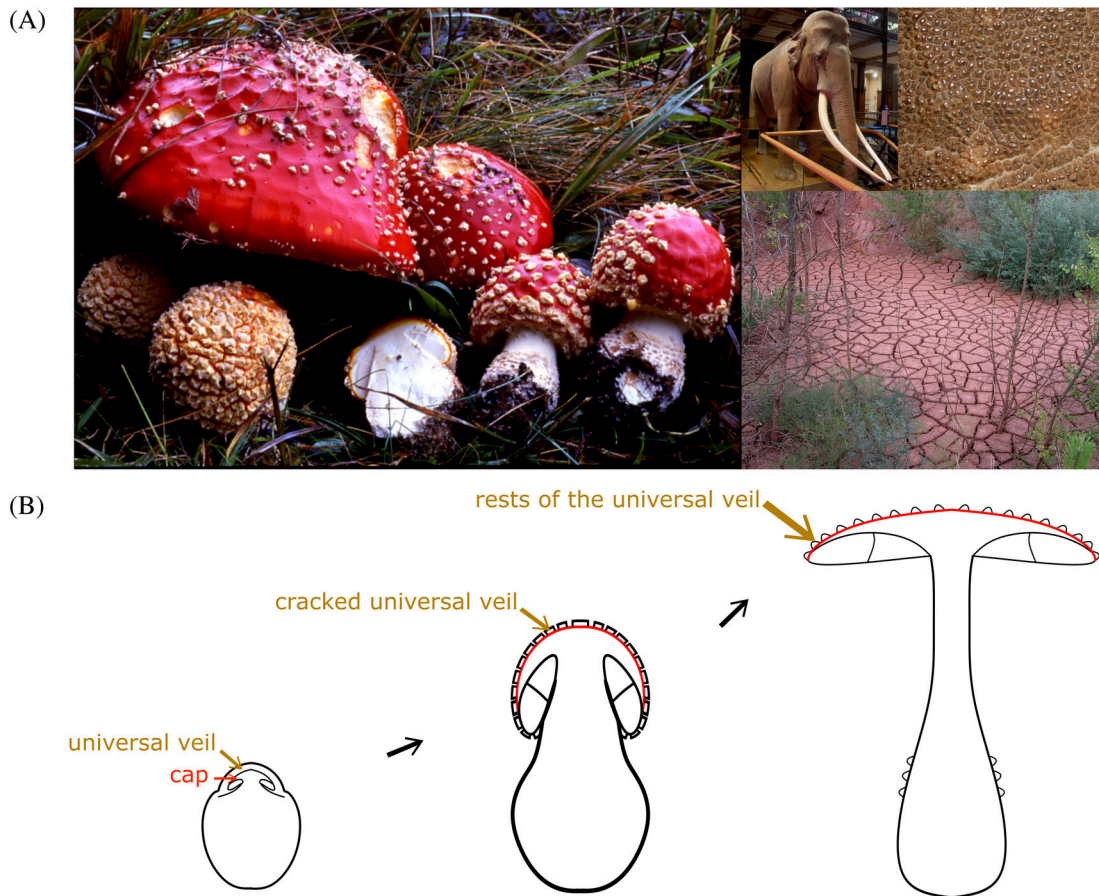


Fig 4. Physical cracking mechanisms. (A) Physical cracking patterns are common in nature: the colour pattern of the fly agaric *Amanita muscaria* (photograph courtesy of Bart Buyck, MNHN), elephant skin, and mud cracks (photograph courtesy of Cyril Langlois) are all produced by the same family of mechanisms. (B) In fly agaric, the white universal veil protects the cap during the first stages of its development then cracks during the expansion of the growing red cap, generating the aposematic colour pattern.

et al., 2006), the nature of the morphogenetic signals remains unknown. Nevertheless, several mechanisms have been suggested, involving Turing-like systems or neural activity (Boettiger & Oster, 2009). The final pattern repetitions stem from two distinct mechanisms: one temporal and one spatial (Fig. 7B–D). The axis of the first mechanism is perpendicular to the border: motifs are repeated along this axis, which means that the mantle is periodically in the same colour production state at different times during development. The axis of the second mechanism is parallel to the border. At a given colour production state, the mantle produces a repeated motif all along its border (e.g. alternating coloured and non-coloured regions). The signals leading to these repeated one-dimensional motifs remain unknown.

III. PATTERN MODIFIERS

Many parameters and pattern modifiers can affect the final aspect of the repeated colour pattern. Here, a factor is

considered as ‘pattern modifier’ if its presence is not required for pattern production, but it affects aspects of the final pattern. These modifiers are common because the systems producing colour patterns rarely act independently and the tissues where these patterns are formed are themselves dynamic. These factors, although classed as secondary, may have strong geometric effects such as redefining the nature of the motifs (stripes, dots, labyrinthine patterns) or their directionality.

Despite the potential impact of pattern modifiers, most studies have focused on primary mechanisms, so that pattern modifiers are still relatively understudied. Table 2 summarizes the six families of pattern modifiers we propose herein. The second and third rows of Table 2 illustrate and describe how a pattern modifier can affect a pattern, in this case a periodic pattern.

(1) Effect of initial conditions and forcing

These two classical mechanisms, which are not specific to colour patterning, interact with dynamic systems and can be differentiated by their timing. Initial conditions define the state of the system at the beginning of colour pattern

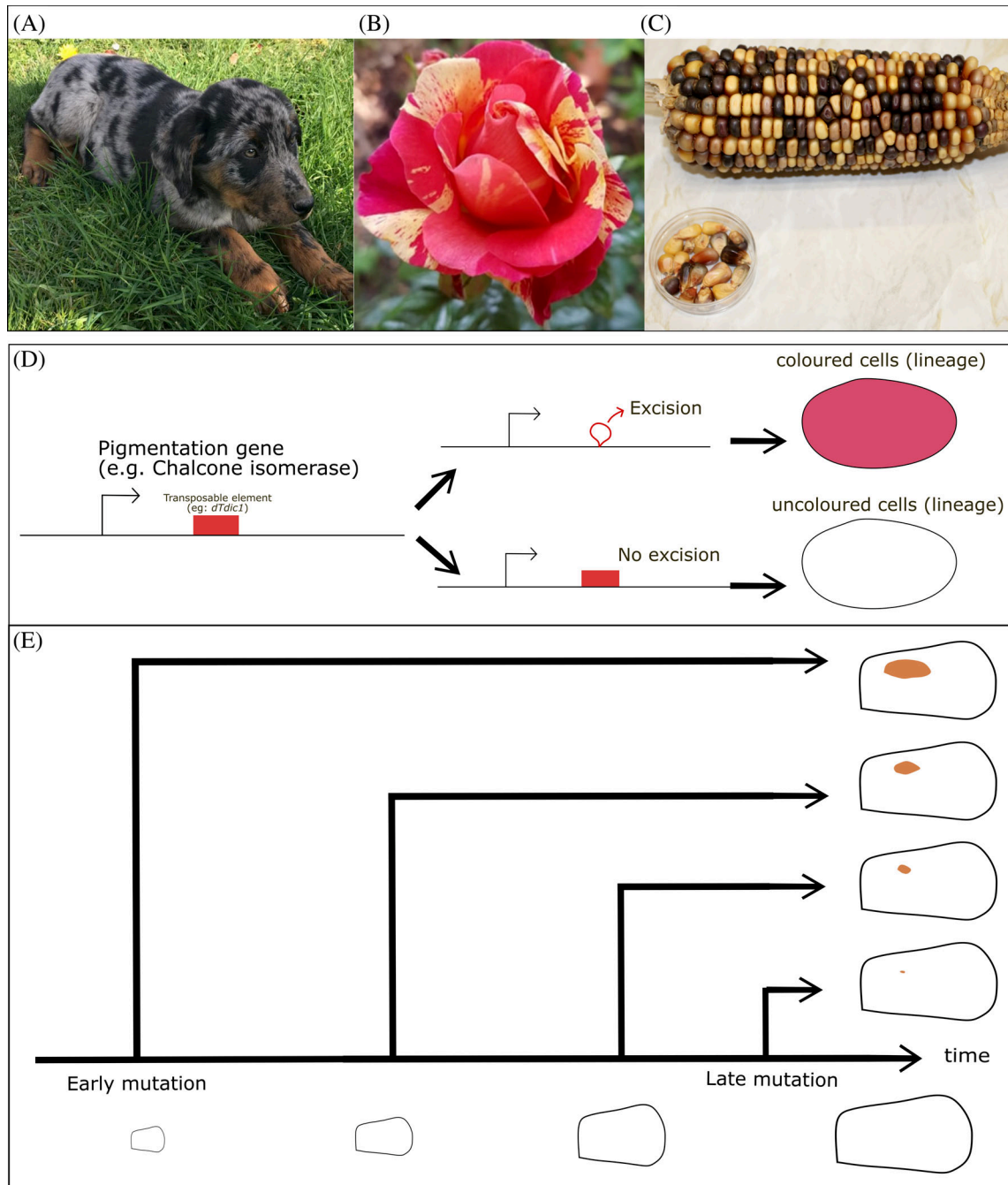


Fig 5. Random mechanisms. (A) An Australian shepherd dog (*Canis lupus*, photograph courtesy of Émilie P.) harbouring a merle coat. (B, C) Flecked patterns of a rose cultivar (*Rosa* spp.) and maize kernels (*Zea mays*). Educational collection of the Biology Department of the École Normale Supérieure de Lyon, photograph courtesy of Jean-Pierre Moussus. (D) The transposon mechanism responsible for many random colour patterns on flower petals with the example of the carnation (*Dianthus caryophyllus*) ‘Rhapsody’ cultivar. (E) Geometry of the final pattern is determined by the timing of the mutation and the lineage of the mutated cells.

formation. Modifying the initial conditions can have a strong effect on the final pattern as in many cases the system keeps a memory of its initial state (Arcuri & Murray, 1986). For example, in a classical Turing system, if the initial state is uniform with the exception of one stripe, under certain conditions this will impose a striped

pattern at the final state. Without this initial stripe and with no other external effector, the pattern would have been anisotropic [with no preferential direction (Kondo & Miura, 2010)].

The mechanisms that determine the initial conditions are assumed not to interact with the system as the system starts

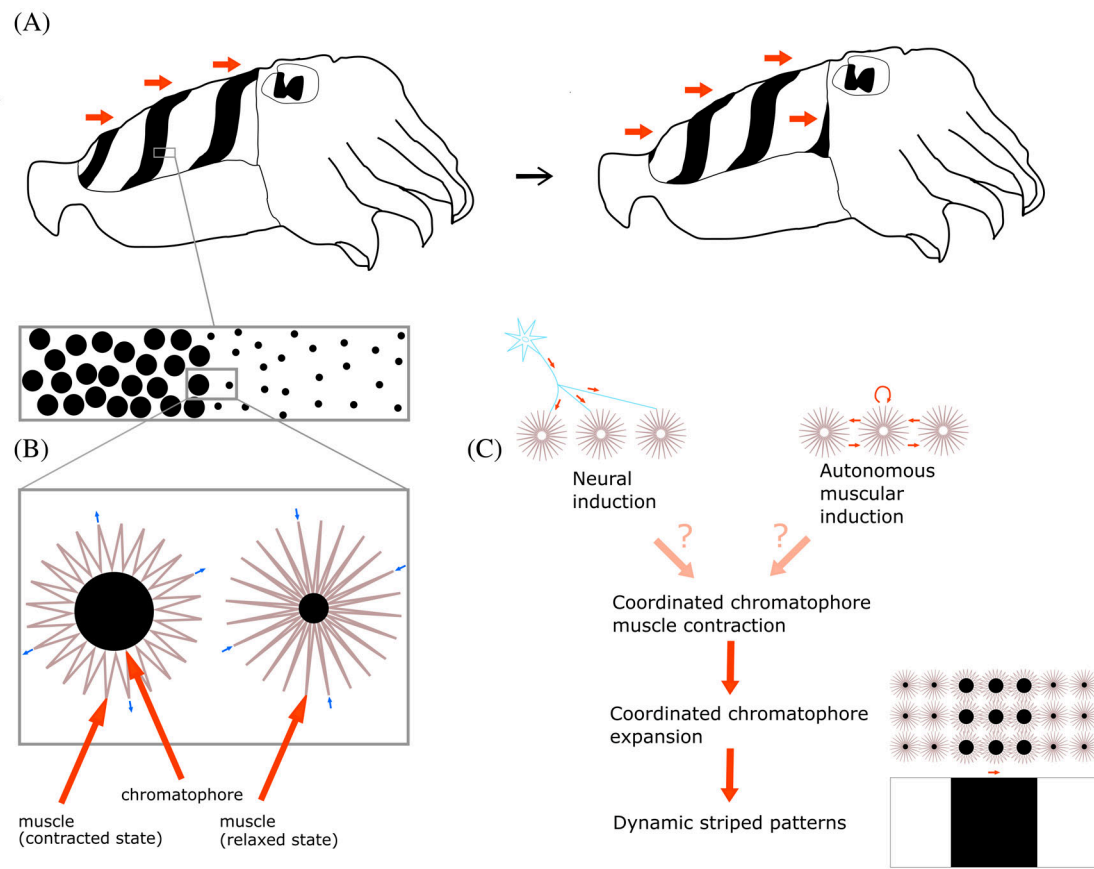


Fig 6. Neuromuscular mechanisms in cephalopods. (A) Many cephalopod species are able to produce repeated patterns (typically stripes) which move dynamically on the skin like waves. (B) The contraction and relaxation of the muscles associated with the chromatophores generates colour change. (C) Neuromuscular wave patterns are probably generated by neural induction or autonomous muscular induction.

to ‘run’. Mechanisms that do interact with the system during patterning are called forcing. Whether influenced by the initial conditions or by forcing, the nature of the interaction can be direct [e.g. the juvenile pattern acts as an initial condition for the automaton pattern in ocellated lizards (Manukyan *et al.*, 2017)], or indirect [e.g. the zebrafish myoseptum – a lateral structure – influences the migration of colour cells, imposing an antero-posterior directionality to the pattern (Frohnhofer *et al.*, 2013)]. Boundary conditions, which determine how the system behaves at its borders, form a part of this pattern modifier family, and can be seen both at the initial conditions and during forcing.

Furthermore, using timing to distinguish between initial conditions and forcing is challenged by the existence of mechanisms that interact with the system before and during the patterning process, thus being both initial conditions and forcing interactors.

(2) Tissue growth and deformation

The first and trivial effect of tissue growth is to deform the tissue geometry, and consequently the pattern, after its establishment. Indeed, like many other parts of the organism,

coloured tissues frequently undergo differential growth during development (and/or less frequently size reduction), which leads to allometric scaling and pattern distortion. The second effect of growth is to produce colour patterns directly, as described above for physical cracking. A third effect can be seen when tissues grow during patterning, if the pattern mechanism is sensitive to scale effects (Kondo & Shirota, 2009), as in Turing systems. In this case, growth is able to disrupt patterning by displacing equilibria (Crampin, Hackborn & Maini, 2002) and therefore creates new motifs and colour associations that could not exist without growth. For example, the rosettes of an adult leopard are derived from juvenile dots, which have been disrupted by skin growth and rearranged into rosettes (Liu, Liaw & Maini, 2006).

(3) Out-of-equilibrium patterning

Many pattern formations are dynamic, starting with initial conditions and culminating with a final state where the system has reached (or not) an equilibrium. The timing and duration of this competency period could have strong effects on the overall pattern. In particular, if the competency stops

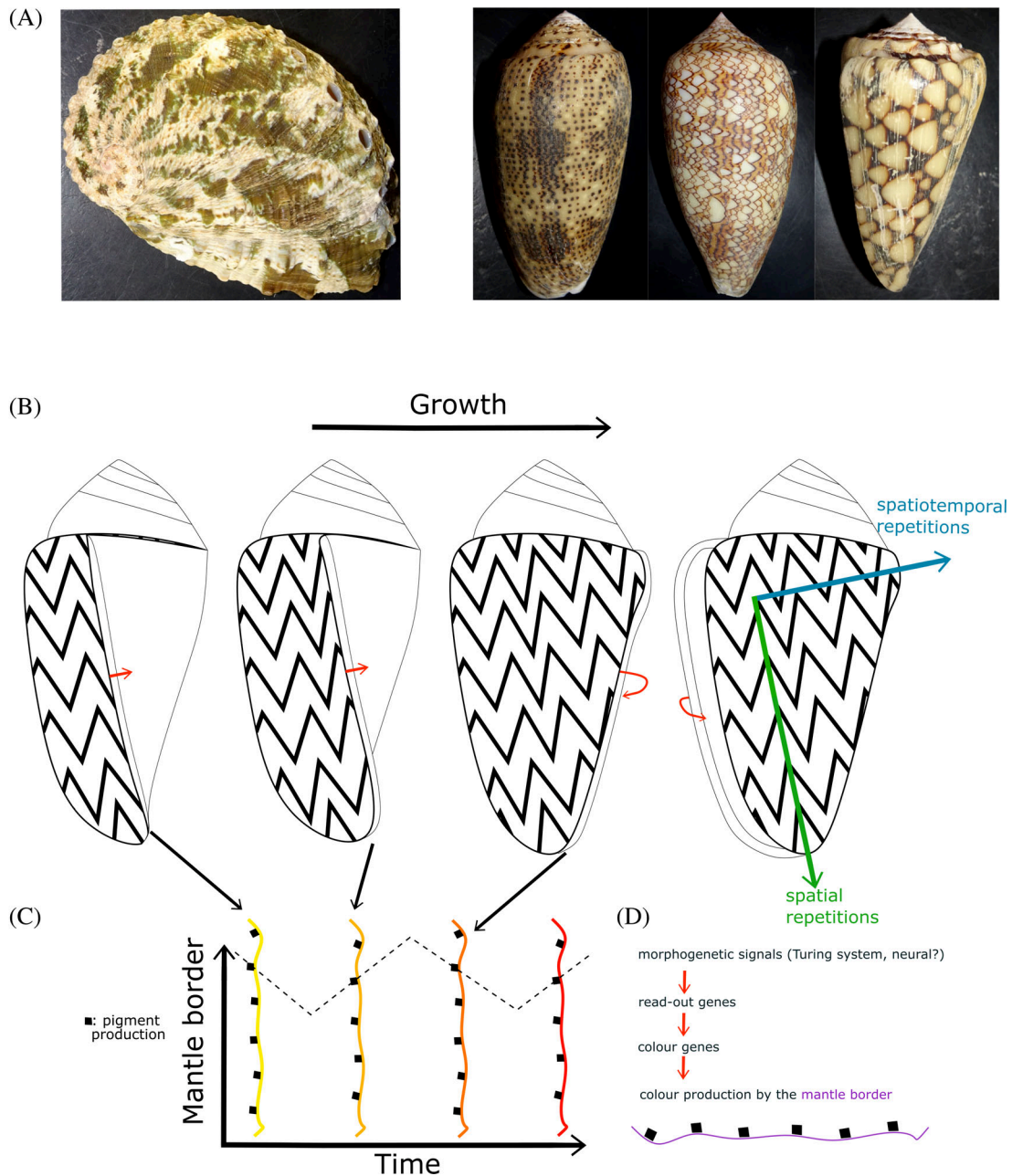


Fig 7. Printing mechanisms in mollusc shells. (A) Many gastropods exhibit striking repeated colour patterns on their shells. Left, colour pattern of *Haliotis asinina*, a species used for the transcriptomic analysis of colour and mantle production (M11/BC 566, MNHN, Paris). Right, diverse repeated colour patterns of Conidae species (IM-2013-12451, IM-2013-46951, IM-2013-47292; MNHN, Paris). (B) Repeated patterns on shells are produced by the mantle during shell growth. (C) The colour state of the mantle produces a spatial repetition parallel to the shell border. The temporal evolution of the mantle colour state determines the orthogonal spatiotemporal repetitions. (D) The morphogenetic signals responsible for these patterns remain unknown but could have a neural origin.

before the system reaches equilibrium, it generates out-of-equilibrium patterns characterized by intermediate features [i.e. intermediate colours or shapes (band insertions)]. Some species exhibit colour patterns with no end-of-competency (e.g. leopards), which means that patterns continuously evolve and respond to perturbations (typically growth) (Kondo & Asai, 1995). This does not mean that out-of-equilibrium

patterns do not exist in these species, but that they are only transient.

(4) Colour production

Most of the time, patterns are established first as signals that are not colours. These pre-patterns are then interpreted into

colours. This two-step process could transform and add complexity to the pattern [e.g. with a multiple threshold system like the French Flag model (Wolpert, 1969)]. For example, many butterfly species exhibit conspicuous eyespots on their wings. The position of the centre of an eyespot seems to be determined by a Turing-like mechanism involving the expression of *Dll* (*Distal-less*) in the imaginal disc. After that, another system takes over to produce complex patterns that consist of several concentric circles (or arcs) of different colours (Connahts *et al.*, 2019).

(5) 3D ornamentations

In this review, we chose to simplify the structure of external colour tissues by considering them as more or less flat. Nevertheless, many species harbour 3D ornamentations (reliefs or appendages such as hairs, scales or feathers) that add a layer of complexity that can accentuate repeated colour patterns.

(6) Rapid changes in colour and pattern

While many species harbour colour patterns that change over a relatively long period of time (for example during the juvenile-to-adult transition), some species of chameleons and cephalopods are able to change their colour patterns rapidly and reversibly (within seconds or minutes), adding a layer of complexity to repeated colour patterns (Ligon & McCartney, 2016).

IV. DISCUSSION

(1) Distribution of the different families of mechanisms across the phylogeny of eukaryotes

The mechanisms for producing colour are very diverse across the eukaryotic tree of life, and affect different structures, tissues and cell types. Nevertheless, similar mechanisms have evolved

repeatedly in phylogenetically distant clades. As discussed above, this is the case for the production of periodic patterns from Turing-like systems, which have been described in animals (i.e. fish, but likely in many other clades) and plants (i.e. *Mimulus* and also likely in many other clades). The distribution of the different families of mechanisms discussed herein is mapped onto a phylogeny of eukaryotes in Fig. 8. Although this phylogeny is far from representative of the taxonomic diversity of the eukaryotic models studied in terms of repetitive colour patterns, some (five of the seven) primary mechanisms are described for only a limited number of species to date. Consequently, the list is therefore exhaustive (i.e. up to date with the literature) for these five primary mechanisms (i.e. Turing-like, physical cracking, neuromuscular, printing and cellular automaton). The two other families of mechanisms (random and multi-induction) are shown for a selection of representative examples. Furthermore, some families of mechanisms have only been described in a limited number of species but, as in the case of Turing-like systems, are believed to be responsible for repeated colour patterns in many species that have not yet been documented. Others, like the neuromuscular family of mechanisms described in gastropods, are unlikely to be found in other taxa.

Among the seven primary mechanisms that we have defined, four seem to be restricted to a single taxon (physical cracking in *Amanita* fungi, cellular automaton in ocellated lizards, printing on mollusc shells, and neuromuscular mechanisms in cephalopods) and another one (random) seems rare in wild species. This means that almost all the known diversity of repeated patterns is likely to be produced by Turing-like or multi-induction as well as yet undiscovered mechanisms.

(2) Strengths and limitations of our classification of primary mechanisms

Although diverse repeated colour patterns have been described, our theoretical and experimental knowledge

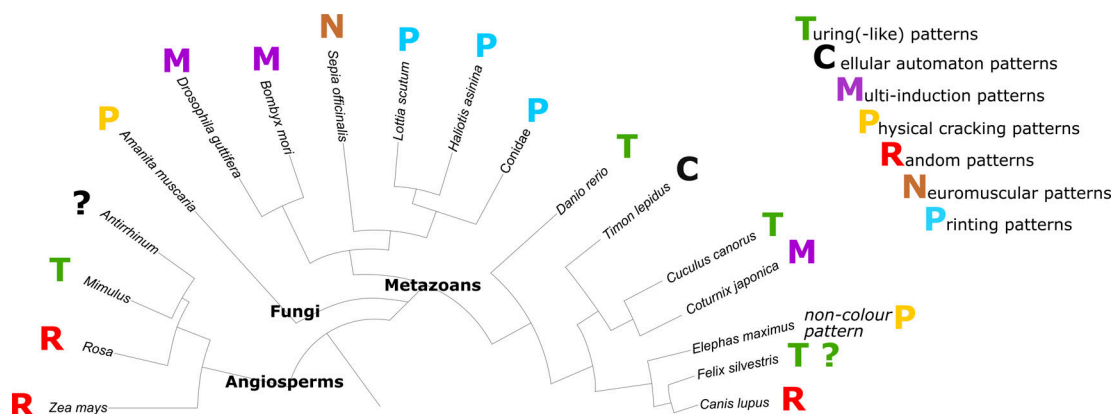


Fig 8. Summary of the eukaryotic taxa described in this review, and of the different families of mechanisms responsible for repetitive colour patterns, mapped on a phylogenetic tree built from NCBI Taxonomy database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi?fbclid=IwAR1pRMTFDhM8jw438eCoIp6lh8eykg8qpO8h6HR-HFojQRT6gOQVNnyCItY>) using the ‘Common Tree’ tool based on a diverse array of resources (NCBI taxonomy database). The tree file was uploaded and visualized using ITOL (Interactive Tree of Life) software (<https://itol.embl.de/>, 5.6.3 version).

regarding the underlying mechanisms is still fragmented. The classification system we propose herein reflects the current knowledge in this field and will need updating when new mechanisms are inevitably discovered.

Characterizing the geometry of a given colour pattern provides valuable clues regarding the possible underlying mechanisms and also can be an indicator of other features, such as population genetic health (see Larison *et al.*, 2021). Indeed, several of the seven families of mechanisms we defined produce characteristic patterns (i.e. random patterns produced by random mechanisms, labyrinths produced by cellular automaton mechanisms, cracks produced by physical cracking mechanisms).

However, many of the other families of mechanisms are able to produce periodic patterns (i.e. Turing(-like), neuromuscular, printing and to a lesser extent multi-induction mechanisms), which underlines the need for caution when inferring mechanisms from phenotypes, as this is not a one-to-one relationship. Functional investigations remain essential. A single family of mechanisms, defined by certain characteristics, can involve different processes. For example, Turing(-like) mechanisms can rely on reaction–diffusion systems of chemical compounds (such as those conceived by Alan Turing), but also on systems based on cell–cell interactions [e.g. zebrafish (Frohnhofer *et al.*, 2013)]. Similarly, random pattern production involves very different processes [e.g. transposon insertion/excision, X chromosome inactivation, defective neural crest migration (Caro & Mallarino, 2020)]. Admittedly, although the mechanisms assigned to a given family are undoubtedly similar, the way we organized them into families was also influenced by the patterns they produce.

Additionally, it has to be noted that Turing systems are not restricted to the periodic patterns obtained from the mechanisms grouped in the family we referred to as Turing-like. They can also play (or are believed to play) indirect roles by acting upstream and/or in conjunction with other families of mechanisms (like cellular automaton, printing, or neuromuscular). The almost ubiquitous involvement of Turing systems in many different processes underlines their importance in nature, and in particular in colour patterning. If the suspected roles of Turing systems are confirmed, it might be valuable to consider an additional super-family, called ‘Turing-related mechanisms’, containing all the families of mechanisms that directly or indirectly involve Turing systems.

(3) Evolutionary and mechanistic coupling between the repetition of structural units and colouration: three ways to organize colours into repeated patterns

The production of a repeated colour pattern requires (i) the production of a repeated structure and (ii) the production of colours. The relationship between the two processes can be very tight from both an evolutionary and a mechanistic perspective, or conversely these processes may be

independent. Consequently, we propose two categories (Type I and Type II; Fig. 9A) representing the diversity of the repetition/colour relationship. This discrete representation does not necessarily capture all the subtleties of repeated colour patterns and is intended as a basis for discussion.

The first type includes instances where the colours and structure are the same (observed in many Turing-like patterns) or when colours are the only repeated structure on the tissue (observed in random patterns, Fig. 9B). Conversely, colours can be produced on a pre-formed repeated structure, which may have functions other than providing colour. The appearance of the repeated structure could precede the appearance of colour during development and may have evolved first. Therefore, through co-option, many repeated structures have been used as a framework to produce repeated colour patterns. We consider two separate cases: either the repeated structure is itself coloured during development [Type II (colouration); Fig. 9C], or the repeated structure serves as a geometric template and its geometry is transferred to a distinct structure that produces colours [Type II (transfer); Fig. 9D].

(a) Type I: entanglement of repetition and colouration: when repetitions are produced directly by colouration

In some cases, repeated colour patterns do not require pre-existing repeated structures. It is the coloured regions themselves that organize and generate repetitions. As an example, patterns generated by random mutations do not rely on pre-existing structures, and consequently repetition and colouration derive from the same event/mechanism. Similarly, zebrafish stripes and the dots of *Mimulus* flowers are produced by colour cells and colour genes, respectively, through the self-organizing processes described above.

This tight link between repetition and colouring does not necessarily mean that these processes evolved simultaneously at the same time. Indeed, we can imagine that in zebrafish, the ability of cells to self-organize into periodic structures appeared during evolution before the ability to produce colours, or *vice versa*.

(b) Type II: colouring a pre-existing repeated structure or transferring pre-existing repeated geometry, when pre-formed repeated structures are co-opted to generate repeated colour patterns

Eukaryotic organisms harbour countless examples of repeated structures, such as the metamer body plan (Couso, 2009) and the repetition of external organs and appendages [e.g. feathers and petals (Diggle, 2014)]. These repeated structures provide an endless toolkit for generating repeated colour patterns, since each repetition only needs to produce a single colour motif to generate a repeated colour pattern on a large scale. Here, the production of the repeated structure is independent from colour production, in terms of timing (repeated structures are produced before colour) and the mechanism involved (the molecules, cellular events and physical forces act in independent pathways).

There are many examples (but few studies) of the production of repeated colour from existing repeated structures in eukaryotes. For instance, the black and white stripes found on the throat of the cuckoo (*Cuculus canorus*) are produced by a succession of bicoloured feathers, giving the impression that a colour mechanism produces these stripes. In fact, this striped pattern results from the combination of a discrete distribution of feathers and a bicolour mechanism. Many experiments and models suggest that the formation and distribution of feather buds result from a reaction–diffusion (and chemotaxis) mechanism (Ho *et al.*, 2019; Bailleul *et al.*, 2019), providing further evidence that repeated colour motifs in nature can rely directly or indirectly on Turing systems.

Repeated colour patterns are commonly reported in metamerous organisms, metamerism being the repetition of structurally similar body segments. The Zebra strain of the silkworm (*Bombyx mori*) harbours a striped black and white pattern (Fig. 9C) that results from the production of a black band on every segment and is controlled by the Toll ligand Spätzle3 (KonDo *et al.*, 2017).

The angiosperm genus *Antirrhinum* is a model for evo-devo studies of floral traits (Whibley *et al.*, 2006). Among the vast range of floral colourations seen in cultivated and wild species, some have striking branching network colourations on the upper petals that have been shown to attract pollinators and guide them to the nectar (Whitney *et al.*, 2013). The pigmentation pattern of the epidermis matches the underlying venation system. Shang *et al.* (2011) showed that venation acts as a spatial frame for anthocyanin production, which is regulated by proteins produced in the epidermis [the bHLH (basic helix–loop–helix) transcription factors DELILA and MUTABILIS] and a protein produced only in cells radiating from the vein [the MYB (myeloblastosis) transcription factor VENOSA] (Fig. 9D).

(4) Seven or more? Discovering novel ways for eukaryotes to produce repeated colour patterns

While the purpose of this review was to define families of the primary mechanisms producing repeated colour patterns in eukaryotes based on the available data, it is likely that additional mechanisms exist in nature and thus our classification is likely to evolve to integrate new findings. We suggest that additional sources of repeated colour patterns could be identified based on two criteria. First, by looking for biological mechanisms that are already known to produce repeated spatial patterns, but which at present are not known to produce any colour patterns. This probably includes many examples of patterns that take advantage of pre-existing repeated structures. Second, by looking for biological mechanisms that produce colour patterns that are not repetitive and imagining how they could produce repetitions as parsimoniously as possible.

(a) Tinkering with pre-existing patterns, a promising toolkit for the evolution of repeated colour patterns

Because of the evolutionary simplicity of using pre-existing repeated structures to generate colour patterns, it could be

expected that pre-existing repeated structures are the source of many unstudied examples of repeated colour patterns. This includes the great diversity of mechanisms responsible for metamerism in many eukaryotes (e.g. the silkworm body plan, Fig. 9C).

(b) Structural colours and repeated patterning

Among the four ways used by animal and plant species to generate colours, namely pigment production, structural colouration, fluorescence (Iriel & Lagorio, 2010; Welch *et al.*, 2012) and bioluminescence (Haddock, Moline & Case, 2010; Viviani, 2002; Weitz, 2004), pigment production and structural colouration account for the large majority of natural colour patterns. Structural colours are responsible for many conspicuous types of colouration and iridescence (when colour changes with the angle of view or the angle of illumination) in almost every animal phylum (Berthier, 2007), as well as in plants [flowers (Whitney *et al.*, 2009), fruits (Vignolini *et al.*, 2012) and leaves (Thomas *et al.*, 2010)]. They are generally produced when light interacts with repeated, more-or-less ordered nanostructures (Berthier, 2007). By taking advantage of the periodicity of light at that scale and of the structures producing these colours, it is possible, at least in theory, to generate periodic patterns at the macroscopic scale (millimetres or centimetres) without relying on any tissue periodicity at the macroscopic scale. As an example, a regular decrease or increase of the crystal pitch along a tissue composed of photonic crystals (one of the structures producing structural colours *in vivo*) could generate repeated macroscopic patterns, typically stripes. Insects, with the tremendous diversity of structural colours exhibited on their cuticles, are a prime target for searching for these kinds of mechanisms.

(c) Mechanochemical induction of repeated colour patterns

So far, colour patterns generated by mechanical forces have only been reported in *Amanita muscaria* (physical cracking). Nevertheless, mechanochemical patterning has recently been attracting strong interest from researchers. According to these models, self-organized mechanical patterns precede chemical and molecular patterns. Many experiments and modelling demonstrate their ability to generate patterns that are similar to those produced by chemical systems, in particular periodic patterns produced by Turing systems (Naganathan & Oates, 2017; Brinkmann *et al.*, 2018). They are therefore prime candidates for the discovery of new colour patterning mechanisms.

V. CONCLUSIONS

(1) Eukaryotes present a remarkable diversity of repeated colour patterns that are generally associated with crucial biological functions. Based on a literature survey, we classified the mechanisms responsible for their formation into seven families, and discuss their relative

importance. Exploring the diversity of repeated colour patterns in eukaryotes and understanding their underlying mechanisms are thriving research topics in evolutionary and developmental biology.

- (2) Relying on the ubiquitous and powerful Turing systems to explain repeated colour patterns should not hinder the progress of research focusing on other types of primary and secondary mechanisms. In addition, we only know a fraction of the likely mechanisms underlying the phenotypic diversity of repeated colour patterns observed in nature, which should motivate a broader investigation of eukaryotic diversity with respect to colour patterning.
- (3) We advocate the use of a classification system of the mechanisms explaining the formation of repeated colour patterns. Providing a unified framework for the way repeated colour patterns are discussed will help promote dialogue between researchers with different backgrounds (e.g. geneticists, developmental biologists, and evolutionary biologists) and will help to build bridges between such disciplines.

VI. ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Institut de Systématique Evolution Biodiversité (ISYEB) and the Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN) for financial support. We are grateful to the curators at the MNHN (Emmanuel Delfosse, Barbara Buge, Nicolas Vidal) who allowed us access to biological specimens, and to Marie Manceau for comments on an earlier version of the manuscript. We warmly thank Morgan Gostel and Hélène Citerne for critically reading our manuscript and making constructive comments. We also thank Pr. Serge Berthier for useful discussions on the potential contribution of physical colours to repeated colour patterns. We thank Shigeru Kondo and one anonymous reviewer for their comments and suggestions. P.G. was supported by a fellowship from ENS de Lyon.

VII. REFERENCES

- ARCURI, P. & MURRAY, J. D. (1986). Pattern sensitivity to boundary and initial conditions in reaction-diffusion models. *Journal of Mathematical Biology* **24**, 141–165.
- BAILLEUL, R., CURANTZ, C., DINH, C. D.-T., HIDALGO, M., TOUBOUL, J. & MANCEAU, M. (2019). Symmetry breaking in the embryonic skin triggers directional and sequential plumage patterning. *PLoS Biology* **17**, e3000448.
- BERTHIER, S. (2007). *Iridescences: The Physical Colors of Insects*. Springer Science & Business Media, Berlin/Heidelberg, Germany.
- BOETTIGER, A. N. & OSTER, G. (2009). Emergent complexity in simple neural systems. *Communicative & Integrative Biology* **2**, 467–470.
- BRINKMANN, F., MERCKER, M., RICHTER, T. & MARCINIAK-CZOCZRA, A. (2018). Post-Turing tissue pattern formation: advent of mechanochemistry. *PLoS Computational Biology* **14**, e1006259.
- BUDD, A., MCDUGALL, C., GREEN, K. & DEGNAN, B. M. (2014). Control of shell pigmentation by secretory tubules in the abalone mantle. *Frontiers in Zoology* **11**, 62.
- CARO, T. & MALLARINO, R. (2020). Coloration in mammals. *Trends in Ecology & Evolution* **35**, 357–366.
- CASTETS, V., DULOS, E., BOISSONADE, J. & DE KEPPEL, P. (1990). Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern. *Physical Review Letters* **64**, 2953–2956.
- CHIAO, C.-C. & HANLON, R. T. (2019). *Rapid Adaptive Camouflage in Cephalopods*. Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience, Oxford, UK. Electronic file available at <https://oxfordre.com/neuroscience/view/10.1093/acrefore/9780190264086.001.0001/acrefore-9780190264086-e-182> Accessed 28.07.2020.
- CONNAHS, H., TLILI, S., VAN CREIJ, J., LOO, T. Y. J., BANERJEE, T. D., SAUNDERS, T. E. & MONTEIRO, A. (2019). Activation of butterfly eyespots by distal-less is consistent with a reaction-diffusion process. *Development* **146**, dev169367.
- COUSO, J. P. (2009). Segmentation, metamerism and the Cambrian explosion. *International Journal of Developmental Biology* **53**, 1305–1316.
- CRAMPIN, E. J., HACKBORN, W. W. & MAINI, P. K. (2002). Pattern formation in reaction-diffusion models with nonuniform domain growth. *Bulletin of Mathematical Biology* **64**, 747–769.
- DIGGLE, P. K. (2014). Modularity and intra-floral integration in metamerism: plants are more than the sum of their parts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, 20130253.
- DING, B., PATTERSON, E. L., HOLALU, S. V., LI, J., JOHNSON, G. A., STANLEY, L. E., GREENLEE, A. B., PENG, F., BRADSHAW, H. D., BLINOV, M. L., BLACKMAN, B. K. & YUAN, Y.-W. (2020). Two MYB proteins in a self-organizing activator-inhibitor system produce spotted pigmentation patterns. *Current Biology* **30**, 802–814.e8.
- ECONOMOU, A. D., OHAZAMA, A., PORNTAVEETUS, T., SHARPE, P. T., KONDO, S., BASSON, M. A., GRITTL-LINDE, A., COBOURNE, M. T. & GREEN, J. B. A. (2012). Periodic stripe formation by a Turing-mechanism operating at growth zones in the mammalian palate. *Nature Genetics* **44**, 348–351.
- ELIAS, M. (2019). Evolution of aposematism and mimicry in butterflies: causes, consequences and paradoxes. *Comptes Rendus Biologies* **342**, 256–258.
- FROHNHÖFER, H. G., KRAUSS, J., MAISCHEIN, H.-M. & NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (2013). Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish. *Development* **140**, 2997–3007.
- FUTAHASHI, R., KURITA, R., MANO, H. & FUKATSU, T. (2012). Redox alters yellow dragonflies into red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 12626–12631.
- HADDOCK, S. H. D., MOLINE, M. A. & CASE, J. F. (2010). Bioluminescence in the sea. *Annual Review of Marine Science* **2**, 443–493.
- HAGEN, H. A. (1881). On the color and the pattern of insects. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* **17**, 234–267.
- HAUPAIX, N., CURANTZ, C., BAILLEUL, R., BECK, S., ROBIC, A. & MANCEAU, M. (2018). The periodic coloration in birds forms through a prepattern of somite origin. *Science* **361**, 631. <https://doi.org/10.1126/science.aar4777>.
- HIMSTEDT, W. (1979). The significance of color signals in partner recognition of the newt *Triturus alpestris*. *Copeia* **1979**, 40–43.
- HO, W. K. W., FREEM, L., ZHAO, D., PAINTER, K. J., WOOLLEY, T. E., GAFFNEY, E. A., MCGREW, M. J., TZIKA, A., MILINKOVITCH, M. C., SCHNEIDER, P., DRUSKO, A., MATTHÄUS, F., GLOVER, J. D., WELLS, K. L., JOHANSSON, J. A., et al. (2019). Feather arrays are patterned by interacting signalling and cell density waves. *PLoS Biology* **17**, e3000132.
- HOW, M. J., NORMAN, M. D., FINN, J., CHUNG, W.-S. & MARSHALL, N. J. (2017). Dynamic skin patterns in cephalopods. *Frontiers in Physiology* **8**, 393.
- IRIEL, A. & LAGORIO, M. G. (2010). Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? *Naturwissenschaften* **97**, 915–924.
- ITOH, Y., HIGETA, D., SUZUKI, A., YOSHIDA, H. & OZEKI, Y. (2002). Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant and Cell Physiology* **43**, 578–585.
- JACKSON, D. J., MCDUGALL, C., GREEN, K., SIMPSON, F., WÖRHEIDE, G. & DEGNAN, B. M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology* **4**, 40.
- KAELIN, C. B. & BARSH, G. S. (2013). Genetics of pigmentation in dogs and cats. *Annual Review of Animal Biosciences* **1**, 125–156.
- KELSH, R. N., HARRIS, M. L., COLANESI, S. & ERICKSON, C. A. (2009). Stripes and belly-spots—a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 90–104.
- KIERZKOWSKI, D., RUNIONS, A., VUOLO, F., STRAUSS, S., LYMBOURIDOU, R., ROUTIER-KIERZKOWSKA, A.-L., WILSON-SÁNCHEZ, D., JENKE, H., GALINHA, C., MOSCA, G., ZHANG, Z., CANALES, C., DELLO IOIO, R., HUIJSER, P., SMITH, R. S., et al. (2019). A growth-based framework for leaf shape development and diversity. *Cell* **177**, 1405–1418.e17.
- KONDO, S. (2017). An updated kernel-based Turing model for studying the mechanisms of biological pattern formation. *Journal of Theoretical Biology* **414**, 120–127.
- KONDO, S. & ASAI, R. (1995). A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish *Pomacanthus*. *Nature* **376**, 376765a0.
- KONDO, S. & MIURA, T. (2010). Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science* **329**, 1616–1620.
- KONDO, S. & SHIROTA, H. (2009). Theoretical analysis of mechanisms that generate the pigmentation pattern of animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 82–89.
- KONDO, Y., YODA, S., MIZOGUCHI, T., ANDO, T., YAMAGUCHI, J., YAMAMOTO, K., BANNO, Y. & FUJIWARA, H. (2017). Toll ligand Spätzle3 controls melanization in

- the stripe pattern formation in caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 8336–8341.
- LARISON, B., KAELEN, C. B., HARRIGAN, R., HENEGAR, C., RUBENSTEIN, D. I., KAMATH, P., ASCHENBORN, O., SMITH, T. B. & BARSH, G. S. (2021). Population structure, inbreeding and stripe pattern abnormalities in plains zebras. *Molecular Ecology* **30**, 379–390.
- LEONARD, A. S. & PAPA, D. R. (2011). 'X' marks the spot: the possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Functional Ecology* **25**, 1293–1301.
- LI, J. H. & ZHANG, L. M. (2011). Study of desiccation crack initiation and development at ground surface. *Engineering Geology* **123**, 347–358.
- LIGON, R. A. & MCCARTNEY, K. L. (2016). Biochemical regulation of pigment motility in vertebrate chromatophores: a review of physiological color change mechanisms. *Current Zoology* **62**, 237–252.
- LIU, R. T., LIAW, S. S. & MAINI, P. K. (2006). Two-stage Turing model for generating pigment patterns on the leopard and the jaguar. *Physical Review E* **74**, 011914.
- MALLARINO, R., HENEGAR, C., MIRASIERRA, M., MANCEAU, M., SHRADIN, C., VALLEJO, M., BERONJA, S., BARSH, G. S. & HOEKSTRA, H. E. (2016). Alx3 regulates the spatial differences in hair pigment underlying stripe patterns in rodents. *Nature* **539**, 518–523.
- MANCEAU, M., DOMINGUES, V. S., LINNEN, C. R., ROSENBLUM, E. B. & HOEKSTRA, H. E. (2010). Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 2439–2450.
- MANUKYAN, L., MONTANDON, S. A., FOFONJKA, A., SMIRNOV, S. & MILINKOVITCH, M. C. (2017). A living mesoscopic cellular automaton made of skin scales. *Nature* **544**, 173–179.
- MARTINS, A. F., BENNETT, N. C., CLAVEL, S., GROENEWALD, H., HENSMAN, S., HOBY, S., JORIS, A., MANGER, P. R. & MILINKOVITCH, M. C. (2018). Locally-curved geometry generates bending cracks in the African elephant skin. *Nature Communications* **9**, 3865.
- MCCLEINTOCK, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **36**, 344–355.
- MEINHARDT, H. (2008). Models of biological pattern formation: from elementary steps to the organization of embryonic axes. In *Current Topics in Developmental Biology* (ed. G. SCHATTEEN), pp. 1–63. Elsevier, Cambridge, MA.
- MEINHARDT, H. (2009). *The Algorithmic Beauty of Sea Shells*, Fourth Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- MICHELOT, D. & MELENDEZ-HOWELL, L. M. (2003). *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research* **107**, 131–146.
- MILINKOVITCH, M. C., MANUKYAN, L., DEBRY, A., DI-POI, N., MARTIN, S., SINGH, D., LAMBERT, D. & ZWICKER, M. (2013). Crocodile head scales are not developmental units but emerge from physical cracking. *Science* **339**, 78–81.
- NAGANATHAN, S. R. & OATES, A. C. (2017). Mechanochemical coupling and developmental pattern formation. *Current Opinion in Systems Biology* **5**, 104–111.
- NAGASHIMA, Y., TSUGAWA, S., MOCHIZUKI, A., SASAKI, T., FUKUDA, H. & ODA, Y. (2018). A rho-based reaction-diffusion system governs cell wall patterning in metaxylem vessels. *Scientific Reports* **8**, 1–17.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C. & SINGH, A. P. (2017). How fish color their skin: a paradigm for development and evolution of adult patterns: multipotency, plasticity, and cell competition regulate proliferation and spreading of pigment cells in Zebrafish coloration. *BioEssays* **39**(3).
- SHANG, Y., VENAIL, J., MACKAY, S., BAILEY, P. C., SCHWINN, K. E., JAMESON, P. E., MARTIN, C. R. & DAVIES, K. M. (2011). The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*. *New Phytologist* **189**, 602–615.
- SICK, S., REINKER, S., TIMMER, J. & SCHLAKE, T. (2006). WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science* **314**, 1447–1450.
- SMALL, S. & LEVINE, M. (1991). The initiation of pair-rule stripes in the *Drosophila* blastoderm. *Current Opinion in Genetics & Development* **1**, 255–260.
- SMITH, M. Q., R. P. & RUXTON, G. D. (2020). Camouflage in predators. *Biological Reviews* **95**, 1325–1340.
- STUART-FOX, D. & MOUSSALLI, A. (2009). Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 463–470.
- TANAKA, Y., SASAKI, N. & OHMIYA, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **54**, 733–749.
- THOMAS, K. R., KOLLE, M., WHITNEY, H. M., GLOVER, B. J. & STEINER, U. (2010). Function of blue iridescence in tropical understory plants. *Journal of the Royal Society Interface* **7**, 1699–1707.
- TURING, A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **237**, 37–72.
- VIGNOLINI, S., RUDALL, P. J., ROWLAND, A. V., REED, A., MOYROUD, E., FADEN, R. B., BAUMBERG, J. J., GLOVER, B. J. & STEINER, U. (2012). Pointillist structural color in Pollia fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 15712–15715.
- VIVIANI, V. R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1833–1850.
- WATANABE, M. & KONDO, S. (2015). Is pigment patterning in fish skin determined by the Turing mechanism? *Trends in Genetics* **31**, 88–96.
- WEITZ, W. H. J. (2004). Naturally bioluminescent fungi. *Mycologist* **18**, 4–5.
- WELCH, V. L., VAN HOOIJDONK, E., INTRATER, N. & VIGNERON, J.-P. (2012). Fluorescence in insects. The Nature of Light: Light in Nature IV. Proc. SPIE 8480, 848004-1–848004-15.
- WERNER, T., KOSHIKAWA, S., WILLIAMS, T. M. & CARROLL, S. B. (2010). Generation of a novel wing colour pattern by the wingless morphogen. *Nature* **464**, 1143–1148.
- WHIBLEY, A. C., LANGLADE, N. B., ANDALO, C., HANNA, A. I., BANGHAM, A., THÉBAUD, C. & COEN, E. (2006). Evolutionary paths underlying flower color variation in *Antirrhinum*. *Science* **313**, 963–966.
- WHITNEY, H. M., KOLLE, M., ANDREW, P., CHITTKA, L., STEINER, U. & GLOVER, B. J. (2009). Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science* **323**, 130–133.
- WHITNEY, H. M., MILNE, G., RANDES, S. A., VIGNOLINI, S., MARTIN, C. & GLOVER, B. J. (2013). The influence of pigmentation patterning on bumblebee foraging from flowers of *Antirrhinum majus*. *Die Naturwissenschaften* **100**, 249–256.
- WILLIAMS, T. L., SENFT, S. L., YEO, J., MARTÍN-MARTÍNEZ, F. J., KUZIRIAN, A. M., MARTIN, C. A., DiBONA, C. W., CHEN, C.-T., DINNEEN, S. R., NGUYEN, H. T., GOMES, C. M., ROSENTHAL, J. J. C., MACMANES, M. D., CHU, F., BUEHLER, M. J., et al. (2019). Dynamic pigmentary and structural coloration within cephalopod chromatophore organs. *Nature Communications* **10**, 1004.
- WOLPERT, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of Theoretical Biology* **25**, 1–47.
- YANGT, Z. L. & OBERWINKLER, F. (1999). Die Fruchtkörperentwicklung von *Amanita muscaria* (Basidiomycetes). *Nova Hedwigia* **68**, 441–468.
- YU, D. & SMALL, S. (2008). Precise registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in *Drosophila*. *Current Biology* **18**, 868–876.

(Received 5 January 2021; revised 29 March 2021; accepted 31 March 2021; published online 6 May 2021)

Chapitre III

Discussion

Les rôles des phénomènes cellulaires (microscopiques) dans l'établissement de caractéristiques macroscopiques, (la taille et la forme du pétale), et leur implication dans les liens entre forme et taille, révélés par l'étude menée sur le pétale de *Nigella damascena*

Morphogenèse et croissance sont liées par de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération et l'expansion cellulaire. Que nous révèle le pétale de la nigelle sur leurs rôles respectifs, et leurs régulations ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les changements de forme et la croissance de la partie dorsale du pétale de *Nigella damascena* se font grâce aux mêmes deux mécanismes cellulaires : prolifération et expansion. Nous pouvons donc nous demander ce que cela implique en termes de régulation. En particulier peut-on imaginer que les contrôles respectifs de la forme et de la croissance puissent être indépendants, alors même qu'ils reposent sur les mêmes processus ? Bien qu'une réponse absolue ne puisse être apportée à partir de notre étude, des pistes intéressantes émergent de l'analyse des distances entre points de repère (Figure 5 de l'étude présentée au chapitre 1). Pour rappel, le but de cette partie était de faire le lien entre certaines caractéristiques microscopiques (nombre de cellules, taille des cellules) et des caractéristiques macroscopiques qui en découlent (forme du pétale). L'ensemble des distances entre points de repère contenant la même information de forme que la position desdits points de repère, l'étude du nombre de cellules et de leur taille moyenne séparant deux points de repère apporte donc des informations quant au processus préférentiel (division cellulaire ou expansion) qui entraîne les changements de forme. Tout d'abord, grâce à la comparaison entre trois stades (jeune, intermédiaire, mature), il a été mis en évidence que dans les stades précoces (de jeune à intermédiaire), qui sont ceux où la forme change le plus, la contribution relative de la division cellulaire est prépondérante par rapport à l'expansion cellulaire. En revanche, cette dernière

prend le pas ensuite (d'intermédiaire à mature), qui sont les stades où la taille augmente fortement mais où la forme change peu. On pourrait imaginer qu'il aurait été difficile qu'il en soit autrement à cause de la présence d'une phase de prolifération précoce, suivie d'une phase d'expansion et qu'en somme ces résultats ne sont que le reflet de la phase dans lequel le pétale se trouve.

Néanmoins, si l'on regarde les landmarks par paires, nous nous rendons compte que les contributions relatives de la prolifération et de l'expansion cellulaire sont très différentes d'une paire à l'autre. En particulier, quand nous classons les paires par ordre croissant d'augmentation de la distance entre deux stades, nous observons que là où la distance inter-landmarks augmente le plus (c'est-à-dire les points à droite de la Figure 5 du chapitre 1), c'est la prolifération cellulaire qui domine. Au contraire, là où la distance inter-landmarks augmente pas ou peu entre les deux stades (à gauche de la figure), la prolifération cellulaire est minime par rapport à l'expansion. Il semblerait donc que la prolifération cellulaire soit le paramètre qui contrôle préférentiellement l'évolution différentielle des distances entre paires de points de repère. Or, des changements relatifs dans les distances entre points de repère, c'est exactement la définition d'un changement de forme, ce qui suggère fortement un rôle morphogénétique pour la prolifération cellulaire, là où l'expansion cellulaire serait plus homogène sur le tissu et ne participerait que peu aux changements de forme.

Il serait très intéressant à présent d'étendre cette étude au reste du pétale voire à d'autres organes (pour rappel, le focus a été fait sur la partie dorsale de l'urne du pétale, seul domaine permettant à la fois une analyse cellulaire et morphométrique), à d'autres espèces de nigelles mais également au-delà, en particulier chez d'autres genres de Ranunculaceae. En particulier, à quel point ce rôle morphogénétique de la prolifération se retrouve dans d'autres contextes ? Par ailleurs, chez ces espèces d'angiospermes où la prolifération aurait un rôle morphogénétique, est-ce qu'elle serait aussi à l'origine des différences morphologiques entre espèces ? Le paragraphe suivant va poursuivre cette réflexion en s'intéressant à ce qui est connu sur la

formation des éperons, apparus chez de nombreuses lignées d'Angiospermes, y compris dans la tribu sœur de celle qui regroupe les nigelles, les Delphinieae.

Les éperons des pétales des angiospermes : des convergences évolutives associées à la diversité de leurs mécanismes de formation.

Si l'urne de *Nigella damascena* a une profondeur relativement faible, de nombreuses espèces d'Angiospermes présentent des éperons sur leurs pétales (Figure 17), y compris le groupe frère des Nigelleae, les Delphinieae (pour la relation entre Delphinieae et Nigelleae, voir : Zhai et al. 2019, Lehtonen, Christenhusz, and Falck 2016, Carrive et al. 2020, pour la diversité des éperons chez les Delphinieae, voir : Zalko et al. 2021). Les éperons sont des structures creuses et allongées, dont le fond ou le plancher est souvent nectarifère, contraignant le pollinisateur qui souhaite prélever le nectar à s'approcher au plus près des autres organes de la fleur, en particulier les étamines, ce qui améliore la pollinisation. Ils font l'objet de coévolutions spectaculaires (Whittall and Hodges 2007, Pauw et al. 2017).

Dans la partie dorsale du pétale de *N. damascena*, nous avons montré que la prolifération est prépondérante par rapport à l'expansion cellulaire dans le processus morphogénétique de formation de la poche nectarifère. Nous pourrions nous demander si c'est également le cas pour la morphogénèse des éperons. En particulier, chez les Delphinieae l'éperon a une position semblable à celle de l'urne à nectar des nigelles. L'hypothèse que ces deux structures soient homologues, et donc héritées de l'ancêtre commun aux Nigelleae et Delphinieae, est recevable. Toujours chez les Ranunculaceae, des éperons sont également présents chez l'ancolie (Whittall and Hodges 2007), alors que l'ancêtre commun des Ranunculaceae n'en possède pas, ce qui marque une convergence morphologique. De la même manière, l'ancêtre commun des Angiospermes était dépourvu d'éperon nectarifère (Sauquet et al. 2017, Carrive et al. 2020) ce qui implique que les éperons des Ranunculaceae et ceux des autres Angiospermes sont en partie des homoplasies morphologiques, pouvant reposer sur des processus génétiques et développementaux potentiellement très différents.

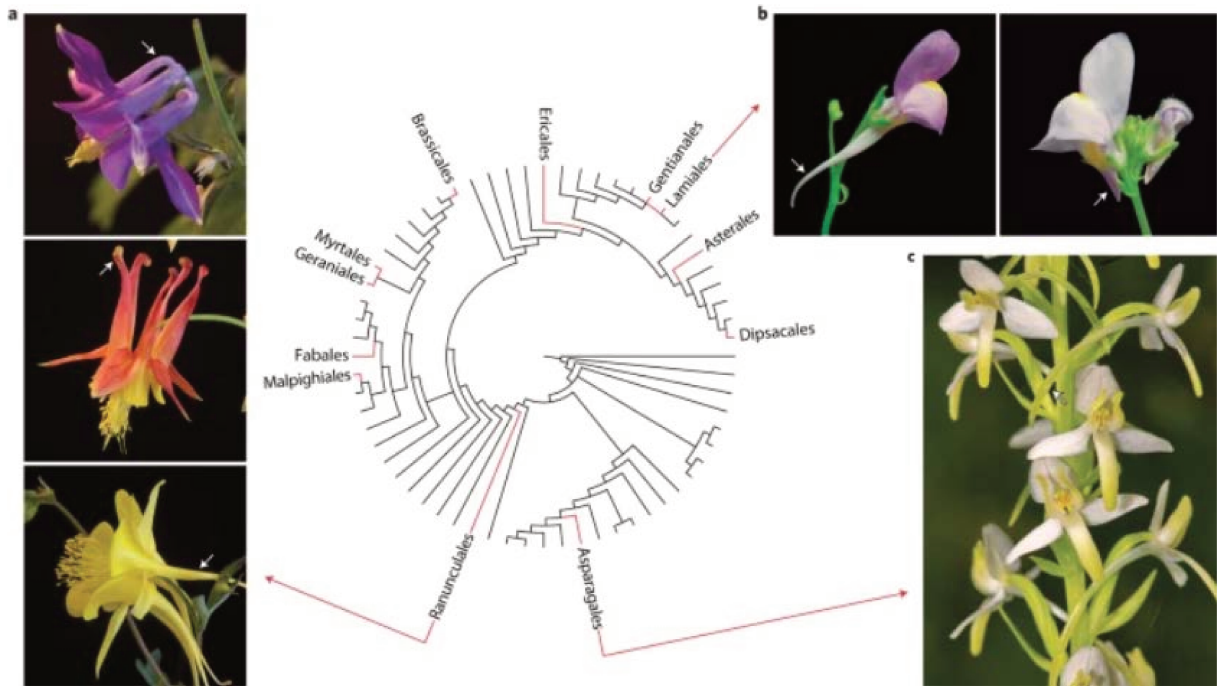


Figure 17 Multiples apparitions d'éperons au cours de l'évolution des Angiospermes. Source : Fernández-Mazuecos and Glover (2017) The evo-devo of plant speciation. Nat Ecol Evol 1, 0110. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0110>.

La formation d'un éperon implique bien souvent i) une croissance du tissu existant et ii) un changement de forme. Nous pourrions nous demander si, à l'instar de *N. damascena* où les changements de formes sont contrôlés par la division cellulaire, c'est aussi le cas pour la formation des éperons chez les autres espèces, ou au contraire si l'expansion a un rôle plus important que chez la nigelle. En première approche, l'augmentation du nombre de divisions cellulaires génère à priori moins de stress sur les cellules que l'augmentation de leur taille. En particulier, des contraintes mécaniques, ou une expression génétique limitante (limitation du nombre d'allèles disponibles définis par la ploïdie de l'organisme, vitesses de transcription et traduction non infinies, Roddy et al. 2020, Kondorosi, Roudier, and Gendreau, 2000) pourraient imposer une taille cellulaire maximale dans ces tissus, favorisant les divisions plutôt que l'expansion cellulaire (Marguerat and Bähler 2012).

Les éperons ont fait l'objet d'études chez de nombreuses espèces végétales au cours de la dernière décennie, et la dynamique cellulaire et les bases génétiques de leur développement ont été largement étudiées (voir références ci-dessous), ce qui permet d'ores et déjà d'explorer les hypothèses émises précédemment (Figure 18). Cependant, il est à noter que ces études ne séparent pas -au cours du développement (et entre espèces) - ce qui relève purement d'un changement de forme de ce qui relève de la croissance, ce qui signifie que la comparaison avec la nigelle est à effectuer avec prudence. De plus, la plupart de ces études comparent non pas des stades développementaux chez une même espèce mais les stades adultes d'espèces différentes, ce dont il faudra tenir compte lors de la comparaison de ces études.

Chez une espèce du genre *Aquilegia* L. qui appartient également aux Ranunculaceae, l'éperon se développe d'abord par divisions cellulaires anisotropes, conduisant à une croissance orientée du futur éperon, mais ensuite l'expansion cellulaire prend le relais. C'est l'expansion qui est responsable des 99% de des différences d'allongement de l'éperon entre espèces dans le genre (Puzey et al. 2012, Yant et al. 2015, Ballerini et al. 2020). Le développement de l'éperon chez l'espèce de Valerianaceae *Centranthus ruber* (L.) DC. quant à lui semble reposer d'abord sur des divisions cellulaires pour atteindre 30% de sa taille finale, les 70% restants étant dus à une expansion cellulaire orientée (Mack and Davis 2015). En revanche, chez *Linaria* Mill. (Plantaginaceae), la division cellulaire a le rôle principal dans les différences d'allongement de l'éperon entre espèces du genre, alors que l'expansion cellulaire reste quantitativement secondaire (Cullen, Fernández-Mazuecos, and Glover 2018).

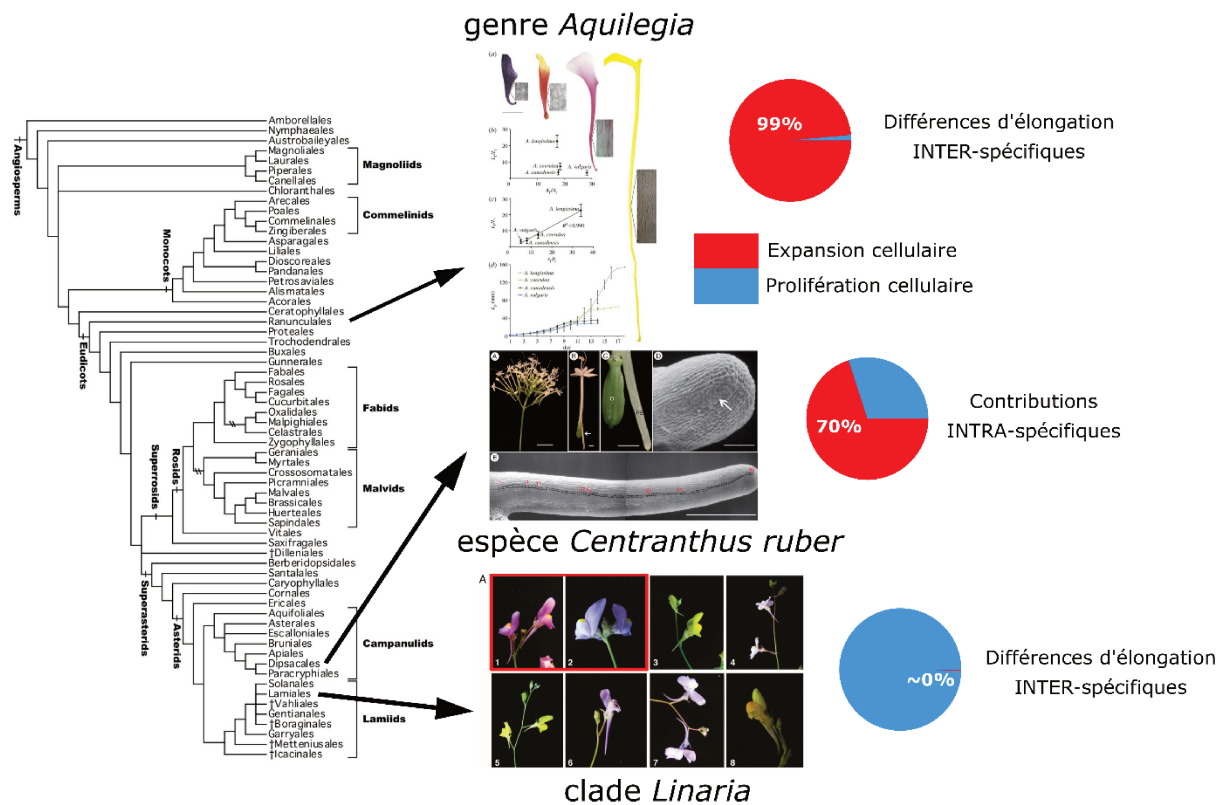


Figure 18 *Éperons nectarifères et contributions relatives de l'expansion et de la prolifération cellulaires.* Bien que pas entièrement comparables à cause d'études intra et inter-spécifiques, ces trois clades suggèrent de grandes disparités des rôles de l'expansion et la prolifération cellulaire dans la formation des éperons et montrent des convergences morphologiques qui ne s'appuient pas sur des convergences mécanistiques. En particulier, *Aquilegia* (en haut) et *Linaria* (en bas) présentent des patrons totalement opposés (rôle prépondérant de l'expansion cellulaire pour le premier, rôle prépondérant de l'expansion cellulaire pour le second). Adapté de : *The Angiosperm Phylogeny Group 2016, Puzey et al. 2012, Mack and Davis 2015 et Cullen, Fernández-Mazuecos and Glover 2018.*

Chez les *Delphinieae*, groupe frère des *Nigelleae*, les contributions relatives de l'expansion cellulaire et de la division cellulaire n'ont pas encore été étudiées et les deux scénarios restent possibles : son voisinage phylogénétique avec *Nigella damascena* pourrait suggérer que la division cellulaire est prépondérante mais les exemples d'autres *Ranunculaceae* comme *Aquilegia* (tribu des *Thalictroideae*) pourrait suggérer le contraire. De plus, la formation d'un

éperon nectarifère ne met pas uniquement en jeu un changement de forme mais également une augmentation de taille, ce qui rend difficile d'émettre une hypothèse à partir de *Nigella damascena*.

Enfin, des contributions équilibrées de la division et de l'expansion cellulaires restent également une possibilité et une étude similaire à celle présentée dans cet article permettrait de confirmer l'une ou l'autre de ces possibilités et contribuerait à dresser un tableau d'ensemble de la formation de ces structures apparues de nombreuses fois au cours de l'évolution que sont les éperons des pétales.

Retour sur les liens entre forme, taille et allométrie, avec les éclairages de l'étude du pétale de Nigella damascena. Les changements de forme sont-ils toujours des allométries (c'est-à-dire issus d'une croissance différentielle) ?

L'étude au chapitre 1 des changements de forme du pétale de *Nigella damascena* au cours de son développement a montré que ceux-ci reposaient sur deux mécanismes : la division cellulaire de manière préférentielle mais aussi l'expansion cellulaire (augmentation de taille). Ces deux mécanismes sont également pourvoyeurs de croissance du pétale, car les divisions cellulaires sont accompagnées de croissance : les deux cellules filles ont à minima la taille de leur cellule-mère. L'étude des distances entre landmarks au cours du développement n'a dévoilé que des augmentations de distance ou éventuellement une stagnation, mais jamais de régression. Chez le pétale de nigelle (plus précisément la partie dorsale de l'urne, qui a fait l'objet des études cellulaires), le changement de forme peut donc toujours être considéré comme une croissance différentielle. Cette non-uniformité de la croissance se répercute sur le contour du tissu, et donc sur la position des landmarks qui pour rappel constituent le proxy de la forme dans cette étude. Notons que cartographier la croissance différentielle est impossible à partir de la séquence de clichés qui a été utilisée pour ce travail, et qu'une étude en temps réel ou un marquage des cellules avec suivi des lignées serait nécessaire (voir Rolland-Lagan, Bangham,

and Coen 2003). Si systématiquement des augmentations de distances entre landmarks sont observées, il n'est pas non plus possible d'infirmier la présence de mécanismes qui puissent réduire les distances à l'échelle cellulaire, comme la mort cellulaire (apoptose) ou le réarrangement entre cellules. Néanmoins si ceux-ci existent, ils sont compensés par les mécanismes de croissance susnommés et en deviennent de fait indétectables. Leur présence est cependant hautement improbable, car ces mécanismes sont rares voir quasi-absents chez les plantes, en particulier dans le tissu épidermique. En effet, la mort cellulaire programmée chez les plantes est cantonnée à des tissus et des évènements particuliers comme la formation du xylème, la maturation des graines, la sénescence des feuilles et plusieurs processus de reproduction des plantes (Dickman et al. 2017). Quand bien même elle aurait lieu dans l'épiderme en développement, l'effet d'une apoptose n'est pas évident à prédire, le réseau des parois cellulaires constituant un obstacle à un éventuel réarrangement des cellules voisines et *in fine* à une modification de la forme. La présence de réarrangements cellulaires, pour la même raison, est improbable dans l'épiderme en développement et a probablement un rôle négligeable dans la morphogenèse du pétale de nigelle.

Chez les métazoaires, en revanche, les migrations cellulaires, les réarrangements topologiques (c'est-à-dire des contacts entre cellules) ainsi que l'apoptose ont des rôles prépondérants dans la morphogenèse des organismes (Gibson and Gibson 2009, Guillot and Lecuit 2013, Figure 19).

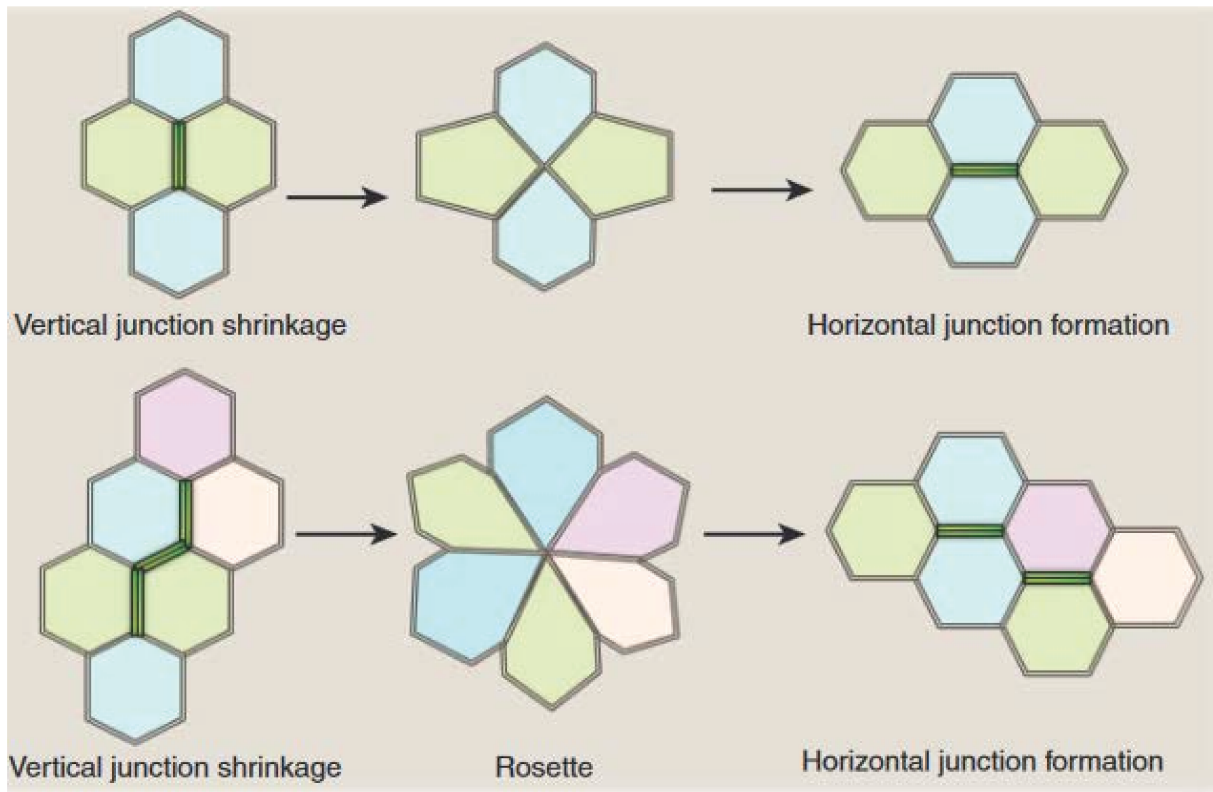


Figure 19 Changements de forme sans croissance par réarrangements topologiques des cellules. Source : Guillot and Lecuit 2013.

Il en découle une plus grande indépendance possible entre morphogénèse et croissance, comme par exemple les systèmes de Turing qui peuvent créer de la forme à taille constante (Kondo 2017). Néanmoins, de nombreux processus créateurs de forme restent fortement liés à la croissance. Ils seront évoqués et discutés dans le prochain paragraphe.

Entre indépendance et génération de l'une par l'autre, différentes nuances de relations entre forme et croissance

*Est-il possible de déterminer les liens entre contrôle de la taille et de la forme à partir de leur covariation ? L'exemple de *Nigella damascena**

On observe de nombreux cas de plasticité phénotypique chez les Angiospermes, aussi bien concernant le nombre et l'organisation des organes (tiges secondaires, feuilles, fleurs) que leur taille et leur forme (Sultan 2000). Cette plasticité phénotypique peut s'exprimer en réponse à une pression biotique, par exemple chez le houx (*Ilex aquifolium* L.), où plus les feuilles sont situées proche du sol (et donc soumises à l'herbivorie), plus elles présentent des piquants sur leurs marges (Herrera and Bazaga 2013). Les cas de plasticité phénotypique des Angiospermes sont également pour beaucoup des réponses aux conditions abiotiques (présence de lumière, d'eau, type de sol), ce qui entraîne pour de nombreuses espèces un développement post-embryonnaire très influencé par les conditions environnantes (Palacio-López et al. 2015). Tous les organes n'expriment pas de plasticité phénotypique à un niveau équivalent et chez les fleurs en particulier, les pressions évolutives ont tendance au contraire à contraindre fortement leur taille et leur forme (Krizek and Anderson 2013, Czesnick and Lenhard 2015). Les pressions de pollinisation et les complémentarités (et spécificités) entre pollinisateurs et fleurs sont en grande partie responsables de ces contraintes sur la morphologie florale, au sens large, c'est-à-dire forme et taille incluses (Gómez et al. 2008). Dans l'étude sur le pétale de *N. damascena*, il a été constaté que ces contraintes sur la forme et la taille ne s'appliquent pas qu'à leurs valeurs finales (à la maturité du pétale) puisque les graphes représentant le proxy de la forme vs la taille montrent que les pétales suivent des trajectoires de développement très claires (Figures 2 et 3 du chapitre 1). Autrement dit, à un intervalle réduit de forme correspond un intervalle réduit de taille et inversement (en termes mathématiques, leur distribution approche une bijection). Pour autant, il est impossible de conclure de cette relation taille/forme chez le pétale de *N. damascena* un quelconque contrôle d'un facteur par l'autre. Taille et forme pourraient simplement dépendre

d'un troisième facteur (par exemple le temps développemental ou le rythme de division cellulaire) qui entraînerait cette corrélation qui n'est pas causalité. Les conditions contrôlées (température, substrat) du développement des nigelles de Damas dont les boutons floraux ont servi à cette étude ajoutent des contraintes et empêchent peut-être une plasticité cachée de s'exprimer. Pour poursuivre l'étude du lien entre taille et forme du pétale en développement chez *N. damascena*, il pourrait être intéressant d'essayer d'élargir l'espace morphogénétique disponible en recherchant des variétés ou des mutants portant des traits de taille ou de forme différents par rapport à notre échantillonnage d'étude. L'élargissement à d'autres espèces proches, notamment celles du genre *Nigella* (à l'instar de l'étude réalisé par Yao et al. 2019), permettrait d'utiliser la biodiversité naturelle pour étendre l'espace morphogénétique. Par ailleurs, une modification des conditions abiotiques du développement (eau, nutriments, lumière) pourrait peut-être permettre d'obtenir des phénotypes légèrement différents et de regarder où ils se placent dans le graphe forme/taille des pétales. En particulier, est-ce que ces individus se placent sur le même chemin développemental que celui mis en évidence dans notre étude, ou d'autres chemins sont-ils possibles ? Par exemple, si une variété présente des pétales matures sensiblement plus petits que ceux de notre échantillonnage, est-ce que leur forme est également de type plus « jeune », ou est-ce qu'ils possèdent la même forme finale que le groupe contrôle ? La première possibilité plaiderait pour un contrôle en partie indépendant des caractères de forme et de taille, quand la seconde plaiderait pour un contrôle conjoint.

Si cette relation resserrée entre taille et forme est de plus le résultat du contrôle de l'une par l'autre, cela fait apparaître des voies potentielles de régulation et de variation d'un paramètre, notamment génétiques. Cela a été mis en évidence chez les oiseaux avec l'exemple des fameux pinsons de Darwin, où les valeurs et la dynamique du taux de croissance du bec en développement déterminent la forme finale du bec (Mallarino et al. 2012 et Figure 20).

Déformation, réarrangement et apparition de motifs non-canoniques : les trois effets de la croissance sur les motifs de couleurs périodiques produits par les systèmes de Turing

Si l'on regarde attentivement les rayures du zèbre, mais aussi du juvénile de l'émeu (*Dromaius novaehollandiae*), on se rend compte que leur épaisseur diffère selon la région du corps à laquelle on s'intéresse : elles sont par exemple bien plus larges sur le dos et les cuisses que sur la tête ou les parties distales des membres. Cela est corrélé avec les zones d'expansion maximale du corps durant le développement, qui est allométrique (Nagai et al. 2011). Pour de nombreux animaux, y compris l'humain, la taille relative des parties du corps évolue au cours du développement embryonnaire, mais aussi post-embryonnaire (German and Meyers 1989). Chez le nouveau-né humain, la tête fait le quart de la longueur du corps en moyenne, contre 1/8 environ chez l'adulte. Elle a tendance à grandir moins que le reste du corps, et constitue donc une allométrie (Aiello 1992). Le patron de couleur des zèbres ou de l'émeu se met en place durant le développement embryonnaire, et un mécanisme de type Turing (parfois appelé réaction/diffusion mais qui a été généralisé depuis (Kondo 2017)) en est sans doute à l'origine (Kondo and Miura 2010), comme pour les rayures du poisson-zèbre (*Danio rerio*, Kondo and Asai 1995) ou les points de la corolle des fleurs du genre *Mimulus* (Ding et al. 2020). Une particularité des systèmes de Turing est de mettre en place des patrons de couleur périodiques, c'est à dire avec une répartition régulière des motifs (bandes, points ou motifs plus complexes Kondo and Miura 2010). Chez le zèbre et l'émeu, l'allométrie rompt donc cette périodicité en déformant plus ou moins les tissus. Néanmoins on trouve chez d'autres espèces des patrons de Turing dont la périodicité ne semble jamais affectée, ni même la longueur d'onde du pattern, c'est-à-dire la distance entre deux motifs voisins, comme chez de nombreuses espèces de poissons tel que le poisson-ange empereur (*Pomacanthus imperator*), quand bien même l'épiderme qui porte le patron rayé subit une croissance non homogène lors du développement (Kondo and Asai 1995). Ce qui explique cette différence est l'activité ou non du système qui met en place le patron de couleur. Chez le zèbre et l'émeu, ce système apparaît éteint, au moins depuis la naissance de l'individu, le patron subit donc les déformations du tissu qui le porte.

Bien que les raisons ne soient pas bien connues, chez ces espèces le système de Turing cesse donc de fonctionner à un moment du développement. Au contraire, chez *Pomacanthus imperator* ainsi que chez de nombreuses autres espèces de poissons (osteichthyens mais aussi chondrichthyens), mais aussi chez certains mammifères comme le léopard (Liu, Liaw, and Maini 2006), le système de Turing produisant le patron périodique reste actif très longtemps, y compris pendant les phases tardives du développement post-embryonnaire où la croissance continue d'opérer. La croissance déséquilibre le système en augmentant la distance entre les motifs, celui-ci répond - par exemple - en ajoutant de nouveaux motifs pour retrouver un état d'équilibre (des bandes chez *Pomacanthus imperator*). Néanmoins, il y a là deux cinétiques qui entrent en interaction, celle de la croissance d'une part qui peut être exponentielle, et celle du système de Turing qui à priori reste constante. Si le taux de croissance est trop important pour que le système puisse répondre, d'autres phénomènes peuvent apparaître et ajouter de la diversité à la famille des patrons de couleurs périodiques, en l'occurrence, des motifs non-canoniques. Par opposition aux patrons de Turing canoniques que sont les points, bandes, labyrinthes, voire les patrons imbriqués (à deux longueurs d'ondes (Kondo 2017)), les motifs non-canoniques ne peuvent s'expliquer qu'en ajoutant un ingrédient au modèle, la croissance du tissu en surface étant le plus biologiquement plausible chez la plupart des organismes étudiés. Ainsi, les points du léopard juvénile subissent une forte croissance dans le dos et les cuisses, ce qui entraîne leur expansion sans que le système ne puisse ajouter des points, pour redonner un patron similaire au juvénile, au nombre de motifs près. Ces points devenus de larges taches constituent une condition initiale à partir de laquelle le système de Turing va continuer de travailler, et qui vont laisser une empreinte dans le patron final. Le réarrangement de ces taches les transforme en ocelles, qui sont en quelques sortes des taches dont le centre a disparu, et dont les bordures semblent se séparer en plusieurs amas, qui eux respectent la longueur d'onde d'équilibre du système (De Gomensoro Malheiros, Fensterseifer, and Walter 2020). Ces ocelles, motifs non-canoniques, se retrouvent chez de très nombreuses espèces (parmi lesquelles le crabe *Ovalipes ocellatus* (Herbst, 1799) ou l'orchidée *Phalaenopsis hieroglyphica* (Rchb. f.)

H.R. Sweet) réparties dans de nombreuses branches de l'arbre phylogénétique des Eucaryotes, ce qui souligne l'importance de la croissance dans la formation des patrons de couleurs de Turing. Nous venons de voir comment la croissance peut influencer la morphogenèse de patrons de couleurs, mais il nous faut noter que les patrons de couleurs étudiés peuvent exister sans croissance. Les deux prochains paragraphes s'intéressent au contraire à deux familles particulières de mécanismes (parmi les sept recensées dans l'article de revue) dont la formation est intimement liée à la croissance puisque cette dernière est nécessaire voire à l'origine du patron : les « printing patterns » des coquilles des mollusques et les « physical cracking patterns » des Amanitaceae.

Les « printing patterns » des tests des mollusques, où la croissance transforme un pattern spatio-temporel (1D/1D) en un pattern spatial 2D.

De nombreux mollusques gastéropodes et bivalves produisent un ou deux tests (la coquille ou les valves), en général composés d'une combinaison de protéines, de polysaccharides et de carbonate de calcium. Chez de très nombreuses espèces, ils peuvent être ornés d'une grande diversité de motifs et de couleurs : rayures, points, mais aussi des géométries moins courantes dans le vivant tels que des triangles imbriqués à la manière de fractales (voir Figure 14). Contrairement aux exemples précédents où la croissance joue le rôle de modificateur plus que de générateur de patrons de couleur, ces coquilles sont produites par la bordure du manteau de l'individu au cours de sa croissance. À un instant donné, la partie sécrétrice du manteau est dans un état de coloration particulier et dépose une couche de biomatériau et de pigments et tel un mécanisme d'impression, l'ajout de couches successives fabrique peu à peu une coquille dont la coloration se fait sur une surface en deux dimensions, plus ou moins repliée dans l'espace (Budd et al. 2014). De plus, l'état de coloration du manteau évolue avec le temps, ce qui augmente la complexité possible du patron final de coloration. Il y a donc interaction entre un mécanisme unidimensionnel spatial (l'état du manteau à un instant t) et un mécanisme temporel (la variation de l'état de coloration du manteau au cours du temps)

qui donne *in fine* un pattern bidimensionnel spatial grâce à la croissance. Cette dernière est donc ici un moteur permettant de transformer un signal 1D temporel-1D spatial en signal 2D spatial, le patron de coloration. De nombreux autres exemples de génération de formes au cours d'un phénomène de croissance existent dans la nature, dont un des plus étudiés est la production des feuilles au niveau d'un méristème caulinaire pendant la croissance de l'axe de la tige. Le rythme de croissance de la tige par rapport à la vitesse de formation des primordia foliaires (plastochrone) déterminera l'espacement final entre feuilles et a donc un impact fort sur l'architecture végétative de la plante et ceci est illustré par de nombreux mutants de croissance qui présentent une architecture modifiée (Kunita et al. 2021). Par ailleurs le taux de croissance peut être une cible de la sélection et être à l'origine de diversité phénotypique entre espèces (Mallarino et al. 2012). La variation du taux de croissance joue le même rôle morphogénétique dans la formation des becs des pinsons et est à l'origine de la diversité de formes de becs chez ces oiseaux (voir paragraphe précédent).

Nous avons vu que la croissance, en interaction avec d'autres phénomènes, peut être au cœur de la génération de formes dans la nature. Le paragraphe suivant clora cette partie consacrée aux liens entre morphogénèse et croissance, en évoquant un dernier exemple du rôle morphogénétique que peut avoir la croissance, en l'occurrence les « physical cracking patterns ».

Quand la croissance crée la forme, l'exemple des « physical cracking patterns » de l'amanite tue-mouches (*Amanita muscaria*) et de la peau des crocodiles et des éléphants.

De tous les liens entre croissance et forme évoqués dans cette partie, les « physical cracking patterns » sont peut-être ceux où le rôle de la croissance est le plus prépondérant. Contrairement aux écailles du corps des individus, les écailles de la tête de certains crocodiles ne sont pas identiques d'un individu à l'autre mais constituent autant d'unités aléatoires, de forme polygonale (Milinkovitch et al. 2013). Il en va de même pour les craquelures

micrométriques de la peau d'éléphant (Martins et al. 2018 et Figure 4 du Chapitre 2), et enfin des craquelures du chapeau de certains champignons de la famille des Amanitaceae, dont l'amanite tue-mouches avec son patron rouge et blanc est peut-être l'exemple le plus frappant (Yangt and Oberwinklerr, 1999 et Figure 4 du Chapitre 2). Le point commun entre ces trois exemples est le développement d'un tissu (le manteau universel pour les Amanitaceae, l'épiderme très kératinisé pour les crocodiles et éléphants) sous la contrainte i) d'une croissance et ii) de stress mécaniques inhérents au tissu. À partir d'un point de rupture, le tissu commence à se craqueler, formant préférentiellement des hexagones ou d'autres polygones, semblables aux motifs d'argile après assèchement (fentes de dessiccation, Wei, Gao, and Liu 2020 et Figure 4 du chapitre 2). Les unités répétées et les fissures les séparant permettront respectivement i) de générer un signal aposématique grâce au contraste entre la couleur blanche du manteau et la couleur du tissu sous-jacent (rouge pour *Amanita muscaria*) avertissant d'éventuels consommateurs de la toxicité du champignon (Michelot and Melendez-Howell 2003), ii) de générer une mosaïque d'écailles sur la peau de la tête permettant une protection mécanique optimale (Milinkovitch et al. 2013) et iii) de générer un tissu permettant d'améliorer la régulation thermique en retenant l'eau et la protection contre les parasites et le soleil en retenant la boue (Martins et al. 2018). Ici ce sont donc des interactions entre croissance et stress mécaniques qui permettent de générer des patrons complexes, auto-organisés, et permettant d'assurer des fonctions biologiques très diverses (Figure 20).

Implication croissante de la croissance dans le phénotype final

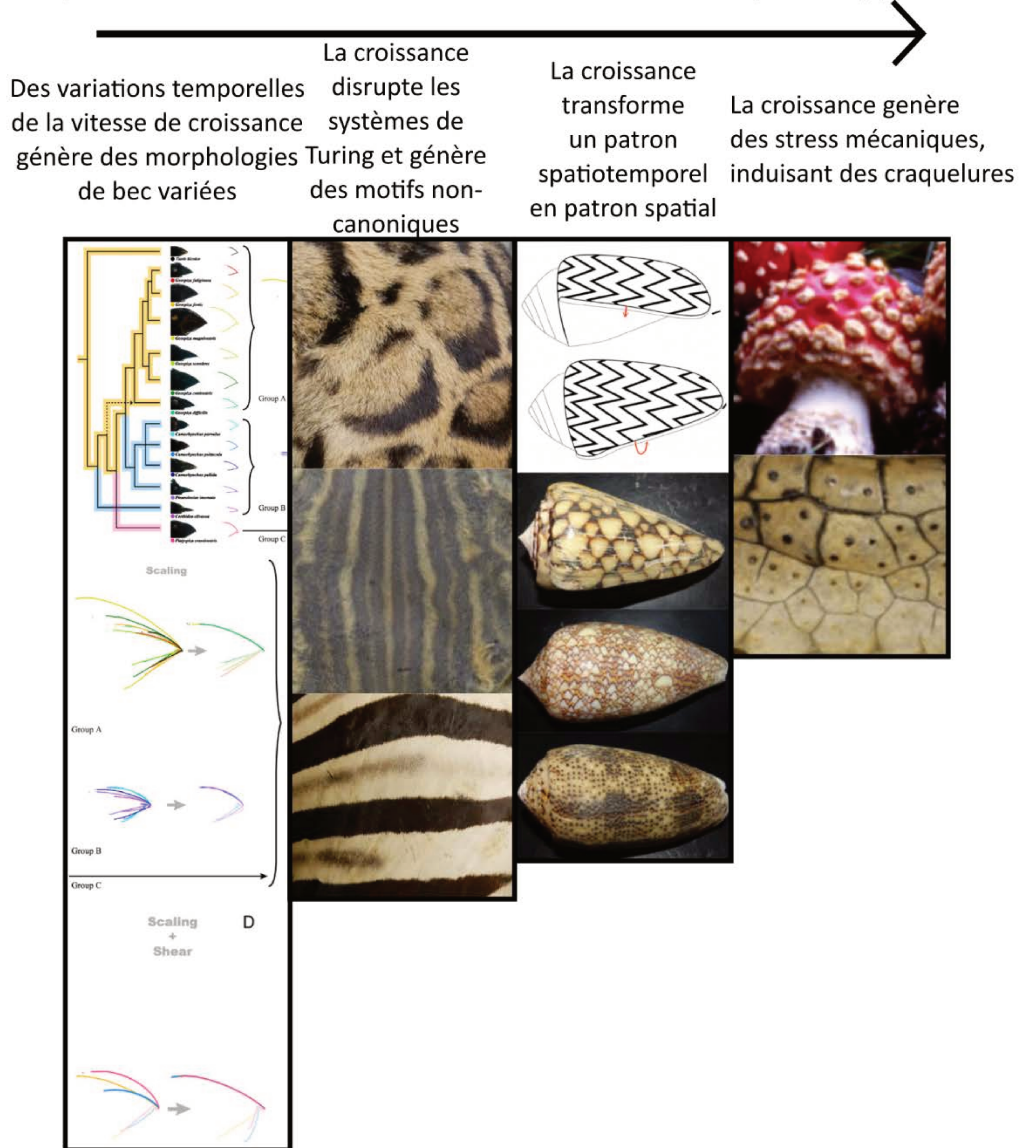


Figure 20 Une diversité d'implication de la croissance dans la morphogénèse. De gauche à droite : morphogénèse de becs de pinsons par variation de la vitesse de croissance (Phylogénie et morphologie adaptées de : Mallarino et al. 2012), motifs non-canoniques de Turing, « printing patterns » des mollusques, et « physical cracking pattern » des Amanitaceae et des crocodiles.

Quelles explications évolutives et/ou mécanistiques aux liens entre forme et croissance ? Éclairage de l'étude du pétale de *Nigella damascena* et des patrons de couleur répétés

*La relation allométrique de nature potentiellement exponentielle entre forme et taille au cours du développement de *Nigella damascena* et les contributions cellulaires sont-elles des indices sur une relative indépendance entre ces deux processus ?*

Bien que l'étude de morphométrie géométrique couplée à des analyses cellulaires ne permette pas de conclure formellement sur la façon dont taille et forme sont interdépendantes au cours du développement, l'existence d'une relation d'allométrie les reliant pourrait suggérer dans un premier temps une forte interdépendance. Néanmoins, corrélation n'est pas causalité et plusieurs arguments permettent de suggérer le contraire.

Tout d'abord, la nature exponentielle liant leurs dynamiques – bien que restant à confirmer – est peut-être le simple reflet d'un lien à un troisième processus (comme évoqué plus haut), en l'occurrence le temps développemental, sans que taille et forme soient pour autant liées entre elles. En effet, l'étude a montré que la taille moyenne des cellules était constante pour la première partie du développement, si nous faisons l'hypothèse plausible que le taux de division cellulaire est constant pendant cette durée, alors l'évolution de la surface du pétale est exponentielle par rapport au temps développemental. De la même manière, si nous faisons l'hypothèse que les processus morphogénétiques agissent à un taux constant au cours du développement, la dynamique de la forme est proportionnelle au temps développemental. Un tel double lien avec le temps développemental entraînerait un lien apparent (et exponentiel) entre forme et taille, alors même que ces deux processus sont indépendants mécanistiquement.

Un deuxième indice provenant de l'étude des caractéristiques cellulaires permet d'aller dans ce sens. Le calcul des contributions relatives de l'expansion cellulaire et de la prolifération cellulaire a montré qu'elles avaient des rôles complètement différenciés. Là où la prolifération

contribue de manière prépondérante à la croissance différenciée entre paires de landmarks, autrement dit à la morphogenèse, l'expansion y joue un rôle minime. Au contraire, dans la deuxième partie du développement, cette dernière prend le dessus sur la prolifération et entraîne une forte croissance du pétale sans changement de forme marquant. Ces rôles différents pour ces deux processus suggèrent des voies différentes de contrôle, et à nouveau une relative indépendance entre forme et croissance.

Enfin, l'élargissement de l'étude à d'autres espèces du genre *Nigella*, telles que présentées dans l'article de Yao et al. 2019, montre des morphologies différentes entre espèces du même genre, alors même que la taille du pétale (plus précisément la longueur de sa lèvre inférieure) semble conservée d'une espèce à l'autre. Cette facilité de l'évolution à entraîner des changements de forme sans changement de taille suggère à nouveau une relative indépendance entre ces deux caractères chez la nigelle.

La croissance comme moteur indispensable dans la formation des « printing patterns » et des « physical cracking patterns », raison triviale du lien entre morphogenèse et croissance ?

Pour ces exemples, les liens mécanistiques entre morphogenèse et croissance sont si forts (la croissance étant le moteur de la forme) qu'il apparaît logique qu'ils soient dépendants évolutivement. Les patrons de couleur des mollusques gastéropodes et bivalves ayant des fonctions biologiques démontrées (notamment d'aposématisme (Raskin 2021) à l'instar des motifs craquelés des Amanitaceae) et de ce fait ayant de grandes chances d'être sous pression de sélection, forme et croissance semblent donc liées évolutivement chez ces espèces.

Pour la croissance comme modificateur de patron de coloration, il n'est en revanche pas possible d'établir le même constat, et une troisième voie semble probable.

La croissance comme modificateur de pattern et responsable de la formation de motifs non canoniques : un lien mécanistique avéré mais un simple sous-produit de pressions sélectives sur la morphologie externe des organismes ?

Au contraire du pétale de *N. damascena* et comme pour les deux familles de patrons de coloration évoqués dans la section précédente, le lien mécanistique entre croissance et forme est démontré quand elle joue le rôle de modificateur de patron (De Gomensoro Malheiros, Fensterseifer, and Walter 2020). Néanmoins, la question de savoir si ces patrons de couleurs modifiés ont été sélectionnés au cours de l'évolution et ont entraîné des variations de la croissance est une question légitime. En effet, chez les organismes présentant des patrons déformés par la croissance, et éventuellement des motifs non-canoniques, la croissance du tissu épidermique est avant tout une accommodation à la morphologie sous-jacente de l'organisme (par exemple musculaire et squelettique chez le zèbre). Il est raisonnable d'estimer que les allométries caractérisant le développement de ces animaux permettent avant tout la création d'une morphologie adaptée, et que les effets sur le patron de coloration sont plutôt un sous-produit de ces allométries, plutôt que l'inverse. Cela semble donc entraîner trop de contraintes évolutives sur la croissance pour que des variations dans celle-ci puissent être sélectionnées pour des effets sur les patrons de coloration. Cela ne veut pas dire pour autant que les motifs canoniques ne puissent être soumis à la sélection, mais que vraisemblablement cela agit sur d'autres voies moins contraintes évolutivement que la croissance (par exemple le stade de développement où le système de Turing se met en place, ses caractéristiques et sa durée qui peuvent tout autant agir sur la présence ou non de motifs non canoniques, Kondo and Miura 2010).

L'examen succinct des liens entre forme et croissance à partir d'un nombre réduit d'exemples ainsi que des hypothèses sur les raisons évolutives de la présence de ces liens ont montré à nouveau de grandes disparités selon les exemples. Cela suggère à nouveau que les liens entre

forme et croissance au cours du développement sont d'une grande diversité et qu'aucune règle générale ne peut être établie.

Chapitre 4

Retours sur les principaux apports des études, Perspectives et Conclusion générale

Le projet de cette thèse était d'explorer deux thématiques morphogénétiques qui peuvent paraître éloignées (la morphogenèse du pétale élaboré de *Nigella damascena* et la morphogenèse des patrons de couleur répétés chez les Eucaryotes), mais qui ont permis d'illustrer des facettes variées et complémentaires de l'axe transversal suivant : les relations entre forme et croissance au cours du développement, dont nous allons à présent synthétiser les apports.

Retour sur les principaux apports de l'étude du pétale de Nigella damascena

Concernant ce travail présenté dans le chapitre 1, ses principaux apports sont les suivants :

- L'analyse de morphométrie géométrique mise en regard avec la dynamique de taille du pétale de *N. damascena* au cours de son développement a montré que les dynamiques de forme et de taille étaient liés par une relation d'allométrie. De plus, la relation entre forme et taille semble suivre une loi exponentielle : la taille augmente exponentiellement plus vite que la forme ne change durant le développement.
- L'analyse des cartes cellulaires dans la partie dorsale du pétale a montré qu'à l'instar de nombreux exemples chez les végétaux, le développement du pétale suivait deux phases (Rymen et al. 2010) : une première marquée par les divisions cellulaires et une seconde par l'expansion cellulaire. Cependant, cette analyse a également mis en évidence des disparités au sein de différentes populations cellulaires réparties en domaines, dont les

dynamiques d'expansion et d'allongement cellulaire sont variées au cours du développement.

- Enfin, l'étude des distances entre paires de landmarks et les analyses cellulaires associées a permis de quantifier les rôles respectifs de la prolifération et de l'expansion et a mis en évidence un fort rôle morphogénétique de la prolifération cellulaire localisée, suggérant qu'elle est le mécanisme privilégié par les signaux morphogénétiques qui régulent la forme du pétale au cours de son développement.

Retour sur les principaux apports de l'étude des patrons de couleurs répétés des Eucaryotes

Concernant ce travail présenté dans le chapitre 2, les principales conclusions de l'article de revue sont les suivantes :

- Les patrons de couleur répétés des Eucaryotes peuvent être assignés à sept familles fondamentales de mécanismes. Certaines familles de mécanismes se rencontrent dans des groupes taxonomiques très éloignés sur le plan phylogénétique, et sont la marque de nombreuses convergences évolutives. En synergie avec ces mécanismes primaires, des modificateurs de patrons (pattern modifiers) agissent sur les couleurs et la géométrie des patrons de couleurs, participant à leur grande diversité phénotypique.

Au-delà des sept familles proposées dans la classification, d'autres familles de mécanismes non encore découvertes existent vraisemblablement dans la nature, et des pistes ont été proposées pour en découvrir de nouvelles.

Perspectives

Perspectives soulevées par l'étude du pétale de nigelle de Damas

L'étude développementale du pétale de *N. damascena* a permis de mettre en évidence un lien entre forme et taille, formalisé par une loi exponentielle. Cependant, l'origine de cette relation exponentielle ne pourra être totalement dévoilée que par un suivi en temps réel du

pétale au cours de son développement. En particulier, le suivi des divisions cellulaires (en temps réel ou via des études de marquage de divisions cellulaires, par exemple par hybridation *in situ* de l'histone H4 (Just et al. 2017)) pourra permettre de valider ou d'invalider les différentes hypothèses émises dans la discussion de notre article. Par ailleurs, une étude en temps réel, dont la faisabilité technique reste à vérifier, permettrait de poser un cadre temporel à ces deux dynamiques (forme et taille), ce qui n'était pas possible dans les conditions de cette étude.

La morphométrie géométrique en deux dimensions, plus aisée à mettre en œuvre que son équivalent en trois dimensions, et possédant des qualités intrinsèques (évoquées dans l'introduction) a été permise par la présence de structures planes sur le pétale, que ce soit biologiquement (la lèvre inférieure et la lèvre supérieure) ou induites expérimentalement (par coupe sagittale). La multiplication des vues choisies pour l'étude (dorsale, ventrale, médiale, latérale) a permis d'explorer une partie importante de l'information morphologique du pétale de *N. damascena*, qui est une structure élaborée en trois dimensions. Néanmoins, seule une étude de morphométrie géométrique en trois dimensions pourra permettre d'accéder à certaines caractéristiques morphologiques du pétale, pour certaines non étudiables en deux dimensions car non planes. Le pétale possède en effet des courbures et des repliements lui permettant d'acquies sa forme mature et donc sa fonction d'urne à nectar. Si les divisions et l'expansion cellulaire sont les deux principaux processus générant de la forme dans des structures en deux dimensions, d'autres processus comme le contrôle de la rigidité des parois agissent en coopération avec ces deux premiers pour générer de la courbure dans les tissus. Celle-ci a sûrement un rôle prééminent dans la forme 3D du pétale de nigelle, qu'il n'a pas ou peu été possible d'étudier dans cet article.

Enfin, notre étude basée sur des clichés de microscopie électronique à balayage permet de visualiser les frontières cellulaires de la surface des tissus, mais la taille et la forme réelle des cellules, dans leur volume, (ainsi que celle des cellules n'affleurant pas à la surface) ne sont pas accessibles via cette technique. Une étude complémentaire par exemple par CT-scan permettrait

de compléter le suivi des caractéristiques cellulaires au cours du développement, tout en servant de base à l'étude de morphométrie géométrique en trois dimensions évoquée plus haut.

Perspectives soulevées par l'étude des patrons de coloration répétés des Eucaryotes

La classification en sept familles de mécanismes ainsi que la discussion menée dans ce manuscrit de thèse ont souligné l'importance de la croissance dans la formation et/ou la modification des patrons de couleurs répétés. En particulier, les systèmes de Turing semblent très sensibles à la croissance du tissu et cette dernière semble influencer de nombreuses caractéristiques des patterns de Turing naturels. Une étude mêlant modélisation, morphométrie couplée à un inventaire systématique des espèces concernées permettrait de dresser un tableau plus large de l'impact de la croissance dans les patrons de Turing. Nous proposons ci-dessous un protocole possible qui permettrait une caractérisation plus exhaustive de l'importance de la croissance dans les patrons de couleurs répétés, notamment les patrons de Turing (points 1 à 3). Nous proposons aussi d'utiliser la croissance comme un outil permettant d'accéder à des caractéristiques du patron difficilement accessibles (point 4), le moment de la mise en place initiale du système de Turing, et la longueur d'onde initiale du patron de coloration.

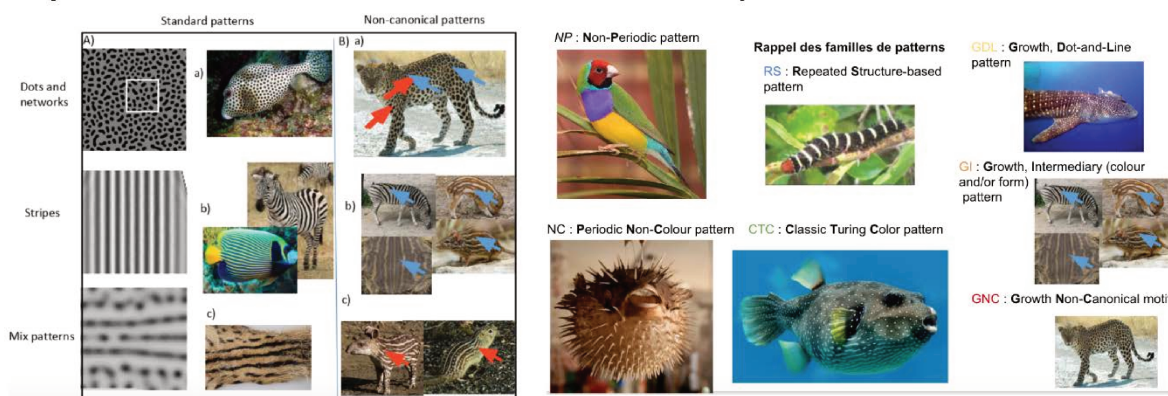
Proposition de protocole visant à évaluer l'importance de la croissance sur la diversité des patrons de coloration périodiques des Eucaryotes (Figure 21)

1. **Classification** des patrons de croissance (Figure 21.A) et représentation sur la **phylogénie** des Eucaryotes à partir de détections par **Deep Learning** (données et algorithme rendus ensuite accessibles sur le net)
2. **Simulation** et modèles de formation des patrons de croissance (Figure 21.B)
3. Tests de la compatibilité avec modèles biologiques à partir de **mesures sur spécimens de collections et base de données de photographies de spécimens vivants et analyses de morphométrie géométrique**

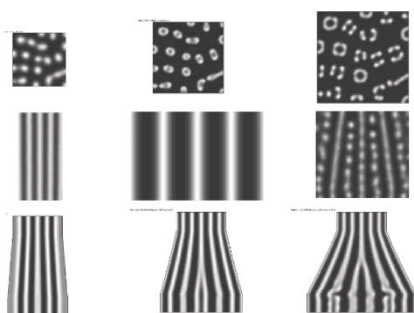
4. Les patrons de croissance comme outils pour accéder à des informations cruciales (Figure 21.C). Utilisation de la **morphométrie géométrique et de l'allométrie** pour déterminer

- i) le moment de la mise en place du patron initial (donnée manquante pour beaucoup d'espèces car elle a souvent lieu pendant le développement embryonnaire et avant la production des couleurs) et son corollaire :
- ii) le calcul de la longueur d'onde du patron lors de sa formation, en vue d'une comparaison entre espèces.

A) Classification et détection des patrons de colorations



B) Modélisation



C) La croissance comme outil

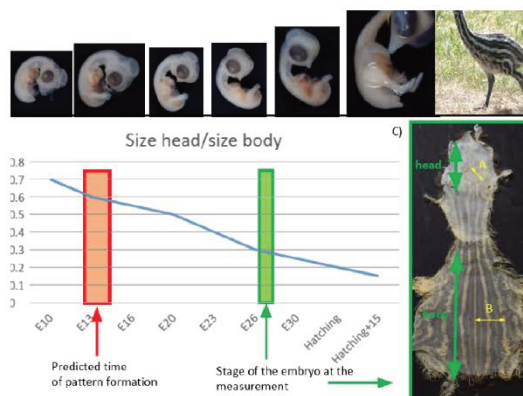


Figure 21 : Proposition de protocole visant à évaluer l'importance de la croissance sur la diversité des patrons de coloration périodiques des Eucaryotes.

Si le protocole que nous venons de présenter permettrait de balayer à large échelle taxonomique l'importance de la croissance chez les patrons de coloration périodiques des Eucaryotes, une

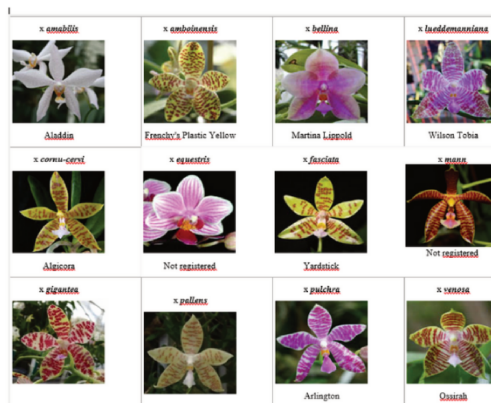
étude complémentaire et fonctionnelle chez une espèce clé permettrait de mettre en évidence les processus par lesquels la croissance agit sur les patrons, à l'échelle cellulaire, tissulaire et de l'organe. En l'occurrence, nous proposons ci-dessous un exemple de protocole (Figure 22), sur la seule espèce d'angiosperme qui possède, à notre connaissance, des motifs non-canoniques.

Proposition de protocole pour l'étude fonctionnelle de l'effet de la croissance sur la formation de motifs de Turing non canoniques

Formation du patron de couleur de *Phalaenopsis hieroglyphica* ((Rchb. f.) H.R. Sweet), seule Angiosperme connue à présenter un patron de couleur dit "de croissance" ?



Fleur de *Phalaenopsis hieroglyphica*



Hybrides primaires de *Phalaenopsis hieroglyphica*

Quelles sont les particularités du développement de la fleur de *P. hieroglyphica* qui entraînent la formation d'ocelles, motifs non-canoniques, sur ses pétales ?

Etude sur *Phalaenopsis hieroglyphica*, un échantillon d'espèces du genre *Phalaenopsis* et des hybrides primaires:

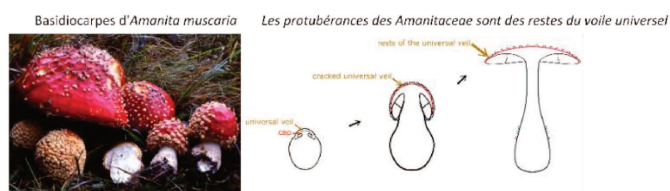
- Description cellulaire et tissulaire de la coloration des pétales
- Séquence de développement au microscope électronique à balayage
- Cartes cellulaires et calcul des dynamiques de division cellulaire et d'expansion
- Marquage du tissu et détermination des taux de croissance locaux
- Analyse de morphométrie classique et géométrique
- Estimation du moment de mise en place du patron de coloration
- Modélisation du développement du patron de coloration
- Perturbation de la croissance par stress hydrique, mécanique, ou nutritif.
- Perturbation locale de la mise en place du patron par incision du tissu

Figure 22 ***Proposition de protocole pour l'étude fonctionnelle de l'effet de la croissance sur la formation de motifs de Turing non canoniques.*** Source des images : (<https://eol.org/pages/1135560/media>, <http://bernard.lagrelle.pagesperso-orange.fr/Hieroglyphica/Hieroglyphica.html>)

Proposition de protocole pour l'étude fonctionnelle de la formation des physical cracking patterns des Amanitaceae

Par ailleurs, contrairement aux patrons de Turing que nous venons d'évoquer, certaines des familles parmi les sept ont été sous-étudiées, comme les « physical cracking patterns » des Amanitaceae, et mériteraient de faire l'objet d'études morphogénétiques plus poussées. La Figure 23 présente un exemple de protocole d'étude d'un tel patron de coloration répété.

Evo-dévo des patrons de couleurs des Amanitaceae



Un pattern, trois traits:



Ces trois traits présentent une grande diversité chez les Amanitaceae



Comment ces traits se forment and évoluent?

I. Biomécanique des craquelures du manteau universel

Quels sont les facteurs clés responsables:

- de la présence ou l'absence de restes d'un voile universel ?
- de la géométrie du patron ?

Sections microscopiques et analyses tissulaires
Timelapses de basidiocarpes en développement
Morphométrie géométrique
Modélisation

II. Evolution des patrons de couleur des Amanitaceae

Comment ces traits apparaissent et coévoluent ?

Corrèlent-ils avec d'autres traits (ex : la toxicité ?)

Analyse de traits assistée par deep learning sur une large base de données photographique
Mapping des traits sur la phylogénie
Reconstruction des histoires évolutives

Figure 23 : Proposition de protocole pour l'étude fonctionnelle de la formation des

« physical cracking patterns des Amanitaceae ». Source des images :

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Amanitaceae> et Bart Buyck)

Enfin, la découverte d'une nouvelle famille de mécanismes de formation de patrons de couleur répétés permettrait d'expliquer un peu plus la diversité de ces traits phénotypiques aux fonctions biologiques variées et cruciales. Parmi les pistes évoquées en conclusion de l'article de revue, les systèmes mécano-chimiques semblent prometteurs, et ce bien au-delà du cadre de la morphogenèse des patrons de coloration.

Conclusion générale

À travers leurs complémentarités, le développement du pétale de *Nigella damascena* et les patrons de couleurs répétés ont esquissé les contours d'une multitude de liens entre croissance et morphogenèse. Ils ouvrent la voie à -ou du moins plaident pour- un approfondissement de l'étude des relations entre forme et croissance, car il existe de nombreux processus encore peu étudiés, et des exemples de protocoles d'étude permettant de les mettre en évidence ont été présentés dans la section précédente. La réalisation d' une synthèse exhaustive, qui s'attachera à examiner l'entièreté des relations entre forme et croissance pendant le développement des êtres vivants, apparaît nécessaire dans les années qui viennent tant ces deux processus semblent intriqués. Cette intrication a de nombreuses implications notamment dans l'étude des processus évolutifs touchant taille et forme. Si des pressions évolutives peuvent s'appliquer sur l'une ou l'autre, la nature des liens entre croissance et morphogenèse peut imposer des compromis évolutifs, une variation de l'un pouvant entraîner une variation de l'autre. Dans ce cadre, la connaissance de l'interdépendance entre forme et

taille dans l'espèce d'étude apparaît nécessaire pour comprendre les processus de sélection qui s'y appliquent.

Mettre en évidence une relation entre forme et croissance au cours du développement est une première étape, en révéler les mécanismes qui la sous-tendent en est une deuxième, et révéler les mécanismes évolutifs qui les lient en est une troisième tout aussi importante. Quel que soit le modèle biologique étudié, essayer d'aborder ces trois facettes de manière équilibrée semble être une méthode qui devrait faire ses preuves et permettre d'éclairer au mieux les liens entre ces deux processus développementaux si cruciaux pour de nombreuses espèces.

Références

- Aiello, Leslie C. 1992. "Allometry and the Analysis of Size and Shape in Human Evolution." *Journal of Human Evolution* 22 (2): 127–47. [https://doi.org/10.1016/0047-2484\(92\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0047-2484(92)90034-7).
- Ballerini, Evangeline S., Ya Min, Molly B. Edwards, Elena M. Kramer, and Scott A. Hodges. 2020. "POPOVICH, Encoding a C2H2 Zinc-Finger Transcription Factor, Plays a Central Role in the Development of a Key Innovation, Floral Nectar Spurs, in *Aquilegia*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (36): 22552–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006912117>.
- Berthier, Serge. 2007. *Iridescences: The Physical Colors of Insects*. Springer Science & Business Media.
- Bonaventura, CELIA, and JOSEPH Bonaventura. 1983. "1 - Respiratory Pigments: Structure and Function 11 For Those Experiments Reported Here to Clarify Certain Points We Acknowledge Research Support from the U.S. Office of Naval Research, National Institutes of Health (Grant HL 15460), and National Science Foundation (Grant PCM 79-06462)." In *The Mollusca*, edited by PETER W. Hochachka, 1–50. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751402-4.50008-X>.
- Bookstein, F. L. 2013. *The Measurement of Biological Shape and Shape Change*. Springer Science & Business Media.
- Budd, Alyssa, Carmel McDougall, Kathryn Green, and Bernard M. Degnan. 2014. "Control of Shell Pigmentation by Secretory Tubules in the Abalone Mantle." *Frontiers in Zoology* 11 (1): 62. <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0062-0>.
- Burton, Fiona G, and S. G Tullett. 1985. "Respiration of Avian Embryos." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 82 (4): 735–44. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(85\)90476-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(85)90476-1).
- Carrive, Laetitia, Boris Domenech, Hervé Sauquet, Florian Jabbour, Catherine Damerval, and Sophie Nadot. 2020. "Insights into the Ancestral Flowers of Ranunculales." *Botanical Journal of the Linnean Society* 194 (1): 23–46. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa031>.
- Cullen, E, M Fernández-Mazuecos, and B J Glover. 2018. "Evolution of Nectar Spur Length in a Clade of *Linaria* Reflects Changes in Cell Division Rather than in Cell Expansion." *Annals of Botany* 122 (5): 801–9. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx213>.
- Cuthill, Innes C., William L. Allen, Kevin Arbuckle, Barbara Caspers, George Chaplin, Mark E. Hauber, Geoffrey E. Hill, et al. 2017. "The Biology of Color." *Science* 357 (6350). <https://doi.org/10.1126/science.aan0221>.
- Czesnick, Hjärdis, and Michael Lenhard. 2015. "Size Control in Plants—Lessons from Leaves and Flowers." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (8): a019190. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019190>.
- Damerval, Catherine, and Annette Becker. 2017. "Genetics of Flower Development in Ranunculales – a New, Basal Eudicot Model Order for Studying Flower Evolution." *New Phytologist* 216 (2): 361–66. <https://doi.org/10.1111/nph.14401>.
- De Gomersoro Malheiros, Marcelo, Henrique Fensterseifer, and Marcelo Walter. 2020. "The Leopard Never Changes Its Spots: Realistic Pigmentation Pattern Formation by Coupling Tissue Growth with Reaction-Diffusion." *ACM Transactions on Graphics* 39 (4): 63:63:1-63:62:14. <https://doi.org/10.1145/3386569.3392478>.
- Dickman, Martin, Brett Williams, Yurong Li, Paul de Figueiredo, and Thomas Wolpert. 2017. "Reassessing Apoptosis in Plants." *Nature Plants* 3 (10): 773–79. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0020-x>.

- Ding, Baoqing, Erin L. Patterson, Srinidhi V. Holalu, Jingjian Li, Grace A. Johnson, Lauren E. Stanley, Anna B. Greenlee, et al. 2020. "Two MYB Proteins in a Self-Organizing Activator-Inhibitor System Produce Spotted Pigmentation Patterns." *Current Biology* 30 (5): 802-814.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.067>.
- Economou, Andrew D., Atsushi Ohazama, Thantrira Porntaveetus, Paul T. Sharpe, Shigeru Kondo, M. Albert Basson, Amel Gritli-Linde, Martyn T. Cobourne, and Jeremy B.A. Green. 2012. "Periodic Stripe Formation by a Turing-Mechanism Operating at Growth Zones in the Mammalian Palate." *Nature Genetics* 44 (3): 348–51. <https://doi.org/10.1038/ng.1090>.
- Edgar, Bruce A., and Patrick H. O'Farrell. 1989. "Genetic Control of Cell Division Patterns in the Drosophila Embryo." *Cell* 57 (1): 177–87. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90183-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90183-9).
- Elias, Marianne. 2019. "Evolution of Aposematism and Mimicry in Butterflies: Causes, Consequences and Paradoxes." *Comptes Rendus Biologies, Insects: Friends, foes, and models / Insectes : amis, ennemis et modèles*, 342 (7): 256–58. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.09.010>.
- Figon, Florent, and Jérôme Casas. 2019. "Ommochromes in Invertebrates: Biochemistry and Cell Biology." *Biological Reviews* 94 (1): 156–83. <https://doi.org/10.1111/brv.12441>.
- Gayon, Jean. 2000. "History of the Concept of Allometry1." *American Zoologist* 40 (5): 748–58. <https://doi.org/10.1093/icb/40.5.748>.
- German, R. Z., and L. L. Meyers. 1989. "The Role of Time and Size in Ontogenetic Allometry: I. Review." *Growth, Development, and Aging* 53 (3): 101–6.
- Gibson, William T., and Matthew C. Gibson. 2009. "Chapter 4 Cell Topology, Geometry, and Morphogenesis in Proliferating Epithelia." In *Current Topics in Developmental Biology*, 89:87–114. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)89004-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)89004-2).
- Gómez, José M, Jordi Bosch, Francisco Perfectti, J.d Fernández, Mohamed Abdelaziz, and J.p.m Camacho. 2008. "Spatial Variation in Selection on Corolla Shape in a Generalist Plant Is Promoted by the Preference Patterns of Its Local Pollinators." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275 (1648): 2241–49. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0512>.
- Gonçalves, Beatriz, Odrade Nougé, Florian Jabbour, Céline Ridet, Halima Morin, Patrick Laufs, Domenica Manicacci, and Catherine Damerval. 2013. "An APETALA3 Homolog Controls Both Petal Identity and Floral Meristem Patterning in *Nigella Damascena* L. (Ranunculaceae)." *The Plant Journal* 76 (2): 223–35. <https://doi.org/10.1111/tpj.12284>.
- Greyson, Richard I., and Vipen K. Sawhney. 1972. "Initiation and Early Growth of Flower Organs of *Nigella* and *Lycopersicon*: Insights from Allometry." *Botanical Gazette* 133 (2): 184–90. <https://doi.org/10.1086/336632>.
- Guillot, Charlène, and Thomas Lecuit. 2013. "Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis." *Science* 340 (6137): 1185–89. <https://doi.org/10.1126/science.1235249>.
- Haddock, Steven H.D., Mark A. Moline, and James F. Case. 2010. "Bioluminescence in the Sea." *Annual Review of Marine Science* 2 (1): 443–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081028>.
- Hastings, J. Woodland. 1996. "Chemistries and Colors of Bioluminescent Reactions: A Review." *Gene, Fluorescent Proteins and Applications*, 173 (1): 5–11. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00676-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00676-1).
- Hendry, G. A. F. 1996. "Natural Pigments in Biology." In *Natural Food Colorants*, edited by G. A. F. Hendry and J. D. Houghton, 1–39. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2155-6_1.
- Herrera, Carlos M., and Pilar Bazaga. 2013. "Epigenetic Correlates of Plant Phenotypic Plasticity: DNA Methylation Differs between Prickly and Nonprickly Leaves in

- Heterophyllous *Ilex Aquifolium* (Aquifoliaceae) Trees.” *Botanical Journal of the Linnean Society* 171 (3): 441–52. <https://doi.org/10.1111/boj.12007>.
- Hoekstra, H. E. 2006. “Genetics, Development and Evolution of Adaptive Pigmentation in Vertebrates.” *Heredity* 97 (3): 222–34. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800861>.
- Huxley, Julian S. 1924. “Constant Differential Growth-Ratios and Their Significance.” *Nature* 114 (2877): 895–96. <https://doi.org/10.1038/114895a0>.
- Jabbour, Florian, Guillaume Cossard, Martine Le Guilloux, Julie Sannier, Sophie Nadot, and Catherine Damerval. 2014. “Specific Duplication and Dorsoventrally Asymmetric Expression Patterns of Cycloidea-Like Genes in Zygomorphic Species of Ranunculaceae.” *PLOS ONE* 9 (4): e95727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095727>.
- Jabbour, Florian, Pierre-Emmanuel Du Pasquier, Léa Chazalviel, Martine Le Guilloux, Natalia Conde e Silva, Yves Deveaux, Domenica Manicacci, Pierre Galipot, Andreas G. Heiss, and Catherine Damerval. 2021. “Evolution of the Distribution Area of the Mediterranean *Nigella Damascena* and a Likely Multiple Molecular Origin of Its Perianth Dimorphism.” *Flora* 274 (January): 151735. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151735>.
- Jabbour, Florian, Louis P. Ronse De Craene, Sophie Nadot, and Catherine Damerval. 2009. “Establishment of Zygomorphy on an Ontogenic Spiral and Evolution of Perianth in the Tribe Delphinieae (Ranunculaceae).” *Annals of Botany* 104 (5): 809–22. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp162>.
- Jabbour, Florian, Mathilde Udrón, Martine Le Guilloux, Beatriz Gonçalves, Domenica Manicacci, Sophie Nadot, and Catherine Damerval. 2015. “Flower Development Schedule and AGAMOUS-like Gene Expression Patterns in Two Morphs of *Nigella Damascena* (Ranunculaceae) Differing in Floral Architecture.” *Botanical Journal of the Linnean Society* 178 (4): 608–19. <https://doi.org/10.1111/boj.12297>.
- Just, K., U. Arif, A. Luik, and A. Kvarnheden. 2017. “Monitoring Infection of Tomato Fruit by Tomato Yellow Leaf Curl Virus.” *Plant Pathology* 66 (4): 522–28. <https://doi.org/10.1111/ppa.12596>.
- Kinoshita, Shuichi. 2008. *Structural Colors in the Realm of Nature*. World Scientific.
- Klingenberg, Christian Peter. 2016. “Size, Shape, and Form: Concepts of Allometry in Geometric Morphometrics.” *Development Genes and Evolution* 226 (3): 113–37. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>.
- Klingenberg, Christian Peter, Marta Barluenga, and Axel Meyer. 2002. “Shape Analysis of Symmetric Structures: Quantifying Variation among Individuals and Asymmetry.” *Evolution* 56 (10): 1909–20.
- Kondo, Shigeru. 2017. “An Updated Kernel-Based Turing Model for Studying the Mechanisms of Biological Pattern Formation.” *Journal of Theoretical Biology* 414 (Supplement C): 120–27. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.11.003>.
- Kondo, Shigeru, and Rihito Asai. 1995. “A Reaction-diffusion Wave on the Skin of the Marine Angelfish *Pomacanthus*.” *Nature* 376 (6543): 376765a0. <https://doi.org/10.1038/376765a0>.
- Kondo, Shigeru, and Takashi Miura. 2010. “Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation.” *Science* 329 (5999): 1616–20. <https://doi.org/10.1126/science.1179047>.
- Kondorosi, Eva, François Roudier, and Emmanuel Gendreau. 2000. “Plant Cell-Size Control: Growing by Ploidy?” *Current Opinion in Plant Biology* 3 (6): 488–92. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00118-7).
- Krizek, Beth A., and Jill T. Anderson. 2013. “Control of Flower Size.” *Journal of Experimental Botany* 64 (6): 1427–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert025>.
- Kunita, Itsuki, Miyo Terao Morita, Masashi Toda, and Takumi Higaki. 2021. “A Three-Dimensional Scanning System for Digital Archiving and Quantitative Evaluation of

- Arabidopsis Plant Architectures.” *Plant and Cell Physiology*, no. pcab068 (June). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab068>.
- Kunz, Yvette W. 2004. “Yolk (Vitellus).” In *Developmental Biology of Teleost Fishes*, edited by Yvette W. Kunz, 23–40. Fish & Fisheries Series. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2997-4_3.
- Lehtonen, Samuli, Maarten J. M. Christenhusz, and Daniel Falck. 2016. “Sensitive Phylogenetics of Clematis and Its Position in Ranunculaceae.” *Botanical Journal of the Linnean Society* 182 (4): 825–67. <https://doi.org/10.1111/boj.12477>.
- Liao, Hong, Xuehao Fu, Huiqi Zhao, Jie Cheng, Rui Zhang, Xu Yao, Xiaoshan Duan, Hongyan Shan, and Hongzhi Kong. 2020. “The Morphology, Molecular Development and Ecological Function of Pseudonectaries on *Nigella Damascena* (Ranunculaceae) Petals.” *Nature Communications* 11 (1): 1777. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15658-2>.
- Liu, R. T., S. S. Liaw, and P. K. Maini. 2006. “Two-Stage Turing Model for Generating Pigment Patterns on the Leopard and the Jaguar.” *Physical Review E* 74 (1): 011914. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.011914>.
- Macel, Marie-Lyne, Filomena Ristoratore, Annamaria Locascio, Antonietta Spagnuolo, Paolo Sordino, and Salvatore D’Aniello. 2020. “Sea as a Color Palette: The Ecology and Evolution of Fluorescence.” *Zoological Letters* 6 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s40851-020-00161-9>.
- Mack, Jaimie-Lee K., and Arthur R. Davis. 2015. “The Relationship between Cell Division and Elongation during Development of the Nectar-Yielding Petal Spur in *Centranthus Ruber* (Valerianaceae).” *Annals of Botany* 115 (4): 641–49. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu261>.
- Mallarino, Ricardo, Otger Campàs, Joerg A. Fritz, Kevin J. Burns, Olivia G. Weeks, Michael P. Brenner, and Arhat Abzhanov. 2012. “Closely Related Bird Species Demonstrate Flexibility between Beak Morphology and Underlying Developmental Programs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (40): 16222–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206205109>.
- Marguerat, Samuel, and Jürg Bähler. 2012. “Coordinating Genome Expression with Cell Size.” *Trends in Genetics* 28 (11): 560–65. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.003>.
- Martins, António F., Nigel C. Bennett, Sylvie Clavel, Herman Groenewald, Sean Hensman, Stefan Hoby, Antoine Joris, Paul R. Manger, and Michel C. Milinkovitch. 2018. “Locally-Curved Geometry Generates Bending Cracks in the African Elephant Skin.” *Nature Communications* 9 (1): 3865. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06257-3>.
- McClintock, Barbara. 1950. “The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36 (6): 344–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>.
- Meaders, Clara, Ya Min, Katherine J Freedberg, and Elena Kramer. 2020. “Developmental and Molecular Characterization of Novel Staminodes in *Aquilegia*.” *Annals of Botany* 126 (2): 231–43. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa029>.
- Michelot, Didier, and Leda Maria Melendez-Howell. 2003. “*Amanita Muscaria*: Chemistry, Biology, Toxicology, and Ethnomycology.” *Mycological Research* 107 (2): 131–46. <https://doi.org/10.1017/S0953756203007305>.
- Milinkovitch, Michel C., Liana Manukyan, Adrien Debry, Nicolas Di-Poï, Samuel Martin, Daljit Singh, Dominique Lambert, and Matthias Zwicker. 2013. “Crocodile Head Scales Are Not Developmental Units But Emerge from Physical Cracking.” *Science* 339 (6115): 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1226265>.
- Minelli, Alessandro, and Giuseppe Fusco. 2013. “Arthropod Post-Embryonic Development.” In *Arthropod Biology and Evolution: Molecules, Development, Morphology*, edited by Alessandro Minelli, Geoffrey Boxshall, and Giuseppe Fusco, 91–122. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36160-9_5.

- Nagai, Hiroki, Siu-Shan Mak, Wei Weng, Yukiko Nakaya, Raj Ladher, and Guojun Sheng. 2011. “Embryonic Development of the Emu, *Dromaius Novaehollandiae*.” *Developmental Dynamics* 240 (1): 162–75. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22520>.
- Nagashima, Yoshinobu, Satoru Tsugawa, Atsushi Mochizuki, Takema Sasaki, Hiroo Fukuda, and Yoshihisa Oda. 2018. “A Rho-Based Reaction-Diffusion System Governs Cell Wall Patterning in Metaxylem Vessels.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29543-y>.
- Palacio-López, Kattia, Brian Beckage, Samuel Scheiner, and Jane Molofsky. 2015. “The Ubiquity of Phenotypic Plasticity in Plants: A Synthesis.” *Ecology and Evolution* 5 (16): 3389–3400. <https://doi.org/10.1002/ece3.1603>.
- Pauw, Anton, Belinda Kahnt, Michael Kuhlmann, Denis Michez, Graham A. Montgomery, Elizabeth Murray, and Bryan N. Danforth. 2017. “Long-Legged Bees Make Adaptive Leaps: Linking Adaptation to Coevolution in a Plant–Pollinator Network.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284 (1862): 20171707. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1707>.
- Phillips, Natasha D., Lukas Kubicek, Nicholas L. Payne, Chris Harrod, Lawrence E. Eagling, Carol D. Carson, Valentina Cappanera, and Jonathan D. R. Houghton. 2018. “Isometric Growth in the World’s Largest Bony Fishes (Genus *Mola*)? Morphological Insights from Fisheries Bycatch Data.” *Journal of Morphology* 279 (9): 1312–20. <https://doi.org/10.1002/jmor.20872>.
- Purtov, Konstantin V., Valentin N. Petushkov, Mikhail S. Baranov, Konstantin S. Mineev, Natalja S. Rodionova, Zinaida M. Kaskova, Aleksandra S. Tsarkova, et al. 2015. “The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence.” *Angewandte Chemie* 127 (28): 8242–46. <https://doi.org/10.1002/ange.201501779>.
- Puzey, Joshua R., Sharon J. Gerbode, Scott A. Hodges, Elena M. Kramer, and L. Mahadevan. 2012. “Evolution of Spur-Length Diversity in *Aquilegia* Petals Is Achieved Solely through Cell-Shape Anisotropy.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1733): 1640–45. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1873>.
- Raskin, Richard. 2021. *Seashell Beauty and the Concept of Nature at Play*. Quid Pro Books.
- Roddy, Adam B., Guillaume Théroux-Rancourt, Tito Abbo, Joseph W. Benedetti, Craig R. Brodersen, Mariana Castro, Silvia Castro, et al. 2020. “The Scaling of Genome Size and Cell Size Limits Maximum Rates of Photosynthesis with Implications for Ecological Strategies.” *International Journal of Plant Sciences* 181 (1): 75–87. <https://doi.org/10.1086/706186>.
- Rolland-Lagan, Anne-Gaëlle, J. Andrew Bangham, and Enrico Coen. 2003. “Growth Dynamics Underlying Petal Shape and Asymmetry.” *Nature* 422 (6928): 161–63. <https://doi.org/10.1038/nature01443>.
- Ronse De Craene, Louis P., and Samuel F. Brockington. 2013. “Origin and Evolution of Petals in Angiosperms.” *Plant Ecology and Evolution* 146 (1): 5–25. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2013.738>.
- Rymen, Bart, Frederik Coppens, Stijn Dhondt, Fabio Fiorani, and Gerrit T.S. Beemster. 2010. “Kinematic Analysis of Cell Division and Expansion.” In *Plant Developmental Biology: Methods and Protocols*, edited by Lars Hennig and Claudia Köhler, 203–27. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-765-5_14.
- Saka, Yasushi, and James C Smith. 2001. “Spatial and Temporal Patterns of Cell Division during Early *Xenopus* Embryogenesis.” *Developmental Biology* 229 (2): 307–18. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0101>.
- Sauquet, Hervé, Maria von Balthazar, Susana Magallón, James A. Doyle, Peter K. Endress, Emily J. Bailes, Erica Barroso de Morais, et al. 2017. “The Ancestral Flower of Angiosperms and Its Early Diversification.” *Nature Communications* 8 (1): 16047. <https://doi.org/10.1038/ncomms16047>.

- Shawkey, Matthew D., Nathan I. Morehouse, and Peter Vukusic. 2009. "A Protean Palette: Colour Materials and Mixing in Birds and Butterflies." *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 6 Suppl 2 (April): S221-231. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0459.focus>.
- Sheth, Rushikesh, Luciano Marcon, M. Félix Bastida, Marisa Junco, Laura Quintana, Randall Dahn, Marie Kmita, James Sharpe, and Maria A. Ros. 2012. "Hox Genes Regulate Digit Patterning by Controlling the Wavelength of a Turing-Type Mechanism." *Science (New York, N.Y.)* 338 (6113): 1476–80. <https://doi.org/10.1126/science.1226804>.
- Slavkin, Harold C., and Lucien A. Bavetta. 2017. *Developmental Aspects of Oral Biology*. Elsevier.
- Smith, Matilda Q. R. Pembury, and Graeme D. Ruxton. n.d. "Camouflage in Predators." *Biological Reviews* n/a (n/a). Accessed July 28, 2020. <https://doi.org/10.1111/brv.12612>.
- Stuart-Fox, Devi, and Adnan Moussalli. 2009. "Camouflage, Communication and Thermoregulation: Lessons from Colour Changing Organisms." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1516): 463–70. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0254>.
- Sulaimon, Shola S., and Barbara E. Kitchell. 2003. "The Biology of Melanocytes." *Veterinary Dermatology* 14 (2): 57–65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2003.00327.x>.
- Sultan, Sonia E. 2000. "Phenotypic Plasticity for Plant Development, Function and Life History." *Trends in Plant Science* 5 (12): 537–42. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01797-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01797-0).
- T, Deroin, Damerval C, Le Guilloux M, and Jabbour F. 2015. "Floral Vascular Patterns of the Double-Flowered and Wild-Type Morphs of *Nigella Damascena* L. (Ranunculaceae)." *Modern Phytomorphology* 7 (May): 13–20. <https://doi.org/10.5281/zenodo.160356>.
- Takenaka, Yasuhiro, Atsushi Yamaguchi, and Yasushi Shigeri. 2017. "A Light in the Dark: Ecology, Evolution and Molecular Basis of Copepod Bioluminescence." *Journal of Plankton Research* 39 (3): 369–78. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbx016>.
- Tanikawa, Natsu, Kazuki Honma, and Fumi Tatsuzawa. 2019. "Flavonoids of the Rose-Pink, Blue, and White Flowers of *Nigella Damascena* L. (Ranunculaceae)." *Scientia Horticulturae* 257 (November): 108609. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108609>.
- "Terminology of Relative Growth | Nature." n.d. Accessed July 31, 2021. <https://www.nature.com/articles/137780b0>.
- The Angiosperm Phylogeny Group, M. W. Chase, M. J. M. Christenhusz, M. F. Fay, J. W. Byng, W. S. Judd, D. E. Soltis, et al. 2016. "An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG IV." *Botanical Journal of the Linnean Society* 181 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- Thompson, D'Arcy Wentworth. 1992. *On Growth and Form*. Edited by John Tyler Bonner. Canto. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107325852>.
- Thompson, Eric M., and Jean-François Rees. 1995. "Chapter 18 Origins of Luciferins: Ecology of Bioluminescence in Marine Fishes." In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, edited by P. W. Hochachka and T. P. Mommsen, 4:435–66. Metabolic Biochemistry. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80021-4](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80021-4).
- Troscianko, Jolyon, John Skelhorn, and Martin Stevens. 2017. "Quantifying Camouflage: How to Predict Detectability from Appearance." *BMC Evolutionary Biology* 17 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0854-2>.
- Truman, James W. 2019. "The Evolution of Insect Metamorphosis." *Current Biology* 29 (23): R1252–68. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.009>.

- Turing, A. M., and F. R. S. 1952. "The Chemical Basis of Morphogenesis." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 237 (641): 37–72. <https://doi.org/10.1098/rstb.1952.0012>.
- Verdes, Aida, Wooyoung Cho, Marouf Hossain, Patricia L. R. Brennan, Daniel Hanley, Tomáš Grim, Mark E. Hauber, and Mandë Holford. 2015. "Nature's Palette: Characterization of Shared Pigments in Colorful Avian and Mollusk Shells." *PLOS ONE* 10 (12): e0143545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143545>.
- Viviani, V. R. 2002. "The Origin, Diversity, and Structure Function Relationships of Insect Luciferases." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59 (11): 1833–50. <https://doi.org/10.1007/PL00012509>.
- Wei, Xin, Chongyang Gao, and Ke Liu. 2020. "A Review of Cracking Behavior and Mechanism in Clayey Soils Related to Desiccation." *Advances in Civil Engineering* 2020 (August): e8880873. <https://doi.org/10.1155/2020/8880873>.
- Werner, Thomas, Shigeyuki Koshikawa, Thomas M. Williams, and Sean B. Carroll. 2010. "Generation of a Novel Wing Colour Pattern by the Wingless Morphogen." *Nature* 464 (7292): 1143–48. <https://doi.org/10.1038/nature08896>.
- Whittall, Justen B., and Scott A. Hodges. 2007. "Pollinator Shifts Drive Increasingly Long Nectar Spurs in Columbine Flowers." *Nature* 447 (7145): 706–9. <https://doi.org/10.1038/nature05857>.
- Widder, Edith. 2002. "Bioluminescence and the Pelagic Visual Environment." *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 35 (1–2): 1–26. <https://doi.org/10.1080/10236240290025581>.
- Yangt, Z L, and F Oberwinklerr. n.d. "Die Fruchtkörperentwicklung von Amanita muscarta (Basidiomycetes)," 28.
- Yant, Levi, Silvio Collani, Joshua Puzey, Clara Levy, and Elena M. Kramer. 2015. "Molecular Basis for Three-Dimensional Elaboration of the Aquilegia Petal Spur." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282 (1803): 20142778. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2778>.
- Yao, Xu, Wengen Zhang, Xiaoshan Duan, Yi Yuan, Rui Zhang, Hongyan Shan, and Hongzhi Kong. 2019. "The Making of Elaborate Petals in Nigella through Developmental Repatterning." *New Phytologist* 223 (1): 385–96. <https://doi.org/10.1111/nph.15799>.
- Zalko, Julie, Samuel Frachon, Antoine Morel, Thierry Deroin, Felipe Espinosa, Kun-Li Xiang, Wei Wang, et al. 2021. "Floral Organogenesis and Morphogenesis of Staphisagria (Ranunculaceae): Implications for the Evolution of Synorganized Floral Structures in Delphinieae." *International Journal of Plant Sciences* 182 (1): 59–70. <https://doi.org/10.1086/711471>.
- Zhai, Wei, Xiaoshan Duan, Rui Zhang, Chunce Guo, Lin Li, Guixia Xu, Hongyan Shan, Hongzhi Kong, and Yi Ren. 2019. "Chloroplast Genomic Data Provide New and Robust Insights into the Phylogeny and Evolution of the Ranunculaceae." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 135 (June): 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.024>.
- Zhang, Rui, Xuehao Fu, Caiyao Zhao, Jie Cheng, Hong Liao, Peipei Wang, Xu Yao, et al. 2020. "Identification of the Key Regulatory Genes Involved in Elaborate Petal Development and Specialized Character Formation in Nigella Damascena (Ranunculaceae)." *The Plant Cell* 32 (10): 3095–3112. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00330>.