

**Régulation mécano-transductionnelle des
invaginations du mésoderme et de l'endoderme
postérieur de l'embryon de *Drosophila*.**

Par

Benjamin DRIQUEZ

Université René DESCARTES

École doctorale Frontières Du Vivant

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR

Domaines: interface physique-biologie

Jury:

Présidente, Anne PLESSIS

Rapporteur, Olivier HAMANT

Rapporteur, José MUÑOZ

Directeur de thèse, Emmanuel FARGE

Membre, Christine MÉNAGER

Membre, Roger KARESS

Université René DESCARTE
Frontières Du Vivant

10 octobre 2013

À Patrick
Gba crgyg yvahkvra raphyrhe qr zbhpur

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier sincèrement Emmanuel FARGE de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant ces 3 années de doctorat et les 6 mois de stage qui les ont précédés.

Tu m'as appris plus que quiconque au cours de mon parcours à persévérer et à me poser les bonnes questions tout en acceptant le fait qu'une intuition même bonne nécessite un investissement non négligeable de temps et d'énergie. Je te remercie également de m'avoir fait confiance et d'avoir su à la perfection m'encadrer tout en me laissant mon indépendance. Enfin je te remercie de ta bonne humeur permanente, d'avoir réussi à me motiver quand je baissais la garde et d'avoir toujours un petit mot gentil quand l'investissement et les résultats étaient là.

Je tiens également à remercier Anne PLESSIS et Roger KARESS qui ont accepté de me suivre tout au long de ma thèse et qui me font l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury, et tout particulièrement à Anne pour son investissement dans la mise en place de tests en double aveugle.

Je voudrais également remercier Olivier HAMANT, Chistine MÉNAGER et José MUÑOZ qui me font également l'honneur de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'équipe ou qui en on fait partie — Padra AHMADI, Sandrine BARBIER, Adrien BOUCLET, Anne-Christine BRUNET, Maria-Elena FERNANDEZ-SANCHEZ, Démosthène MITROSILIS, Jens ROEPER et Fanny SERMAN — pour les discussions, leur aide ; et plus particulièrement pour Démosthène qui a donné beaucoup de temps et d'énergie pour m'aider pour les photoablations aussi bien que pour les injections.

Je remercie tout particulièrement Armelle et Olivier qui m'ont laissé me ressourcer à l'animalerie poisson qui est rapidement devenue ma petite oasis de tranquillité.

Xavier avec qui j'ai partagé le même bureau pendant deux ans pour ses soirées jeu qui permettent de se changer les idées, Caroline, Jeanne et Laure pour leur bonne humeur, Julien pour les heures de «sauts», Arnaud pour sa bonne humeur, Jean, Marie, Matthias et Ophélie pour toutes les discussions non scientifiques pendant les pauses déjeuner. Toutes celles et ceux du Fabelier pour les soirées geek et leur aide en tout genre. FDV et AIV pour ces merveilleuses années.

Ma mère, qui a toujours été là depuis le début et qui m'a toujours poussé à l'autonomie et m'a encouragé dans mes choix, et ma famille en général même si

au cours des trois dernières années les moments ensemble ont été plutôt rares.

J'ai aussi une pensée toute particulière pour mes amis les plus proches, Aurélien, dont les compétences en informatique m'ont beaucoup aidé, et Rémi ainsi que sa famille. Je remercie aussi ma belle-famille, particulièrement Audrey et Pierre-David.

Enfin, je tiens à remercier ma compagne Anna qui m'a soutenu pendant ces trois ans et qui va à présent me suivre à l'étranger pour de nouvelles aventures... et un contrat post-doctoral!

Merci pour tout

Sommaire

I	Modèle multi-cellulaire mécanotransductionnel de la gastrulation de l'embryon de <i>Drosophila</i>	1
1	Principe de la simulation	3
1.1	Simulation à une dimension	3
1.2	Simulation en deux dimensions	9
2	Résultats de la simulation	13
II	Induction mécanique de la transition blastula-gastrae d'HAECKEL en réponse au contact mécanique avec le sol <i>in-silico</i>	23
3	Déformation d'une sphère creuse soumise à une force : le problème de Hertz	27
4	Déplieement de vésicules d'endocytose au contact	31
5	Résultats de la simulation	35
5.1	Simulation <i>in silico</i> du comportement de la gastrae d'HAECKEL au contact avec le plancher océanique	35
5.2	La gastrae d'HAECKEL est-elle toujours en mesure d'invaginer sans la présence de l'ancêtre de la voie mécanotransductionnelle Fog?	40
III	Mécanotransduction et expression génétique au cours de la gastrulation	45
6	Régulation mécanique de l'expression de <i>twist</i> dans le mésoderme	49
7	Implication de la phosphorylation du site Y-667 de la β-caténine dans le processus de mécano-transduction initiant l'induction mécanique de l'expression de <i>twist</i>	53

IV Induction mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II et de l'invagination de l'endoderme postérieur par l'invagination du mésoderme	63
8 L'invagination du pôle postérieur provoquée par la stabilisation apicale de la Myo-II est localement Fog dépendante mais <i>snail</i> indépendante	65
9 Première approche : La photoablation des tissus moteurs de l'invagination du mésoderme et de l'extension de la bande germinale	71
9.1 L'hypothèse d'une induction mécanique par l'extension de la bande germinale	71
9.2 Photoablation dorsale et ventrale de l'embryon	73
10 Deuxième approche : Rétablissement des mouvements de l'endoderme postérieur par manipulation magnétique sur des mutants <i>halo snail</i>	75
A Mise au point d'une méthode d'injection de liposomes ultramagnétiques pour mimer les déformations mécaniques endogènes dans l'épithélium vivant de l'embryon de <i>Drosophile</i>	83
B Mesure de la vitesse de cellularisation	87
Références	91

Introduction

L'embryogénèse combine deux principaux types de processus morphogénétiques : le patron génétique qui définit le plan de formation de l'organisme d'un côté et de l'autre les mouvements mécaniques qui permettent de générer la forme géométrique de l'embryon.

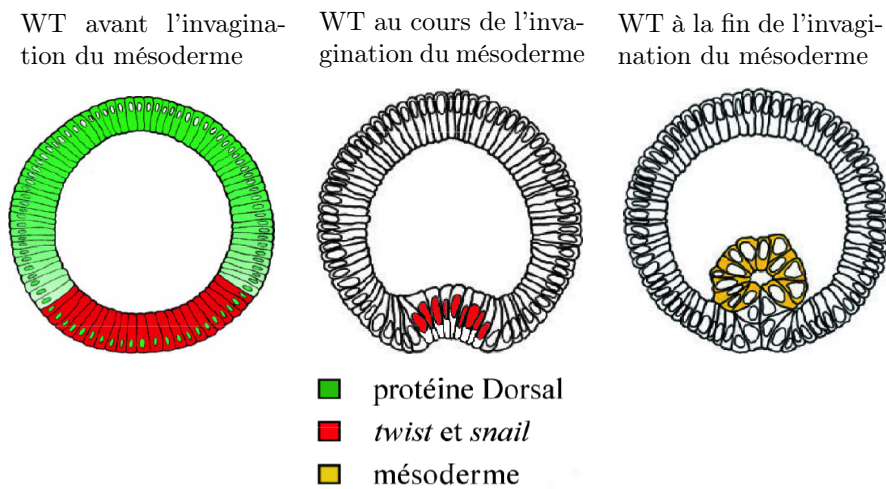
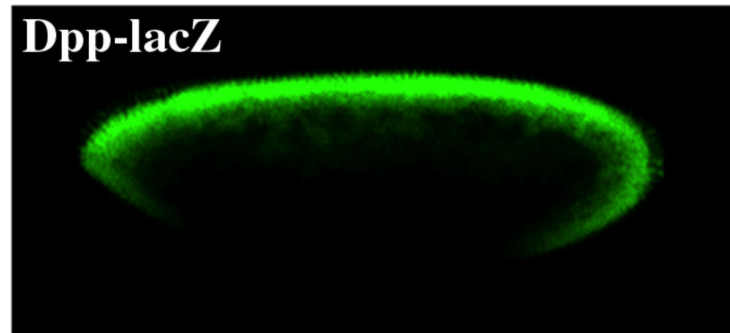


FIGURE 1 – Schéma de l'invagination du mésoderme et de l'expression génétique au cours de cette dernière

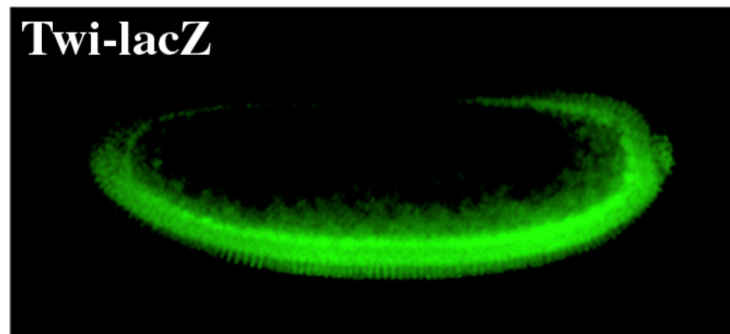
Le patterning biochimique

La mise en place patron génétique consiste en une cascade d'expression de gènes (Speman & Mangold, 1924; Lawrence et al., 1992; Gilbert, 1994) qui détermine le destin des cellules durant le développement en fonction de leurs positions (Lewis et al., 1978; Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980; Garber et al., 1983; Claret et al., 2007). À titre d'exemple, la polarité dorso-ventrale de l'embryon de *Drosophila* est initiée par l'activation du récepteur Toll sur la partie ventrale de l'embryon, ce qui induit la formation d'un gradient dorso-ventral de la concentration nucléaire de la protéine Dorsal (Roth, Stein, & Nüsslein-Volhard, 1989).

Dorsal agit comme un morphogène car une concentration nucléaire élevée active l'expression des facteurs de transcription *twist* et *snail* dans les noyaux des cellules ventrales (FIGURE 2a). Elle entraîne de même une répression de *dpp* et de *zen* ce qui restreint en conséquence leurs expressions au niveau des



(a) Marquage *dpp-lacZ* d'un embryon WT à stade 5



(b) Marquage *twist-lacZ* d'un embryon WT à stade 5

FIGURE 2 – La polarité dorsoventrale de l'embryon est la conséquence de facteurs maternels. *twist* est exprimé ventralement alors que *dpp* est exprimé dorsalement

cellules dorsales (FIGURE 2a) (Ray, Arora, Nusslein-Volhard, & Gelbart, 1991 ; Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992).

La morphogenèse biomécanique

Le second type de processus morphogénétique embryonnaire comprend les mouvements et changements de forme cellulaires qui déterminent la forme physique de l'embryon. Cette séquence de mouvements morphogénétiques est initiée au moment de la gastrulation et est étroitement contrôlée par la cascade d'expression de gènes développementaux (FIGURE 3A ; Costa et al., 1993).

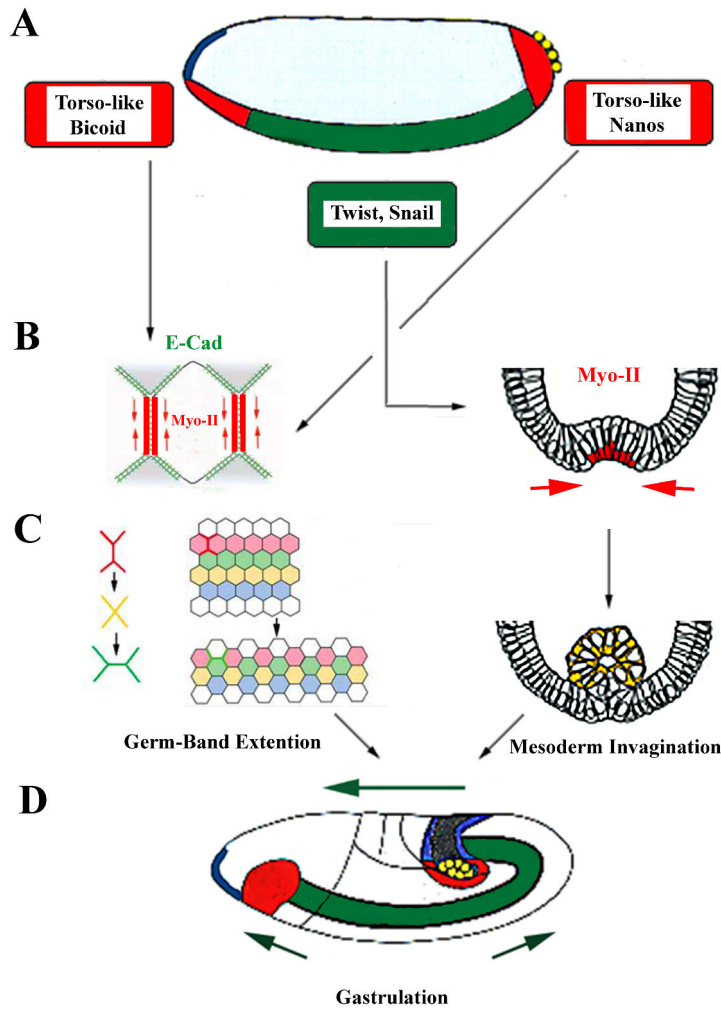


FIGURE 3 – Contrôle des mouvements morphogénétiques multicellulaires au cours de la gastrulation dans l'embryon de *Drosophila* via des polarités intracellulaires de Myo-II génétiquement contrôlées.

Extension de la bande germinale : A - avant la gastrulation, le patron d'expression génétique déterminant la polarité antéro-postérieure est contrôlé par les produits maternels Bicoid au pôle antérieur et Nanos au pôle postérieur (en rouge). B - cela conduit à établir la polarité planaire de concentration de Myo-II submembranaire (en rouge à gauche) contrôlée par le produit maternel Torso-like. L'origine du mécanisme moléculaire liant l'expression du patron génétique antéro-postérieur à la polarité planaire n'est pas entièrement comprise. C - cette polarité entraîne un accroissement de la tension membranaire perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur menant à un réarrangement dorsoventral des cellules par intercalage (adapté de Bertet et al., 2004) augmentant la longueur antéro-postérieure du tissu au cours de la gastrulation (D flèches vertes).

Invagination du mésoderme : A - avant la gastrulation, le patron d'expression des gènes développementaux détermine la polarité dorsoventrale de l'embryon contrôlée par le facteur maternel Dorsal qui active l'expression ventrale des gènes du mésoderme *twist* et *snail* (en vert). B - ces gènes entraînent de concert l'induction de l'accumulation apicale submembranaire de Myo-II (en rouge à droite) qui augmente la tension de surface apicale. C et D - la conséquence est la diminution de la surface apicale et une augmentation de la surface basale qui déclenche une inversion de la courbure et l'invagination du mésoderme pendant la gastrulation. Les mécanismes moléculaires liant l'expression du patron génétique *twist* et *snail* à l'attraction apicale de la Myo-II sont mieux compris.

Dans l'embryon de *Drosophila*, le premier mouvement de la gastrulation est l'invagination du mésoderme. Sous le contrôle des gènes *snail* et *twist* (FIGURE 3A), chaque cellule du mésoderme subit un changement de forme qui la voit passer d'une forme de cylindre à une forme trapézoïdale de pyramide inversée tronquée (FIGURE 3B). C'est ce même changement de forme qui conduit à créer une forte courbure du tissu et c'est finalement cette même courbure qui est responsable de l'invagination du mésoderme dans le *yolk* (Leptin & Grunewald, 1990 ; Costa et al., 1993).

Durant l'invagination du mésoderme (10min après le début de l'invagination, cette dernière durant 20min) commence l'extension de la bande germinale. Ce mouvement de convergence-extension est le résultat d'un processus d'intercalation cellulaire dorso-ventrale ayant pour effet l'élongation de la partie ventrale de l'embryon (FIGURE 3C et 3D ; Costa et al., 1993). Au cours de cette extension nous pouvons observer l'invagination de l'endoderme postérieur qui formera la fin du tube gastrique et l'invagination de l'endoderme antérieur qui donnera la bouche et le début du tube gastrique, lesquels finiront par fusionner au cours du développement embryonnaire.

L'extension de la bande germinale est régulée par trois facteurs maternels qui déterminent l'axe antéro-postérieur : Bicoid, Nanos et Torso-like (FIGURE 3A). En effet, cette détermination de l'axe antéro-postérieur ne se fait pas chez les embryons dont la mère est mutante pour *bicoid*, *nanos* et *torso-like* (Sweeton et al., 1991).

Au sein d'autres espèces, le contrôle génétique de ces mouvements morphogénétiques commence à être élucidé. Par exemple, la translocation de la β -caténine dans le noyau des cellules du mésoderme de l'embryon d'oursin détermine le destin méso-endodermal de cellules et induit leur invagination au cours de la gastrulation (Davidson, 2001). La translocation de la β -caténine dans le noyau de ces cellules précède immédiatement leur invagination (McClay et al., 2000 ; Sweet et al., 1999 ; Davidson et al., 1998).

La translocation de la β -cat est également observée dans les cellules du mésoderme des poissons-zèbres (*Danio Rerio*) avant l'involution de ces cellules lors de l'amorce de l'épibolie de 4h (stade sphère) à 7h (stade bouclier) (Kelly et al., 2000). Cependant les mécanismes qui régulent le développement des mouvements morphogénétiques sont encore mal connus (Davidson, 2001 ; McClay et al., 2000 ; Kelly et al., 2000).

Contrôle mécanique de l'activation de voie de transduction morphogènes

Les mouvements morphogénétiques ont de plus été récemment impliqués en retour dans la modulation du patron génétique lié au développement. En effet, la migration cellulaire est connue pour être importante dans la modula-

tion de processus d'induction classique car elle cause des changements dans les contacts cellule-cellule qui mènent à un changement d'interactions cellulaires locales (Y. Takahashi, Bontoux, & Le Douarin, 1991). Cependant l'éventualité d'une régulation directe de l'expression des gènes développementaux par des paramètres de contrôle mécaniques tels que la compression, la dilatation ou les déformations de courbure n'étaient jusqu'à récemment pas connus.

La manière la plus simple pour expliquer qu'un changement de forme embryonnaire puisse contrôler l'expression des gènes développementaux est de supposer que l'expression de ces gènes soit sensible au stress mécanique. N'importe quel mouvement morphogénétique est nécessairement associé à une déformation passive dans le tissu embryonnaire associé comme adjacent.

De telles déformations peuvent réguler l'expression de gènes mécanosensibles, en particulier dans les domaines cellulaires où les contraintes sont fortement déformantes. La mécanosensibilité de l'expression génétique est une propriété bien connue des cellules de mammifères soumises à des stress mécaniques, comme dans les ostéoblastes ou les cellules endothéliales des lignées de vaisseaux sanguins.

Par exemple, un des principaux composants de la réponse mécanosensible des cellules veineuses endothéliales est la translocation active de Nf-KB qui active la transcription de PDGF modulant ainsi le taux de division cellulaire en fonction du flux hydrodynamique auquel les cellules sont soumises (Khachigian et al., 1995).

Quant aux ostéoblastes, le stress mécanique appliqué à la membrane plasmique inhibe l'endocytose de BMP2 ce qui amplifie la translocation nucléaire des facteurs de transcription de la famille *Smad*, qui déclenche la trans-différentiation myoblaste-ostéoblastes (Rauch, Brunet, Deleule, & Farge, 2002). La croissance cellulaire, la différenciation cellulaire, la vitesse de migration cellulaire et l'apoptose cellulaire peuvent de plus être mécaniquement contrôlés par la forme de la cellule par des mécanismes impliquant le cytosquelette ou ses points de contact avec le substrat (Galbraith & Sheetz, 1998; Dike et al., 1999).

Or l'embryogénèse est composée de mouvements morphogénétiques, et le rôle de la mécanosensitivité dans la régulation de l'expression des gènes développementaux commence à être exploré. Dans l'endoderme antérieur de l'embryon de *Drosophila* l'expression de *twist* est sensible à un stress endogène lié à l'extension de la bande germinale (FIGURE 4A), via l'activation mécanique de la translocation nucléaire de cofacteur de transcription de la β -cat / Armadillo (Farge, 2003; Desprat, Supatto, Pouille, Beaurepaire, & Farge, 2008).

Découverte dans l'embryon de *Drosophila*, la mécanosensibilité de la voie β -cat / Armadillo est aujourd'hui trouvée dans de nombreuses situations, incluant la régulation du développement des articulations osseuses chez la souris (FIGURE 4B; Kahn et al., 2009) comme la régulation des processus d'adipogenèse en culture cellulaire (Sen et al., 2008).

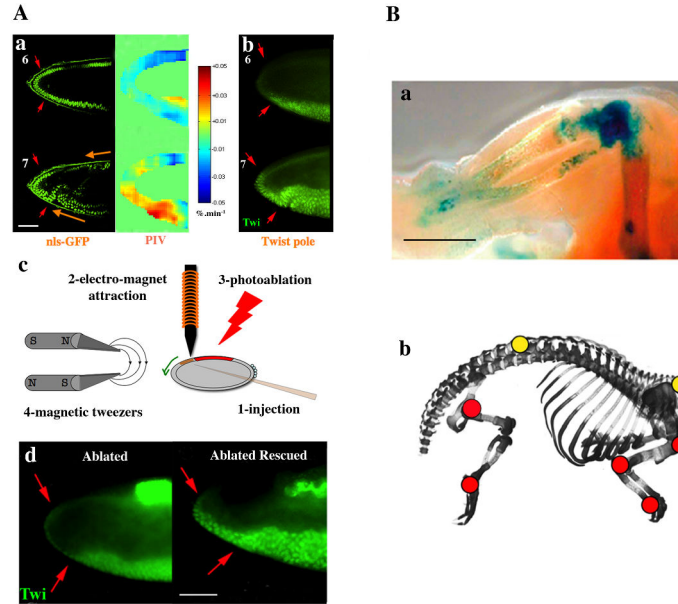


FIGURE 4 – Aa et Ab - Accroissement de l'expression de *twist* corrélée avec la compression par l'extension de la bande germinale au début de la gastrulation. Le marquage nucléaire Nls-GFP montre la compression de l'endoderme antérieur (entre les flèches rouges) entre le stade 6 et fin stade 7 en réponse à l'extension de la bande germinale (flèches oranges) . L'inhibition de l'extension de la bande germinale par ablation laser du domaine dorsal de l'embryon empêche la compression de l'endoderme antérieur, et l'expression de *twist* dans ce tissu. Le rétablissement de la compression manquante par voie magnétique dans l'embryon ablaté provoque le rétablissement de l'expression de *twist* dans l'endoderme antérieur. Le processus est provoqué par l'activation mécanique de la voie β -cat . B - la mécanosensibilité de la voie β -cat /Armadillo est également impliquée dans le développement chez la souris où les contractions musculaires permettent de maintenir la différenciation des cellules des articulations osseuses.

L'implication de processus de mécanotransduction dans le développement embryonnaire du méristème a de même été trouvé chez les plantes, via la mécanosensibilité de l'orientation des microtubules (Hamant et al., 2008).

Dans l'embryon de *Drosophila*, la Myo-II joue un rôle fondamental dans la morphogénèse biomécanique (Royou, Field, Sisson, Sullivan, & Karess, 2004; Bertet et al., 2004). L'activation mécanique de processus actifs morphogénétiques a été trouvée dans l'embryon de *Drosophila*, via l'activation du recrutement apical de la Myo-II en réponse aux sollicitations mécaniques dont on pense qu'elles sont développées par les fluctuations actives de forme des apex des cellules du mésoderme qui précèdent.

Des expériences d'indentation du mésoderme indiquent en effet que des sollicitations mécaniques endogènes *snail* dépendantes pourraient provoquer la stabilisation submembranaire apicale de la Myo-II nécessaire à l'invagination du mésoderme (FIGURE 5; Pouille et al., 2009).

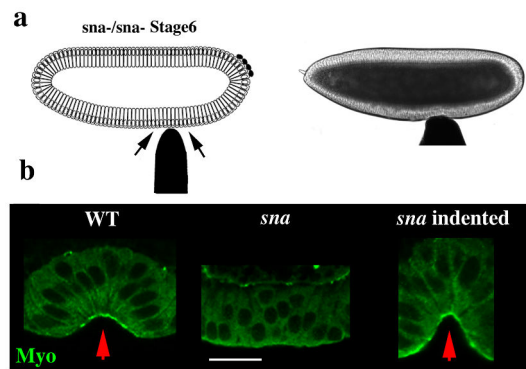


FIGURE 5 – a - indentation sur un mutant de *snail* pour rétablir le défaut de contrainte dû à la mutation de *snail*. b - rétablissement de la stabilisation apicale de la Myo-II et de l'invagination du mésoderme dans un mutant de *snail* après indentation.

Objectifs de la thèse

Le premier objectif de ma thèse (Partie I) a été de tester *in-silico* l'hypothèse d'une activation mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II par les fluctuations actives de forme des apex du mésoderme *snail* dépendantes. L'invagination du mésoderme a été l'objet d'un certain nombre de simulations (Conte et al., 2008; Rauzi et al., 2013). Ici, j'ai introduit le processus de mécanotransduction couplant fluctuation active de la forme des apex et stabilisation apicale de la Myo-II. En parallèle du développement en 1 dimension de la simulation effectuée par Adrien BOUCLET (Ph.D. au laboratoire), j'ai développé la simulation 2D phéno-copiant de façon quantitative la dynamique de constric-

tion apicale dans le cadre d'un patron de différenciation géométrique reflétant les conditions réelles.

Comme nous le verrons, l'accord entre la simulation et l'expérience montre la plausibilité d'un tel processus de mécanotransduction, tout en prédisant certaines quantités en termes de contractibilité des apex et d'amplitude de mouvements *snail* dépendants. Ces prédictions sont actuellement testées expérimentalement par Démosthène MITROSSILIS (Post-doc au laboratoire).

Le second objectif de ma thèse (Partie II) a consisté à tester *in-silico* l'hypothèse développée au laboratoire de l'implication d'un processus de mécanotransduction au cours de l'évolution qui aurait induit la transition blastula-gastrula d'HAECKEL (Arendt, 2004) via l'activation mécanique de l'invagination de l'épithélium en réponse à une sollicitation mécanique de la blastula entrant en contact avec le sol par gravité via l'activation de la voie de transduction du signal étudiée dans la Partie I (Farge, 2003 ; Pouille et al., 2009).

Comme nous le verrons, la simulation indique que la masse d'une blastula de $200\mu\text{m}$ de diamètre, bien qu'en milieu aqueux, est suffisante pour activer le processus, du fait des propriétés extrêmement déformables des capteurs mécaniques cellulaires activant la voie mécanotransductionnelle, qui relèvent de la physique de la matière molle.

Le troisième objectif de ma thèse (Partie III), expérimental, a consisté à montrer l'existence d'un processus d'induction mécanique de l'invagination de l'endoderme postérieur de l'embryon de *Drosophila* par le mouvement d'invagination du mésoderme, selon un processus d'activation mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II conservé et identique au processus à l'œuvre dans le mésoderme, étudié dans la Partie I. Ce travail a notamment été effectué à l'aide d'une expérience permettant de mimer les effets mécaniques de l'invagination du mésoderme sur l'épithélium de l'endoderme postérieur par voie magnétique, après injection de liposomes ultra magnétiques (UML ; Béalle et al., 2012) dans un mutant de *snail* déficient en invagination du mésoderme.

Enfin j'ai participé, dans le cadre de ma thèse, à l'un des travaux du laboratoire, ayant permis de montrer que l'invagination du mésoderme de l'embryon de *Drosophila* active une seconde vague mécanotransductionnelle, qui provoque le maintien d'un fort taux d'expression de Twist en réponse à l'invagination du mésoderme (Partie III).

Ma contribution a été, dans ce cadre, la mise en place d'un protocole de validation automatique et en aveugle de l'existence du processus, proposé par Anne PLESSIS, dans le cadre d'une collaboration entre son laboratoire et le nôtre. Elle a aussi été de participer à la démonstration d'une processus d'activation mécanique de l'inhibition de l'interaction de la β -cat / Armadillo avec la E-

Cadhérine, via la phosphorylation du site Y-667 (Y-654 chez les mammifère) mécaniquement induite, permettant le relargage cytoplasmique et nucléaire de la β -cat en réponse aux sollicitations mécaniques provoquées par l'invagination du mésoderme .

L'ensemble de ces travaux est décrit dans le manuscrit. Les détails techniques des conditions ayant permis la réalisation des simulations et expériences se trouvent dans la plupart des cas dans l'article publié dans *Physical Biology* et l'article en cours de révision dans *Nature Communications* en annexe à la fin du manuscrit.

Première partie

Modèle multi-cellulaire
mécanotransductionnel de la
gastrulation de l'embryon de
Drosophile

Chapitre 1

Principe de la simulation

Les expériences montrant l'activation mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II et de l'invagination du mésoderme par indentation d'un mutant de *snail* déficient en invagination, suggèrent que les fluctuations *snail* dépendantes de taille des apex des cellules du mésoderme induisent, au cours du développement normal, le processus d'invagination par activation mécanique de la voie Fog (**Introduction** ; FIGURE 5).

Les simulations qui vont suivre se proposent d'étudier la plausibilité d'un tel phénomène, et les prédictions qu'elles engendrent en terme de mécanique et de dynamique des processus sous-jacents. Dans le cadre de cette simulation la cellule est modélisée comme un système visco-élastique plongé dans un milieu visqueux. Le modèle à 1 dimension a été développé par Adrien Bouclet. Pour ma part j'ai développé le modèle à 2 dimensions.

1.1 Simulation à une dimension

La cellule est considérée de façon élastique comme deux jonctions n et $n - 1$ plongées dans un milieu visqueux et reliées aux jonctions $n - 1$ et $n + 1$ des deux cellules voisines (FIGURE 1.1).

À une dimension, les contractions actives instables *snail* dépendantes ou les contractions actives stables Fog dépendantes se traduisent par une modulation de la taille de l'apex de la cellule (régie par l'équation 1.2).

L'équation physique utilisée pour modéliser le phénomène est alors celle régissant le mouvement d'un système visco-élastique :

$$\begin{aligned}
m \frac{d^2 L_n}{dt^2} = & -K_{pa} * [(L_n - L_{n-1}) - l_{0,n}] \\
& - K_{pa} * [(L_{n+1} - L_n) - l_{0,n+1}] - F \frac{dL_n}{dt}
\end{aligned} \tag{1.1}$$

avec :

- L_n la position de la jonction n
- m la masse de la jonction
- $l_{0,n}$ le diamètre de l'apex de la cellule n lorsque cette dernière est non contrainte (équation 1.3)
- K_{pa} la constante d'élasticité passive de la cellule
- F le terme de friction visqueuse hydrodynamique du milieu dans lequel sont plongées les jonctions (ce terme associant la viscosité cytoplasmique, la viscosité externe du milieu ambiant et tout autre effet de friction tel que ceux générés par la membrane vitelline)

Le premier terme de l'équation est l'accélération de la jonction de masse m . Le second terme est la force élastique associée à l'interaction mécanique élastique entre les jonctions n et $n-1$ (si $L_n - L_{n-1}$ est plus grand que la taille $l_{0,n}$ de la cellule non contrainte, alors L_n va décroître du fait de la force élastique négative exercée par la jonction $n-1$ sur la jonction n). Le troisième terme est associé à l'interaction élastique entre L_n et L_{n+1} (si $L_{n+1} - L_n$ est plus grand que la taille $l_{0,n+1}$, alors L_{n+1} va croître du fait de la force élastique positive exercée par la jonction $n+1$ sur la jonction n).

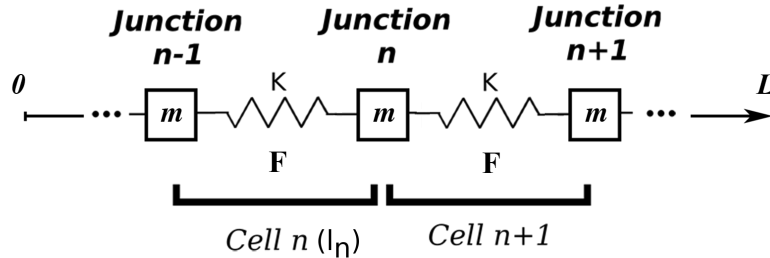


FIGURE 1.1 – Schéma du modèle de tissu cellulaire 1D dans la simulation. Les jonctions $n-1$ et n respectivement de masse m délimitent chacune une extrémité de la cellule n . Ces deux jonctions sont liées par un ressort de raideur K . Enfin l'intégralité du système est plongé dans un milieu visqueux générant une force de frottement F .

Enfin le dernier terme de l'équation est le terme visqueux hydrodynamique classique de Stokes, qui exerce une force de friction sur la jonction n qui s'oppose

au mouvement de cette dernière proportionnellement à sa vitesse $\frac{dL_n}{dt}$ dans le milieu visqueux : $-F\frac{dL_n}{dt}$ avec $F = 4\pi\eta R$ où η est la viscosité du milieu entourant les jonctions/membranes et R est le rayon hydrodynamique de la jonction/membrane (Acheson, 1990).

Nous considérons ici la force visqueuse associée au flux local du cytoplasme cellulaire et de milieu extérieur avoisinant directement la jonction de taille R due à son mouvement.

Les interactions hydrodynamiques entre les jonctions ne sont pas prises en considération dans ce modèle car le temps caractéristique de la relaxation visqueuse au niveau cellulaire est de 1 seconde comparé au temps caractéristique de réponse à l'excitation qui est de l'ordre de 80 secondes. L'excitation est ici le résultat de la pulsation *snail* dépendante dont la valeur caractéristique est de l'ordre de 83 secondes (Martin, Gelbart, Fernandez-Gonzalez, Kaschube, & Wieschaus, 2010).

La dynamique du phénomène se faisant à bas nombre de Reynolds où la viscosité domine, il nous est possible de négliger la dérivée temporelle dans le terme inertiel de l'équation 1.1 ($\frac{d^2L}{dt^2} \sim 0$) (Pouille & Farge, 2008). On trouve alors l'équation régissant les deux jonctions de la cellule :

$$\begin{aligned} \frac{dL_n}{dt} = & -\frac{K_{pa}}{F} * [(L_n - L_{n-1}) - l_{0,n}] \\ & -\frac{K_{pa}}{F} * [(L_{n+1} - L_n) - l_{0,n+1}] \end{aligned} \quad (1.2)$$

L'expérimentation montre une activation mécanique Fog-dépendante de la stabilisation apicale de la Myo-II qui mène à la constriction des apex, puis à l'invagination du mésoderme (Pouille et al., 2009). La tension membranaire induite par des contraintes mécaniques développées sur les cellules du mésoderme en réponse aux oscillations actives instables *snail* dépendantes a été suggérée d'activer la voie de signalisation de Fog (Pouille et al., 2009) et dans l'activation de la constriction stable. Le mécanisme sous-jacent expérimentalement suggéré a été l'activation de la voie Fog par l'inhibition mécanique de son endocytose par tension membranaire.

Nous modélisons ici l'activation mécanique Fog-dépendante de la constriction par une décroissance de la taille au repos $l_{0,n}$ de la cellule n une fois que cette dernière a atteint la taille critique l_{act} qui dilate l'apex au point que l'en-

docytose de Fog est inhibée. Cette transition est modélisée par la décroissance active irréversible de $l_{0,n}$ dans la simulation, une fois que l_n atteint la valeur critique l_{act} comme suit :

$$\begin{aligned} \frac{dl_{0,n}}{dt} = & - \left(\frac{K_{fog}}{F} \right) * \left(\frac{l_n^{\alpha+1}}{l_n^\alpha + l_c^\alpha} \right) * \left[\left(\frac{1}{1 + e^{-(t-\tau_1)}} \right) \right. \\ & * \left(\frac{1}{1 + e^{+(t-(\tau_1-\tau_0))}} \right) + \left(\frac{1}{1 + e^{-(t-\tau_2)}} \right) * \left(\frac{1}{1 + e^{+(t-(\tau_2-\tau_0))}} \right) \\ & \left. + \left(\frac{1}{1 + e^{-(t-\tau_3)}} \right) * \left(\frac{1}{1 + e^{+(t-(\tau_3-\tau_0))}} \right) \right] \end{aligned} \quad (1.3)$$

L'équation de la contractilité 1.3 décrit la décroissance de $l_{0,n}$ avec le temps, avec un effet de seuil abrupte autour de l_c assurée par une grande valeur de α (ici environ 10) qui assure l'existence d'une valeur minimale non négative pour l_n . K_{fog} est le module de contractilité. Il est à noter qu'un modèle d'activation mécanique de la constriction à 1 cellule, basé sur une équation dynamique bistable *had hoc*, a été proposé par le passé (Odell et al., 1981). Nous avons pu tester que le modèle est instable dans la configuration multicellulaire (non montré)

La constriction par paliers (Martin et al., 2008) est mimée par l'introduction des termes exponentiels qui représentent les trois portes temporelles aux temps τ_1 , τ_2 et τ_3 durant τ_0 . La succession des trois portes temporelles génère deux paliers de constriction qui miment le processus de constriction observé *in vivo*, puis l'étape de stabilisation finale (FIGURE 1.2 pages 7-8 ; courbe expérimentale noire).

τ_0 est le temps de résilience durant lequel aucune constriction ne peut se produire après une pulsation de constriction stabilisée, et τ_1 , τ_2 et τ_3 les temps auxquels la pulsation de constriction stabilisée est initiée, qui sont introduits directement par les valeurs mesurées sur la courbe noire (FIGURE 1.2 pages 7-8).

En plus de cette équation de contractilité, un délai T_a entre l'activation de la voie et la constriction des cellules a été introduit dans la simulation pour prendre en compte le temps caractéristique d'activation de la voie d'activation de Fog qui sépare le blocage de l'endocytose de Fog de la stabilisation apicale de la Myo-II. Le délai a été introduit numériquement en activant l'équation 1.3 après un délai T_a après que l_n a atteint la valeur critique l_{act} pour chacune des cellules.

Enfin les fluctuations actives *snail* dépendantes de la taille des apex ont été

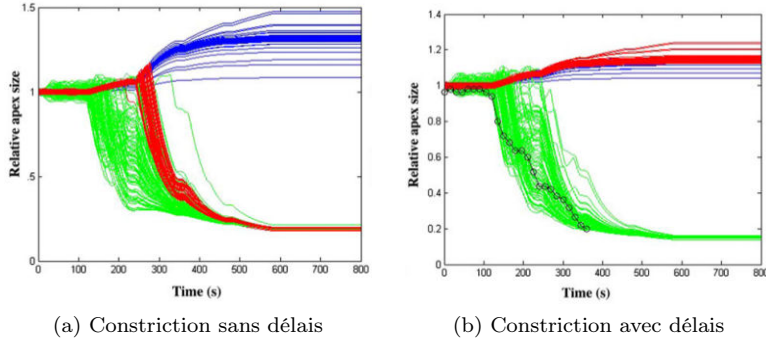
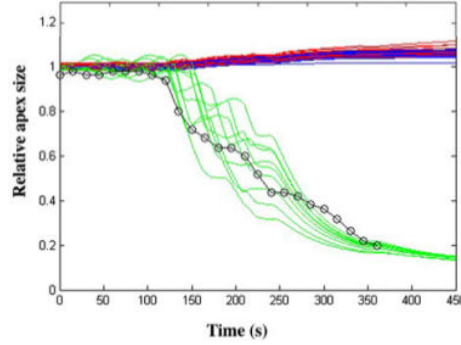


FIGURE 1.2 – 1.2a - Une chaîne à 1D de 300 cellules avec un domaine de 50 cellules au centre du mésoderme exprimant *snail* et Fog (en vert), entouré par deux domaines de 25 cellules ventro-latérale exprimant uniquement Fog (en rouge), à leurs tour entourés par deux domaines de 100 cellules de l'ectoderme n'exprimant ni *snail* ni Fog. L'oscillation *snail*-dépendante d'une cellule représente une amplitude de 0.25% qui mène à un mouvement collectif caractérisé par des pulsation de la taille des apex d'environ 5% qui permet d'activer la constriction collective active Fog-dépendante après deux cycles d'oscillations (120 s), comme observé *in vivo* (Martin et al., 2008). La constriction collective est complète à 400 secondes, comme observé *in vivo* (Kam et al., 1991). Notons qu'en plus de la phase, la taille initiale des cellules est également choisie aléatoirement dans la simulation avec un amplitude de 0.1% qui s'additionne aux fluctuations actives stochastiques.

1.2b - Des résultats similaires sont obtenus en prenant en compte le fait que les cellules ventro-latérales sont retardées dans leur constriction dans 1.2a car elles sont soumises aux contraintes de courbures qui bloquent leur constriction.

La taille expérimentale des apex (ligne noire avec les cercles) a été calculée en prenant $l_{exp} = 2 * \sqrt{\frac{A}{\pi}}$ où A est l'aire de l'apex cellulaire dans les données de référence (Martin et al., 2008), en approximant la cellule à un cylindre avec l'apex comme disque. Les résultats de la simulation sont robustes et représentatifs de toutes les simulations testées avec les mêmes jeux de paramètres (au moins trois fois pour chaque jeux de paramètres). Voir 1.2 page suivante pour la suite des explications.



(c) Nombre réduit de cellules oscillantes

FIGURE 1.2 – 1.2c - Des résultats similaires à 1.2b sont obtenus avec un nombre réduit de cellules le long de l'axe dorso-ventral qui sont susceptibles de contracter.

La taille expérimentale des apex (ligne noire avec les cercles) a été calculée à partir de données de référence (Martin et al., 2008). Les résultats de la simulation sont robustes et représentatifs de toutes les simulations testées avec les mêmes jeux de paramètres (au moins trois fois pour chaque jeu de paramètres).

modulées par une force d'excitation sinusoïdale additionnelle de phase ϕ qui est choisie aléatoirement pour chacune des cellules du tissu en introduisant un terme supplémentaire au mouvement de l'équation :

$$\frac{dl_{exc}}{dt} = A_{exc} \sin(\omega t + \phi) \quad (1.4)$$

La contribution du terme d'excitation de l'équation 1.4 est directement ajoutée au second membre de l'équation 1.1 régissant le comportement des jonctions.

Comme nous le voyons sur la FIGURE 1.2, la simulation à une dimension nous donne déjà une approche quantitative du phénomène en accord avec l'observation expérimentale (courbes vertes et noires, respectivement), à condition que le rapport entre le module de contractibilité et le module d'élasticité passif du tissu soit $K_{Fog} = 4K_{passif}$ (Driquez, Bouclet, & Farge, 2011). Mais pour étudier de manière plus réaliste le phénomène une simulation en deux dimension a été réalisée.

1.2 Simulation en deux dimensions

La généralisation de la simulation en deux dimensions consiste en un pavage hexagonal de cellules. Ces dernières étant reliées entre elles par des jonctions infiniment rigides, toute perte (respectivement gain) de surface de la cellule n se traduit par un gain égal (respectivement perte égale) de surface équitablement réparti entre ses voisines.

Chaque cellule est alors entourée par six voisines (FIGURE 1.3).

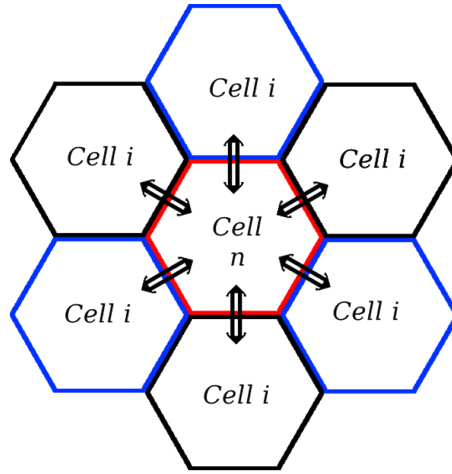


FIGURE 1.3 – Schéma représentatif du pavage hexagonal utilisé dans la modélisation 2D du tissu de l’embryon. La cellule n au centre est entourée par 6 voisines i , et chaque cellule est liée à ses voisines par une paroi infiniment rigide. Tout changement d’aire Δa de la cellule n sera réparti sur chacune des voisines qui subiront donc un changement de surface $-\frac{\Delta a}{6}$

La taille des cellules qui était exprimée par leur longueur dans la simulation à une dimension est ici remplacée par l’aire de l’apex. On a alors l’équation pour la cellule n et ses six voisines i :

$$\begin{aligned} \frac{da_n(t)}{dt} = & -\frac{K_{pa}}{F} * [a_n(t) - a_{0,n}(a_n)] + \frac{1}{6} \frac{K_{pa}}{F} \sum_{\substack{\text{voisines} \\ i=0}}^5 [a_i(t) - a_0(a_i)] \\ & + \frac{1}{N} * \frac{K_{pa}}{F} * \sum_{j=0}^{N-1} [a_j - a_{0,j}(a_j)] \end{aligned} \quad (1.5)$$

Le dernier terme de cette équation est un ajout spécifique de la simulation

2D par rapport à la simulation 1D. L'embryon étant un système clos limité spatialement par la paroi vitelline, les bords de l'embryon ne sont pas libres et toute modification de taille d'une cellule est alors ressentie par toutes les autres cellules de l'embryon. Afin de prendre en compte cela, les contraintes latérales de courbure sont introduites.

Dans la simulation 2D, la contraction active instable résultant de l'expression de *snail* est mimée par un changement de surface au repos de la cellule. La cellule va donc se contracter pendant environ 80 secondes jusqu'à atteindre une surface apicale égale à 90% de la surface initiale de la cellule. Lorsqu'une cellule n voit sa surface changer de Δa_n , chacune de ses six voisines subit ce changement en voyant leurs surfaces respectives changer de $\Delta a_i = -\Delta a_n/6$.

Lorsqu'une cellule est dilatée suite à la constriction de plusieurs de ses voisines et que sa surface atteint 110% de sa surface initiale, alors l'endocytose de Fog devient impossible et la Myo-II est alors stabilisée apicalement (Martin et al., 2008). La cellule va alors se contracter avec un module élastique $K_{Fog} = 5 * K_{pa}$ et sa longueur au repos est alors égale à 25% de la surface initiale de la cellule.

Le patron d'expression de la protéine Fog suit celui d'expression de *twist* (Dawes-Hoang et al., 2005) et forme une ellipse d'environ 85 cellules de long (zone verte Figure 1.4a) avec une largeur maximale de 18 cellules au milieu de l'embryon (Rusch & Levine, 1996).

A contrario, la zone d'expression de la protéine *snail* forme une ellipse partielle tronquée (FIGURE 1.4a; zone rouge) au niveau postérieur ayant environ 15 cellules en longueur avec une largeur maximale au milieu de l'embryon d'environ 9 cellules qui vont initier la gastrulation (Alberga, Boulay, Kempe, Dennefeld, & Haenlin, 1991).

La zone d'expression de *snail* prend enfin place au sein d'un domaine de mésoderme plus large qui est capable de répondre à une excitation grâce à son expression de Fog (FIGURE 1.4). Pour finir, ces zones d'expression génétiques prennent place au sein d'un domaine elliptique encore plus grand de cellules n'exprimant aucun de ces deux gènes d'intérêt (FIGURE 1.4a; zone grise). Cette ellipse de 100 cellules de long et de 70 cellules de large représente la moitié inférieure de l'embryon.

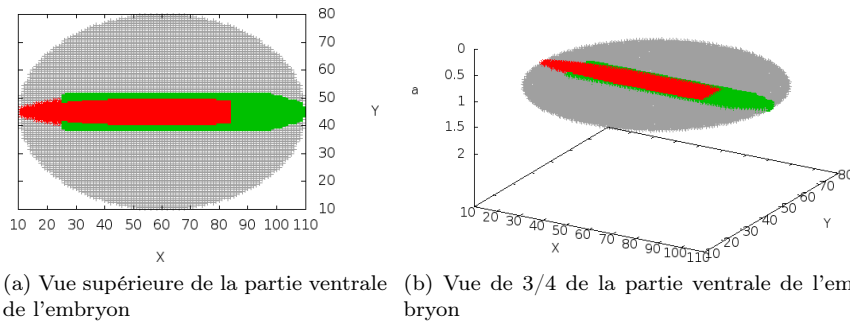


FIGURE 1.4 – Résultat de la simulation du tissu avec le pavage hexagonal 2D. Les cellules exprimant *snail* et *Fog* sont représentées en rouge. En vert les cellule n'exprimant que *twist*, et enfin en gris les cellules n'exprimant aucun de ces deux gènes. Les deux images représentent la partie ventrale de l'embryon à $t = 0$, le pôle antérieur se trouve sur la gauche et le pôle postérieur sur la droite.

Chapitre 2

Résultats de la simulation

La simulation montre un comportement quantitativement intéressant : pendant la phase de constriction instable et aléatoire *snail* dépendante, les cellules exprimant ce même gène *snail* ont le temps d'accomplir deux contractions instables (comme dans la simulation 1D ; FIGURE 1.1) avant que ne soit initiée la constriction stable et coordonnée gouvernée par l'expression du duo *twist*/*Fog* (non montré ici).

Cependant un autre comportement qui n'est pas dicté par le programme est également observable aussi bien dans la simulation numérique que dans l'embryon *in vivo* : le premier domaine de constriction *twist* dépendante se situe aux alentours du milieu du mésoderme (par rapport à l'axe de symétrie droite/gauche) et dans le dernier quart postérieur comme on peut l'observer expérimentalement (Costa et al., 1993 ; Martin et al., 2010 ; FIGURE 2.2b). Ce résultat est robuste et a été observé sur un panel de test de 50 simulations.

Seules les cellules exprimant à la fois *snail* et *Fog* peuvent alors entièrement se contracter et faire nucléer les domaines de constriction (Driquez et al., 2011).

De plus les domaines postérieurs d'expression de *Fog* ne contractent pas non plus. Un tel patron d'invagination est donc à la fois dû aux conditions aux bords de l'invagination et aux conditions limites imposant un volume total constant des cellules et de l'embryon, si bien que les fortes contractions de cellules ventrales doit être compensée par la dilatation des autres cellules du tissu.

De façon intéressante on peut noter que tout ces résultats obtenus par la simulation numérique sont observables *in vivo*. En effet, dans l'embryon, la constriction est amorcée au niveau du milieu du mésoderme. De fortes dilatations des cellules du bord du mésoderme caractérisée par l'expression de *Fog* et la stabilisation apicale de la *Myo-II* à la fin de l'invagination est également visible *in vivo* et enfin l'absence de constriction des cellules du pôle postérieur au stade de l'invagination du mésoderme (Costa et al., 1993).

Ce comportement n'est pas codé dans la simulation et semble directement découler d'une très grande sensibilité de l'invagination au patron d'expression de *snail*, *twist* et *Fog*.

En effet, lorsque l'on change les domaines d'expression de ces deux gènes — en les inversant — l'invagination du mésoderme est perdue (FIGURE 2.1c).

De même si l'étroite bande de cellules exprimant *snail* est réduite, l'invagination du mésoderme est également perdue (FIGURE 2.1a).

A contrario, lorsque la bande de cellules exprimant *snail* est élargie, l'invagination n'est pas perdue mais le premier domaine d'invagination peut se déplacer dans tout le tissu et n'est plus cantonné au quart postérieur de l'embryon contrairement à ce que l'on peut observer *in vivo* (FIGURE 2.1b).

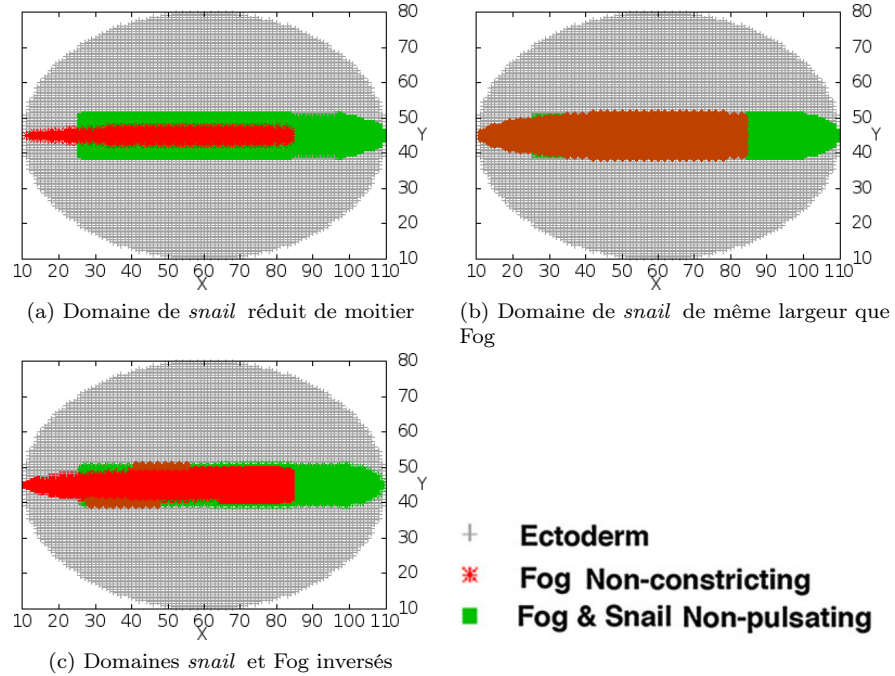


FIGURE 2.1 – 2.1a - la réduction de moitié du domaine d'expression de *snail* empêche l'invagination de se produire.

2.1c - à l'inverse l'augmentation de la taille latérale du domaine d'expression de *snail* n'empêche pas l'invagination de se produire.

2.1c - l'inversion des patrons de *snail* et de *fog* ne bloque pas totalement l'invagination. On remarque cependant que les cellules exprimant uniquement *Fog* ne répondent pas non plus dans cette configuration.

Le résultat de la simulation est donc extrêmement sensible au patron d'expression de *snail* et de *Fog*, et ne reproduit fidèlement le

patron dynamique de constriction des apex que dans le cadre du patron de l'embryon vivant. La simulation montre donc bien la plausibilité d'une activation mécanique de Fog dépendante de la stabilisation apicale de la Myo-II en réponse aux fluctuations actives de forme des apex *snail* dépendantes (FIGURE 2.4).

Il est important cependant de rappeler que dans l'embryon, un deuxième domaine d'invagination apparaît également dans le premier quart de l'embryon. Ce deuxième domaine apparaît près du sillon céphalique et nous supposons que la formation de ce dernier déforme les cellules et provoque un accroissement de leur tension membranaire, leur permettant potentiellement d'activer plus facilement la voie Fog lorsque les constrictions *snail* dépendantes commencent.

Un autre comportement observable *in vivo* et que l'on retrouve dans la simulation est la propagation d'une vague de constriction. *In vivo* cette propagation se fait à partir des deux domaines d'invagination avant de se propager latéralement au reste du tissu. Cependant l'absence du deuxième domaine d'invagination *in silico* modifie la cinétique de propagation de la constriction.

Avec un seul domaine d'invagination, cette dernière se propage de façon radiale à partir du domaine d'invagination jusqu'à ce que l'ensemble des cellules exprimant *snail* et Fog aient invaginé.

Enfin, le résultat le plus important obtenu par cette simulation est une prédiction quant au rapport entre la contractibilité active des cellules qui subissent une constriction Fog dépendante et la rigidité des cellules passives.

En effet, l'invagination requiert des cellules que ces dernières contractent (équation 1.3). C'est exactement ce que l'on a dans l'embryon avec la Myo-II qui est stabilisée apicalement et qui augmente la contractibilité cellulaire en contractant les chaînes d'actines au cours des constrictions de ces dernières (Partie IV). C'est justement sur cette dernière partie que se fait la prédiction de la simulation.

En effet, pour que la cinétique d'invagination soit proche de ce que l'on peut trouver expérimentalement, nous avons non seulement dû introduire une contractibilité K_{actif} plus grande que la rigidité au repos K_{passif} de la cellule mais nous avons de plus trouvé que l'on a un rapport $K_{actif} \simeq 5 * K_{passif}$.

Si ce rapport entre K_{actif} et K_{passif} est trop petit l'invagination ne peut se faire totalement car la vague de constriction ne se propage pas suffisamment vite dans le tissu pendant le temps qui lui est imparti.

On se retrouve alors avec un tissu partiellement invaginé car la dynamique de constriction a été trop lente (FIGURE 2.3). Généralement la partie antérieure est dans ce cas là celle qui n'invagine pas ; la proportion de tissu non invaginé décroît avec la diminution du rapport entre K_{actif} et K_{passif} .

À l’opposé, une valeur élevée du rapport entre K_{actif} et K_{passif} accélère le mouvement de constriction si bien que l’invagination est finie en un temps inférieur à ce que l’on peut observer expérimentalement dans l’embryon. Il est intéressant de noter que l’augmentation du rapport entre les raideurs n’entraîne pas une disparition de l’invagination du mésoderme.

On voit donc que ce rapport doit être correctement ajusté car une valeur trop faible de K_{actif} empêche une invagination complète du mésoderme tandis qu’une valeur trop forte modifie la cinétique de l’invagination. Ce résultat s’explique aisément si l’on prend en compte le fait que le nombre de voisines pour une cellule croît avec le nombre de dimensions. On passe donc de $K_{actif} = 4K_{passif}$ en 1 dimension (quand la cellule a deux voisines) à $K_{actif} = 5K_{passif}$ en 2 dimensions (quand la cellule a six voisines) pour contrebalancer le fait que plus une cellule a de voisines et plus sa constriction est ralentie.

Malheureusement nous n’avons pas à l’heure actuelle de valeur expérimentale de ce rapport entre la rigidité active et la rigidité passive de la cellule. Cette prédiction n’est pour l’instant pas confrontée à l’expérience mais nous mettons au point à l’heure actuelle une méthode nous permettant de mesurer le rapport entre ces deux différentes rigidités.

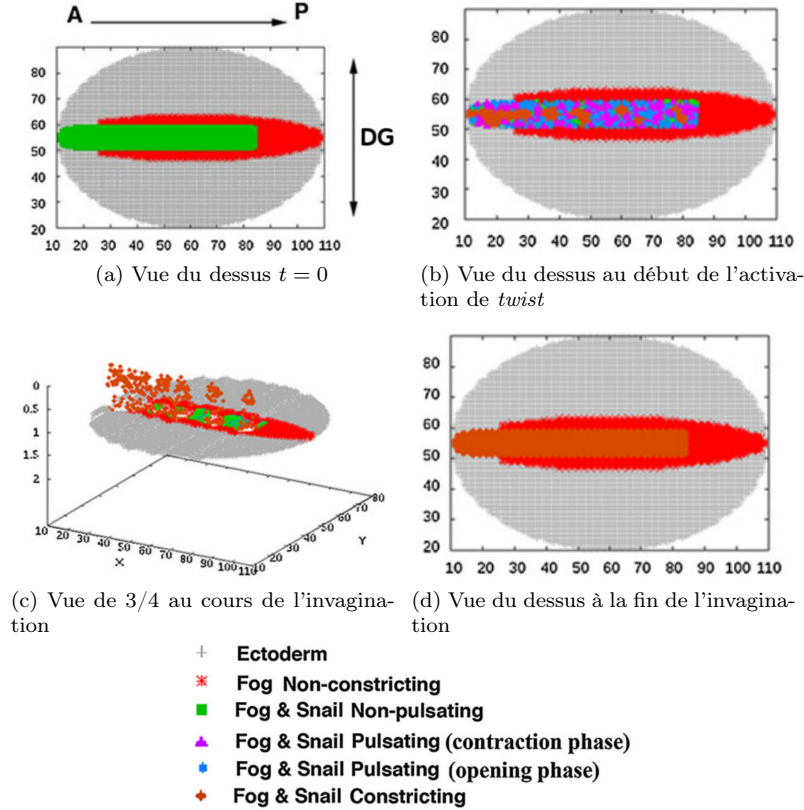


FIGURE 2.2 – Simulation de la taille (axe vertical des images 2.2c, 2.2g et 2.2k) et d'état des apex des cellules du mésoderme en réponse aux fluctuations actives de taille en fonction de leur position dans l'embryon et du patron d'expression génétique. «AP» est l'axe antéro-postérieur et «DG» est l'axe droite-gauche; seules les cellules de l'hémisphère ventrale sont montrées par la simulation. Les nombres sur les axes X et Y correspondent aux rangées de cellules.

2.2a → 2.2d - un domaine central de 9 cellules de large exprimant *snail* entouré par un domaine de 18 cellules de large exprimants Fog.

2.2a - avant que les fluctuations ne commencent. Les cellules exprimant *snail* et Fog sont en vert, les cellules exprimant uniquement Fog sont en rouge.

2.2b - début de la constriction stable — en marron—.

2.2c - nucléation des domaines de constriction.

2.2d - constriction complète.

2.2c est l'état intermédiaire entre 2.2b et 2.2d où l'axe vertical représente la taille des apex. Les résultats de la simulation sont robustes et représentatif de toutes les simulations testées avec le même jeu de paramètres — au moins une dizaine fois avec le même jeu de paramètres —. Suite pages 18 et 19.

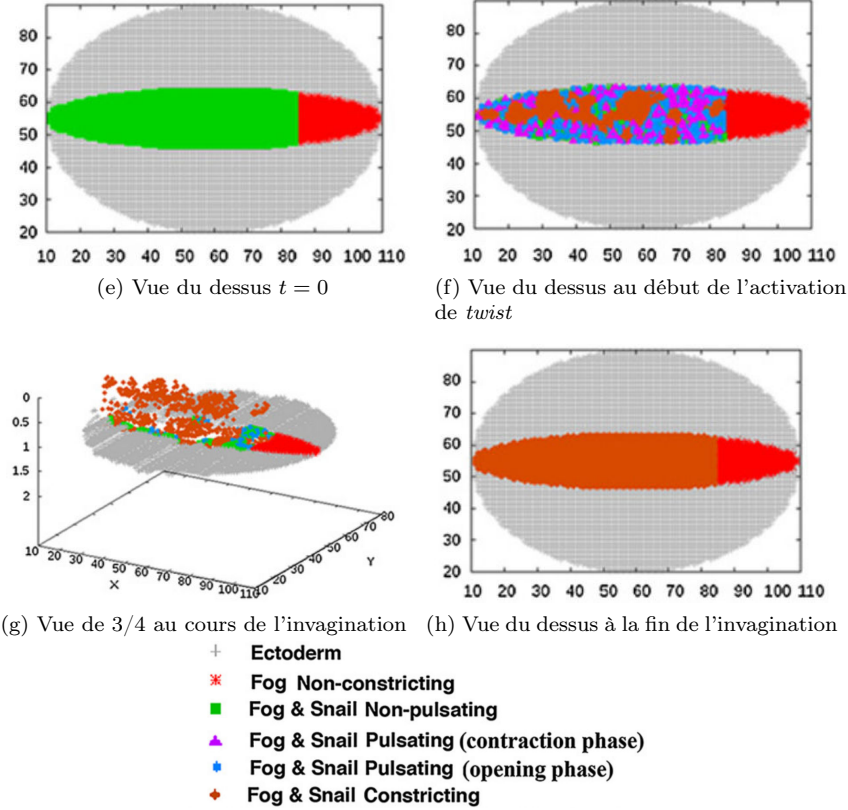


FIGURE 2.2 – 2.2e → 2.2h - domaine de 18 cellules de large exprimant *snail* contenu dans un domaine de 18 cellules de large exprimant *Fog*.

2.2e - avant que les fluctuations ne commencent.

2.2f - début de la constriction stable.

2.2g - nucléation des domaines de constriction.

2.2h - constriction complète.

2.2g est l'état intermédiaire entre 2.2f et 2.2h où l'axe vertical représente la taille des apex. Les résultats de la simulation sont robustes et représentatif de toutes les simulations testées avec le même jeu de paramètres — au moins une dizaine fois avec le même jeu de paramètres —. Suite pages 17 et 19.

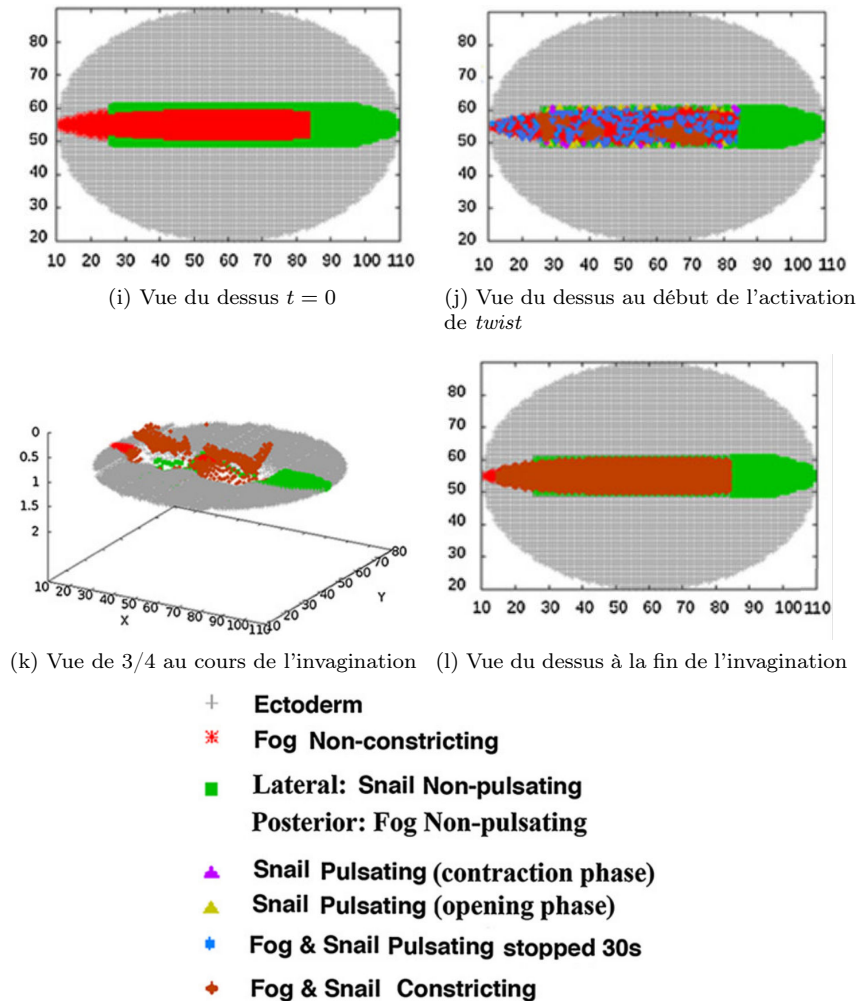


FIGURE 2.2 – 2.2i → 2.2l - domaine de 18 cellules de large exprimant *snail* et de 12 cellules de large exprimant *Fog*.
 2.2i - avant que les fluctuations ne commencent.
 2.2j - début de la constriction stable.
 2.2k - nucléation des domaines de constriction.
 2.2l -constriction complète.
 2.2k est un état intermédiaire entre 2.2j et 2.2l où l'axe vertical représente la taille des apex. Les résultats de la simulation sont robustes et représentatif de toutes les simulations testées avec le même jeu de paramètres — au moins une dizaine fois avec le même jeu de paramètres —. Suite pages 17 et 18.

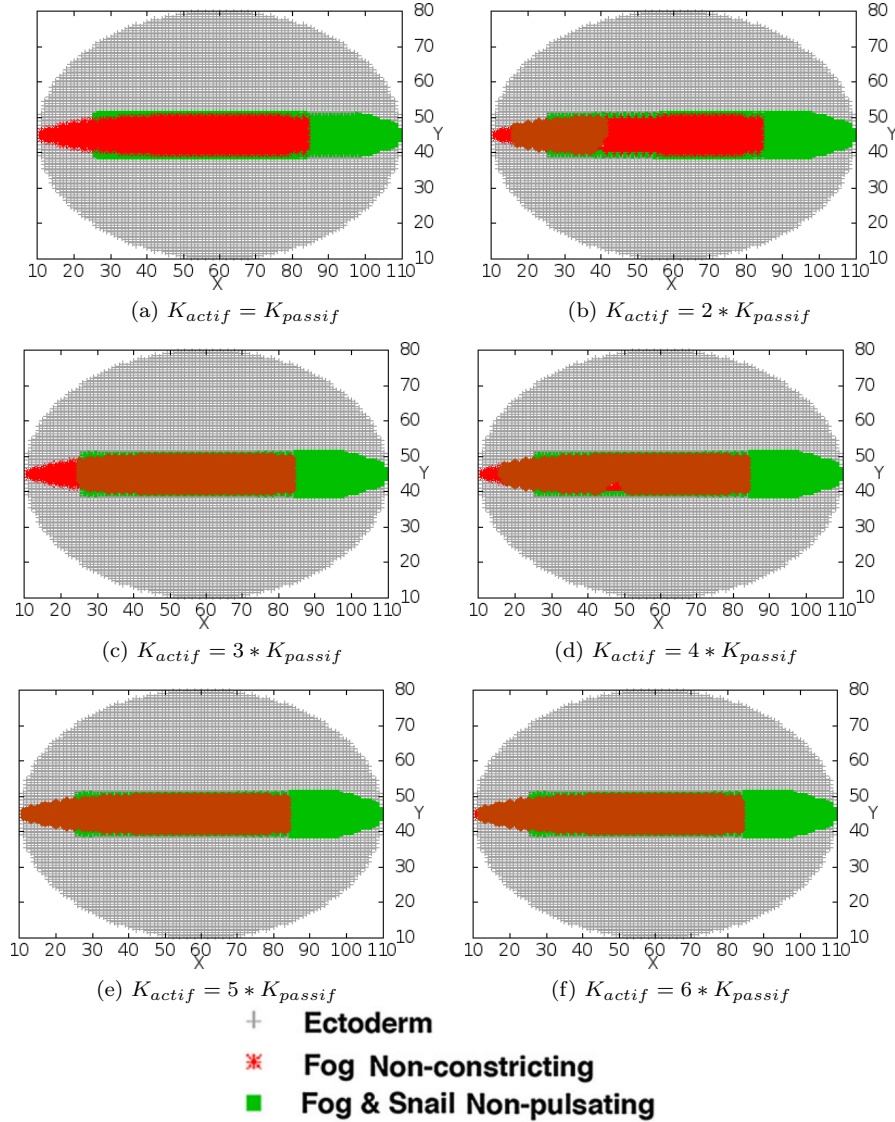


FIGURE 2.3 – Comparaison de l’invagination finale à $t = 1000s$ pour différentes valeurs du rapport K_{actif}/K_{passif} . On voit que l’invagination apparaît si $K_{actif} \geq 2 * K_{passif}$, et que la zone invaginée croît avec la valeur du rapport. Pour un rapport de 1, le mésoderme n’invagine pas. Pour un rapport de 2, $33\% \pm 8\%$ du mésoderme invagine. Pour un rapport de 3, $85\% \pm 12\%$ du mésoderme invagine. Pour un rapport de 4, $88\% \pm 9\%$ du mésoderme invagine. Pour un rapport de 5 ou plus, $100\% \pm 2\%$ du mésoderme invagine. Ces résultats sont robustes et ont été testés une dizaine de fois avec le même jeu de paramètres.

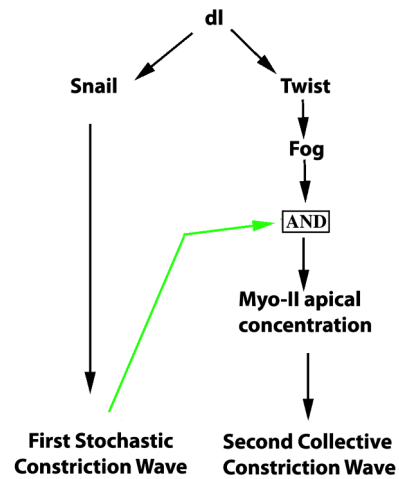


FIGURE 2.4 – Schéma de l’interaction entre *snail*, *twist* et Fog. Nous proposons que c’est la première vague de constriction *snail* dépendante qui, en changeant l’équilibre entre endocytose et exocytose, mène à l’attraction apicale de la Myo-II qui mène à la vague de constriction collective.

Deuxième partie

Induction mécanique de la
transition blastula-gastrae
d'HAECKEL en réponse au
contact mécanique avec le sol
in-silico

LE laboratoire a posé l'hypothèse que l'induction mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II par les fluctuations actives de forme *snail* dépendantes a évolué à partir d'un processus primitif qui aurait provoqué l'invagination de la blastula — donc la formation de la gastrae d'HAECKEL — par activation mécanique d'une voie équivalente à la voie Fog. Cette voie aurait permis la stabilisation apicale de la Myo-II en réponse au contact de la blastula avec le plancher océanique sous l'effet de la gravité (Farge, 2003; Pouille et al., 2009; Farge, 2013).

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'apparition de l'invagination effectuée en réponse à une stimulation mécanique a existé chez l'ancêtre commun : la gastrae d'HAECKEL. Nous avons donc simulé la gastrae d'HAECKEL comme étant le plus primitif possible : une sphère creuse délimitée par un seul feuillet cellulaire. Nous avons également supposé que cet «embryon primitif» évoluait dans un océan et qu'il possédait déjà les gènes qui permettent de provoquer une invagination des cellules en réponse à une stimulation mécanique.

Notre objectif a été de savoir si cet ancêtre commun était capable lorsqu'il rentrait en contact avec le fond océanique de répondre à la stimulation de son propre poids par une invagination. Bien évidemment, l'idée est que cet organisme invagine, condition prérequis à l'acquisition d'une fonction d'ingestion des nutriments favorisant la survie du système multicellulaire.

Chapitre 3

Déformation d'une sphère creuse soumise à une force : le problème de Hertz

Pour étudier cette question théoriquement, nous abordons l'«embryon primitif» comme une sphère creuse élastique soumise à une forme de déformation localisée.

Le problème de la sphère creuse a déjà été étudié par le passé et est connu comme le problème de HERTZ. Nous avons donc appliqué les hypothèses que nous avons fait sur la blastula au problème de la sphère creuse (FIGURE 3.1). Les hypothèses faites ont été inspirées des caractéristiques de l'embryon de *Drosophila* :

- la blastula est un sphère de $200\mu m$ de diamètre
- les cellules sont arrangées de telle façon que chaque cellule est en contact direct avec 6 voisines — nous sommes très proches de la géode qui est la meilleure façon de paver la sphère à l'aide de polygones de tailles comparables —
- les cellules ont un diamètre apical de $6\mu m$
- les cellules ont une hauteur de $15\mu m$
- les autres hypothèses faites sur la simulation 2D de la *Drosophila* restent ici valables — temps d'activation, rigidité des membranes, rapport entre K_{passif} et K_{actif}

Le problème de la sphère creuse est régi par deux types d'équations, en fonction de l'intensité des déformations (Landau & Lifshitz, 1965; Pogorelov, 1988). Nous faisons ici l'hypothèse que les forces appliquées aux cellules sont suffisamment faibles pour que la déformation ϵ de la sphère soit inférieure à son épaisseur h , et optons donc pour l'équation des faibles déformations (Pauchard, Pomeau, & Rica, 1997).

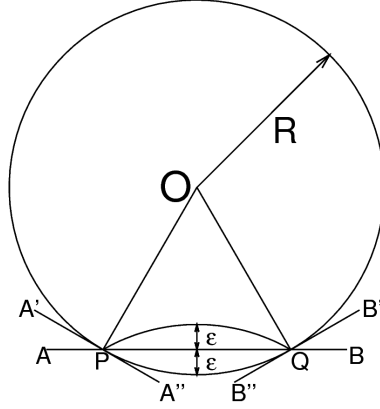


FIGURE 3.1 – Représentation du problème de HERTZ. Une sphère de rayon R subit une force F . Il en résulte une déformation ϵ , et $PQ = L_{contact}$ la longueur de contact entre la sphère et la surface plane sur laquelle elle repose (Pauchard et al., 1997)

L'équation des faibles déformations est :

$$F \sim \frac{Eh^2}{R} \epsilon \quad \text{pour } \epsilon < h \quad (3.1)$$

avec :

- F la force appliquée sur la sphère creuse
- E le module d'Young de la sphère creuse
- h l'épaisseur de la coque
- R le rayon de la sphère
- ϵ la déformation de la sphère creuse.

La solution du problème de HERTZ nous donne également une approximation au premier ordre en ϵ de longueur de contact entre la sphère creuse et la surface rigide sur laquelle elle est appuyée :

$$L_{contact} \sim \sqrt{2R\epsilon} \quad (3.2)$$

En injectant dans l'équation 3.2 l'écriture de ϵ extraite de l'équation 3.1, on obtient alors :

$$L_{contact} \sim \frac{R}{h} \sqrt{\frac{2F}{E}} \quad (3.3)$$

La force F qui s'applique à la sphère creuse est égale à la différence du poids P de cette dernière et de la poussée d'Archimède Π :

$$\begin{aligned}
F &= P - \Pi \\
&= V_S (M_S - M_{eau}) g
\end{aligned} \tag{3.4}$$

Avec :

- V_S le volume de la coquille de la sphère creuse
- M_S la masse volumique de la matière composant la sphère creuse
- M_{eau} la masse volumique de l'eau
- g la constante gravitationnelle terrestre

La sphère de rayon R est creuse et seule une couronne d'épaisseur h existe. Le volume de la matière qui la compose est donc :

$$V_S = \frac{4}{3} \pi [R^3 - (R - h)^3] \tag{3.5}$$

Et étant donné que l'on a $h \ll R$, nous pouvons approximer au développement limité au premier ordre en h :

$$V_S \sim 4 \pi R^2 h \tag{3.6}$$

Enfin, nous pouvons exprimer la masse volumique M_S de la matière qui compose la sphère creuse en fonction de sa densité d_S et de la masse volumique de l'eau M_{eau} :

$$M_S = d_S M_{eau} \tag{3.7}$$

Ce qui nous donne pour l'expression de la force qui s'exerce sur la sphère creuse :

$$F \sim 4 \pi R^2 h (d_S - d_{eau}) M_{eau} g \tag{3.8}$$

Nous pouvons donc injecter tous ces résultats dans l'équation 3.3 page ci-contre, ce qui nous donne :

$$L_{contact} \sim 2 \frac{R^2}{h} \sqrt{\frac{2 \pi h}{E} (d_S - d_{eau}) M_{eau} g} \tag{3.9}$$

- R est le rayon de notre organisme et est fixé à $200 \mu m$
- h est l'épaisseur des cellules soit $15 \mu m$

- E le module d'Young d'un ensemble cellulaire, nous avons pris 100 Pa
— sachant qu'une force de 60 nN est requise pour déformer de 20% une surface de $50 \mu\text{m} * 50 \mu\text{m}$ dans l'embryon de *Drosophile* et que l'épithélium précoce de *Drosophile* est connu pour être mou comparé aux autres tissus biologiques (Desprat et al., 2008) —
- d_S la densité d'un ensemble cellulaire, nous avons pris la valeur mesurée dans le foie qui est d'environ 1060 kg.m^{-3}

À partir de toutes ces valeurs, nous trouvons une longueur de contact :

$$L_{\text{contact}} \sim 5 \mu\text{m} \tag{3.10}$$

soit une longueur de contact du même ordre de grandeur que le rayon apical d'une cellule.

Chapitre 4

Déplieement de vésicules d'endocytose au contact

Une fois au contact avec le plancher océanique, la sphère creuse va alors se déformer sous l'effet de son propre poids. Il faut garder à l'esprit que cette sphère creuse est un organisme pluricellulaire. La déformation globale que subit notre organisme est minime mais sa déformation locale à l'échelle d'une cellule sera importante compte tenu des propriétés de physique de la matière molle de ses constituant, en particulier de sa membrane plasmique apicale. En effet, cette déformation va entraîner un accroissement de la tension membranaire de la cellule au contact avec le plancher océanique.

La pression qui s'applique alors sur la membrane apicale de la cellule en contact avec le plancher océanique est égal au rapport de la force qui s'applique à la sphère sur la surface de contact entre la blastula et le plancher océanique :

$$P = \frac{F}{\pi L_{contact}^2}$$

Or d'après l'équation 3.3 page 28, nous pouvons réécrire :

$$P \sim \frac{Eh^2}{2\pi R^2}$$

Ce résultat nous permet de remarquer que la pression P qui s'exerce sur les parois cellulaires est indépendant de la masse de la blastula.

Nous savons que la tension exercée sur la membrane cellulaire est :

$$PV = \sigma A$$

Du fait de la pression de réaction locale développée par le cytosquelette de la cellule, le volume impliqué dans l'équilibre des forces locales est $\sim L_c^3$ et la surface est $\simeq L_{contact}$, faisant émerger $L_{contact}$ comme longueur caractéristique L_c . Nous pouvons donc réécrire dimensionnellement :

$$\sigma \sim PL_c$$

où L_c est la longueur caractéristique du système qui est ici $L_{contact}$. Or d'après l'équation 3.3, nous pouvons réécrire :

$$\sigma \sim \frac{h\sqrt{EF}}{R} \sim 4.85 * 10^{-9} N.m^{-1} \quad (4.1)$$

L'énergie E mise en jeu dans la déformation de la cellule est :

$$E \sim \sigma L_{contact}^2 \quad (4.2)$$

Avec :

- E l'énergie de la déformation de la membrane cellulaire
- σ la tension de surface de la membrane cellulaire de $50mN.m^{-1}$ d'après l'équation 4
- et $L_{contact}$ la longueur de contact entre la sphère creuse déformée et la surface plane

Cette énergie appliquée à la membrane va accroître la tension membranaire, et induire le dépliement des vésicules d'endocytose.

L'énergie appliquée à la cellule est égale au nombre de vésicules dépliées N_V fois l'énergie nécessaire pour déplier une vésicule E_V :

$$E = N_V * E_V$$

Nous savons que l'énergie nécessaire au dépliement d'une vésicule membranaire est de l'ordre d'une vingtaine de fois l'énergie thermique (Rauch & Farge, 2000) :

$$E = N_V * 20 k_B T$$

où k_B est la constante de Boltzmann ($1.381*10^{-23}J.K^{-1}$) et T la température (aux alentours de $300^\circ K$) :

En utilisant ce résultat dans l'équation 4.2, nous obtenons une relation entre le nombre de vésicules dépliées et la longueur de contact de organisme primitif avec le plancher océanique :

$$N_V \sim \frac{\sigma L_{contact}^2}{20 k_B T} \quad (4.3)$$

La valeur de la longueur de contact est connue (équation 3.10) et nous avons une valeur de σ (équation 4.1). Nous sommes donc en mesure de calculer le nombre de vésicules dépliées, ce qui nous donne :

$$N_V \sim 3000 \text{ vésicules} \quad (4.4)$$

Nous connaissons le rayon d'une vésicule qui est de l'ordre de $35nm$ (Rauch & Farge, 2000) , et d'après le nombre de vésicules dépliées, nous sommes en mesure d'affirmer que cela correspond donc pour la cellule qui subit ce phénomène à un gain de surface apicale de $46.2\mu m^2$ soit environ 40% par rapport à la surface initiale de la cellule qui est de $113,1\mu m^2$.

Dans les cellules en culture et en suspension modèles K562, l'ordre de grandeur de la surface contenue dans les vésicules d'endocytose est en effet de l'ordre de 10% (Rauch & Farge, 2000).

Pour une cellule de *Drosophile*, 10% de la surface apicale représente $a = 10\% * \pi(5\mu m)^2 \simeq 7.5 * 10^{-12} m^2$, alors que la surface que la surface d'une vésicule d'endocytose représente $S = 4\pi(35nm)^2 = 1.5 * 10^{-14} m^2$. Le nombre de vésicules en train d'endocyter à l'instant t sur la surface apicale est de :

$$N = \frac{7.5 * 10^{-12}}{1.5 * 10^{-14}} \simeq 500.$$

Or cette valeur de 10% est la limite supérieur qui permet de déplier toutes les vésicules. La valeur de 40% trouvée précédemment est donc minorée par c'est 10% et c'est donc cette valeur qui doit être prise en compte dans la simulation. Le nombre de vésicules théoriquement dépliées dans la cellule au contact du sol par le poids de l'embryon étant plus grand que dans l'embryon de *Drosophile* et bien supérieur aux 10% bloquant l'endocytose de l'intégralité des vésicules, toutes les vésicules sont dépliées dans la cellule entraînant bien le blocage total de l'endocytose dans la cellule.

Cela signifie donc que sous l'action de son propre poids, la blastula va voir sa tension membranaire croître au niveau de la seule cellule en contact avec le plancher océanique. Le résultat de cette accroissement de la tension membranaire va donc consister en un dépliement d'environ 500 vésicules membranaires, et il va résulter de ce dépliement un gain de la surface apicale d'environ 10%.

De façon intéressante, nous retrouvons donc ici la valeur de 10% de surface gagnée par la cellule, qui est également celle permettant le processus d'activation de la voie Fog dans l'invagination du mésoderme (Martin et al., 2008).

Une invagination est donc susceptible d'être déclenchée par le poids de l'embryon *in silico*.

Bien que ce résultat soit en partie lié aux caractéristiques de l'embryon de

Drosophile— dimensions proches de celle d'un embryon de *Drosophile*— nous pouvons voir que $L_{contact} \propto R^2 h^{-1/2}$ (équation 3.9), et donc par conséquent nous avons $N_V \propto R^4 h^{-1}$. Cela signifie que le nombre de vésicules dépliées par le poids de l'organisme lui-même est inversement proportionnel à son épaisseur h , mais qu'il varie comme R^4 . Donc toute augmentation à épaisseur constante du diamètre de la blastula provoquera une augmentation très importante du nombre de vésicules dépliées. À l'inverse, à rayon constant toute augmentation de l'épaisseur des cellule provoquera une diminution du nombre de vésicules dépliées. La taille des embryons étant généralement supérieure à $200\mu m$, ces résultats tendent donc à nous conforter dans notre démarche et à poursuivre plus en avant l'étude en appliquant ces résultats à la simulation numérique.

Chapitre 5

Résultats de la simulation

5.1 Simulation *in silico* du comportement de la gastrae d’HAECKEL au contact avec le plancher océanique

Suite à ces résultats, j’ai donc retravaillé le programme utilisé pour la simulation numérique dans l’invagination du mésoderme de la drosophile pour l’adapter à la déformation de la blastula sous son propre poids au contact du plancher océanique et étudier la possibilité d’une activation mécanique de l’invagination, non pas en réponse aux fluctuations *snail* dépendantes, mais à ses déformations sous son propre poids.

Les hypothèses faites sur l’activation de la voie Fog m’ont permis de ne pas modifier cette partie du programme. Nous avons donc toujours une activation telle que nous l’avions dans la simulation de l’invagination du mésoderme (Partie I) et telle qu’elle est décrite dans la littérature (Martin et al., 2008).

À la différence de l’embryon de *Drosophile*, nous n’avons plus ici de gène *snail*, et l’activation mécanique vient donc exclusivement de la déformation de l’organisme sous son propre poids. Rappelons également que la longueur de contact trouvée grâce à la résolution du problème de HERTZ nous donne une valeur de $5\mu m$ alors que le diamètre apicale des cellules est ici de $6\mu m$. Nous avons donc dans cette simulation un organisme représenté par une sphère creuse — le gastrae d’HAECKEL — évoluant dans de l’eau salée et dont une cellule subit le poids de ce même organisme (FIGURE 5.1).

Nous pouvons observer dans cette simulation que dans un premier temps, la cellule au contact avec le plancher océanique voit sa surface apicale augmenter jusqu’au seuil critique de 110% de sa surface initiale. À ce moment, la voie Fog est activée dans cette cellule, et après un délais de 80 secondes — dû au temps

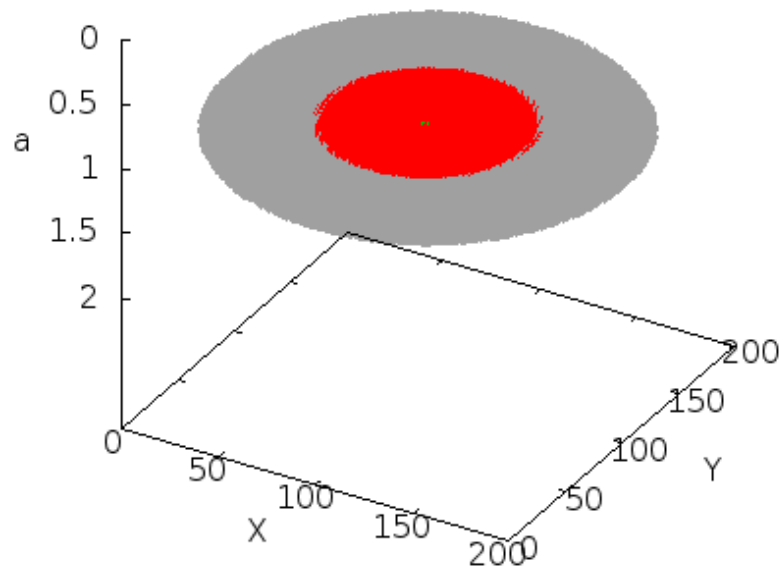


FIGURE 5.1 – Représentation de la blastula d’HAECKEL à $t = 0s$, l’invagination n’a pas encore commencée. Le disque représente la moitié inférieure la plus proche du plancher océanique avec lequel l’organisme rentre en contact. L’axe des ordonnées représente la surface apicale de la cellule. La cellule verte au milieu est en contact direct avec le plancher océanique et subi donc directement les déformations. Les cellules rouge expriment Fog et peuvent répondre à la contrainte par une invagination. Les cellules grises expriment également Fog mais sont trop éloignées pour subir directement la déformation suite au contact avec le plancher océanique.

entre l'activation de la voie et l'attraction apicale de la Myo-II (Martin et al., 2008 ; Fernandez-Gonzalez et al., 2009) — la cellule commence sa constriction active sous l'effet de l'attraction apicale de la Myo-II.

Soumisent à la constriction de leur voisine, les cellules entourant directement la cellule activée vont à leur tour se dilater jusqu'à atteindre également tour la taille critique permettant l'activation de la constriction active.

Elles vont à leur tour commencer à se contracter après le délais d'activation, et ce sont les secondes plus proches voisines de la première cellule activée qui vont alors commencer à être dilatées jusqu'à l'activation de la constricton active Fog dépendante.

Les unes après les autres, les couronnes successives centrées sur la première cellule activée vont se contracter à leur tour (FIGURES 5.2 et 5.5).

Si rien n'était fait, les activations continueraient sans obstacle jusqu'à ce que l'intégralité de l'organisme invagine. Cette possibilité n'est pas réalisable pour des raisons stériques, la surface embryonnaire enfermant un volume interne constant et restant elle aussi constante. Nous avons donc fait l'hypothèse que le rayon R de notre organisme — si l'on omet sa déformation ϵ — reste constant au cours de l'invagination, soit $200\mu m$.

Nous avons donc sur une coupe de l'organisme (FIGURE 5.4a), pour des cellules de diamètre $d_0 = 6\mu m$:

$$N_0 = \frac{P}{d_0} = \frac{2\pi R}{d_0} \simeq 209 \text{cellules}$$

Nous faisons également l'hypothèse que du fait de la cohésion du tissu, lorsqu'une cellule invagine, les autres cellules se dilatent pour compenser le départ de cette cellule du la surface.

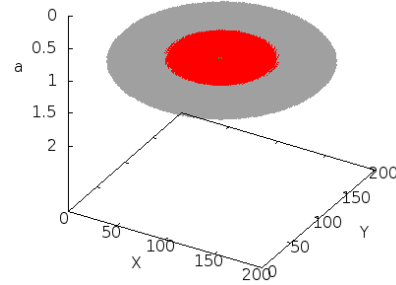
Le périmètre P reste donc constant, et seuls le nombre de cellules en surface et leur diamètre varie au cours du temps :

$$P = N_0 d_0 = n_C(t) d_C(t) \tag{5.1}$$

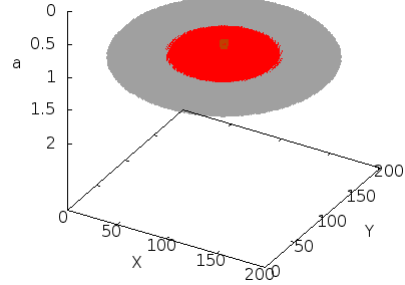
or le nombre de cellules au cours du temps $n_C(t)$ est égal au nombre initial de cellules N_0 moins le nombre de cellules ayant invaginé $n_i(t)$:

$$n_C(t) = N_0 - n_i(t) \tag{5.2}$$

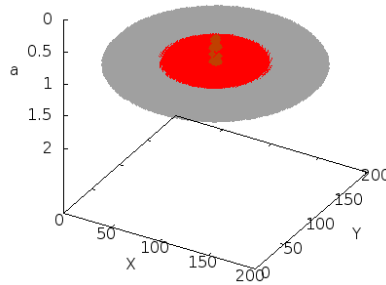
Enfin, nous considérons qu'aucune nouvelle cellule ne peut invaginer lorsque le diamètre de toutes les cellules n'ayant pas activé la voie Fog atteint 110% de leur surface initial. En effet, si toutes les cellules cherchent à se contracter en même temps, aucune n'est capable de se contracter car elles tirent toutes les unes sur les autres de manière synchronisée, et le tissu se bloque en tension.



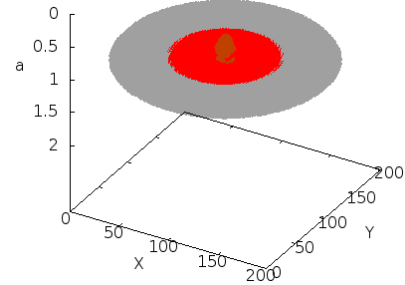
(a) Blastula au contact $t = 0s$
Début du contact



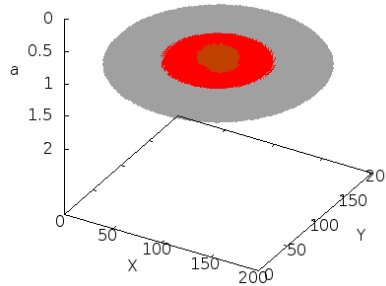
(b) Blastula au contact $t = 101s$
Début de la constriction Fog dépendante



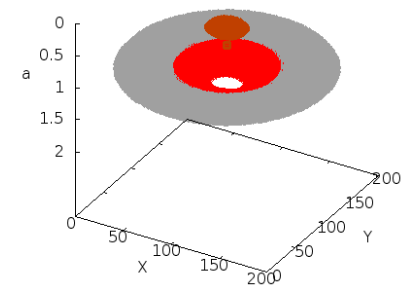
(c) Blastula au contact $t = 289s$
Constriction de la troisième couronne



(d) Blastula au contact $t = 400s$



(e) Blastula au contact $t = 650s$
Blocage de la propagation l'activation de
Fog et début de l'invagination



(f) Blastula au contact $t = 4999s$
Fin de l'invagination

FIGURE 5.2 – Résultat de la simulation numérique de l'invagination dans la blastula mécanosensible au contact du plancher océanique. Toutes les cellules expriment Fog . La cellule centrale subit le poids de l'embryon par son contact avec le plancher océanique. Les cellules en rouge expriment Fog et peuvent répondre à la stimulation mécanique par une constriction active Fog dépendante.

Si cela arrive après que certaines cellules ont commencé à invaginer, le sys-

tème se bloque pour les nouvelles cellules qui cherchent à se contracter mais pas pour celles qui avaient déjà commencé à invaginer et qui peuvent donc finir d'invaginer.

Cependant le système n'est pas réversible : même en activant tardivement la constriction sur toute la surface de l'embryon, l'invagination déjà commencée se poursuit et n'est pas en mesure d'empêcher ou d'inverser l'invagination en cours. On peut l'expliquer par le fait que les contractions provoquées par les cellules hors de la zone de contractions sont tangentes à la surface alors que les forces permettant l'invagination sont radiales. Tout au plus ce blocage peut retarder la fermeture de la structure gastrique primitive et ralentir la finalisation de l'invagination.

D'après les équations 5.1 et 5.2, nous obtenons donc le nombre de cellules invaginées en considérant que le diamètre final des cellules est égal à 110% de leur diamètre initial :

$$n_i(t = \infty) = N_0 \left(1 - \frac{d_0}{d_c(t = \infty)} \right) \simeq 19 \text{ cellules}$$

Nous avons donc 19 cellules autour de la première cellule à invaginer qui peuvent se contracter et participer à l'invagination avant que le système ne se bloque et qu'aucune nouvelle cellule ne puisse invaginer. Avec cette contrainte ajoutée à la simulation, nous pouvons enfin mettre fin à l'invagination (FIGURE 5.2e).

Pour un temps infini, nous formons une invagination ayant un rayon interne de $9.5\mu m$ soit un volume interne d'environ $3650\mu m^3$ (FIGURE 5.4c).

La dynamique de cette invagination constitue un résultat intéressant de cette simulation. En effet, nous pouvons voir que la première cellule est activée environ 100 secondes après le contact avec le plancher océanique. En prenant en compte de délais d'activation de la voie Fog qui est lui d'environ 80 secondes, nous avons testé que nous n'avons besoin que d'un temps de contact de l'ordre de 20 secondes pour pouvoir activer la constriction active de la cellule. Cette valeur est très raisonnable si l'on considère que les courants marins sont irréguliers et peuvent à tout moment remettre notre organisme en suspension dans la colonne d'eau et mettre fin brutalement à sa stimulation.

Nous pouvons ensuite observer que le retard entre l'activation d'une couronne et la couronne suivante tend à se réduire jusqu'à atteindre un retard de moins de 15 secondes sur les dernières couronnes (FIGURE 5.5).

Nous voyons donc que dans un organisme primitif qui ne posséderait que l'ancêtre de la voie de mécanotransduction de Fog, une invagination active est susceptible d'être provoquée en réponse au

contact de la blastula avec le plancher océanique sous son propre poids, c'est à dire de provoquer la transition blastula-gastrula.

5.2 La gastrae d'HAECKEL est-elle toujours en mesure d'invaginer sans la présence de l'ancêtre de la voie mécanotransductionnelle Fog ?

Nous nous sommes aperçus dans les expériences de rétablissement de l'invagination du mésoderme qu'en fait, deux pulses de stabilisation apicale de Myo-II différentes se succèdent. Nous avons la forte attraction de Myo-II corticale submembranaire apicale Fog dépendante qui forme des lignes de stress submembranaire et qui permet une constriction des cellules qui a déjà été largement discutée dans les chapitres précédents (Martin et al., 2008 ; Pouille et al., 2009).

Il existe par ailleurs une stabilisation jonctionnelle de l'ordre d'une minute, indépendante de Fog (Pouille et al., 2009 ; Fernandez-Gonzalez et al., 2009) , peut-être impliquée dans le renforcement de la cohésion des tissus multicellulaires aux sollicitations mécaniques.

Nous nous sommes alors demandé si la blastula primitive pouvait invaginer en réponse à cette stabilisation jonctionnelle de la Myo-II. En effet, cette réponse doit de manière assez logique être aussi ancienne que l'apparition des organismes pluricellulaires elle-même afin de maintenir la cohésion du tissu face à des perturbations mécaniques environnantes.

Si pour la réponse active Fog dépendante des cellules, la Myo-II est localisée sur toute la surface apicales et l'intégralité de cette dernière participe à la constriction de la cellule, il n'en est pas de même pour la réponse jonctionnelle. Cette fois-ci la Myo-II est localisée au niveau des jonctions entre cellules, et ce n'est donc plus la surface apicale de la cellule qui importe ici mais son périmètre. Pour simplifier, nous avons assimilé la surface apicale de la cellule à un cercle — ce qui nous fait une erreur de l'ordre de 4% — .

La force de rappel qui permet la constriction de la cellule n'est donc plus proportionnelle à la différence entre les surfaces apicale et au repos de la cellule mais aux périmètres apical et au repos de la cellule.

$$F \propto \overset{\text{subapical}}{a(t) - a_0(t)} \implies F \propto \overset{\text{jonctionnel}}{\sqrt{a(t)} - \sqrt{a_0(t)}}$$

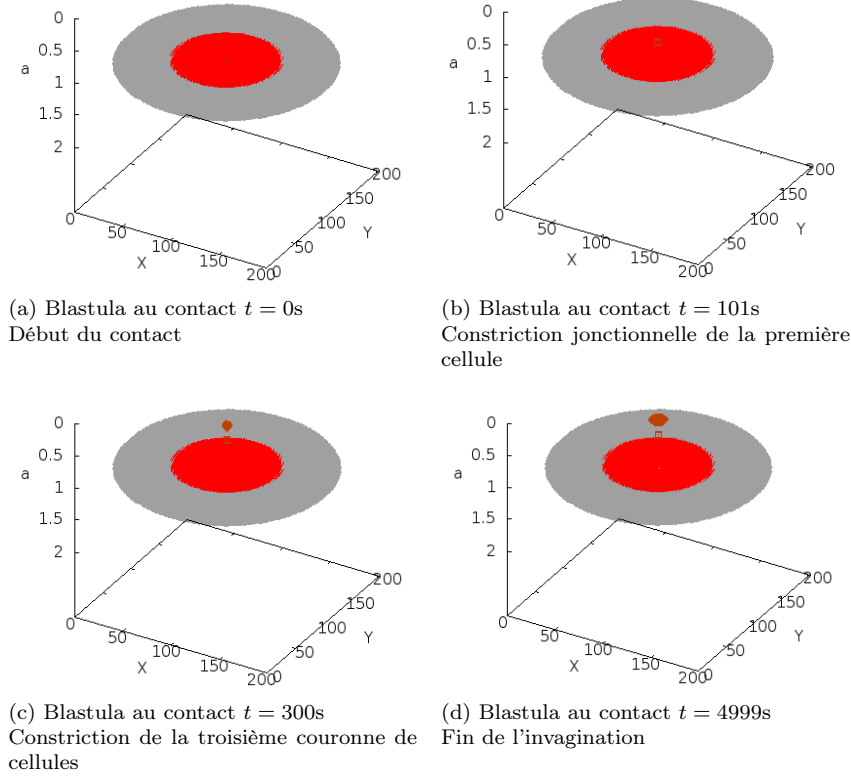


FIGURE 5.3 – Résultat de la simulation numérique de l'invagination dans la blastula non mécanosensible au contact du plancher océanique. À la différence de la FIGURE 5.2, Fog n'est pas exprimé mais la réponse de la Myo-II en termes de stabilisation apicale jonctionnelle de la Myo-II y est. On peut voir que le nombre de cellules constrictées est réduit par rapport au cas où Fog est présent (FIGURE 5.2f page 38). La FIGURE 5.5 permet de comparer les dynamiques en fonction de la présence ou de l'absence de Fog.

Les simulations ont donc été faites avec ces modifications. Étant donné la faiblesse du rappel jonctionnel comparé au rappel subapical Fog dépendant, nous ne pensons pas que la blastula soit en mesure de répondre sans Fog. Nous avons donc été surpris de voir que dans ces conditions nous étions en mesure d'obtenir une constriction de plusieurs couronnes de cellules (FIGURE 5.3).

Cependant la dynamique de la constriction est grandement affectée par ce changement de la force de rappel des cellules. Lorsque nous avons en présence de Fog une force de rappel qui variait comme la différence entre la surface apicale et la surface au repos de la cellule, nous pouvions observer que lors de l'invagination

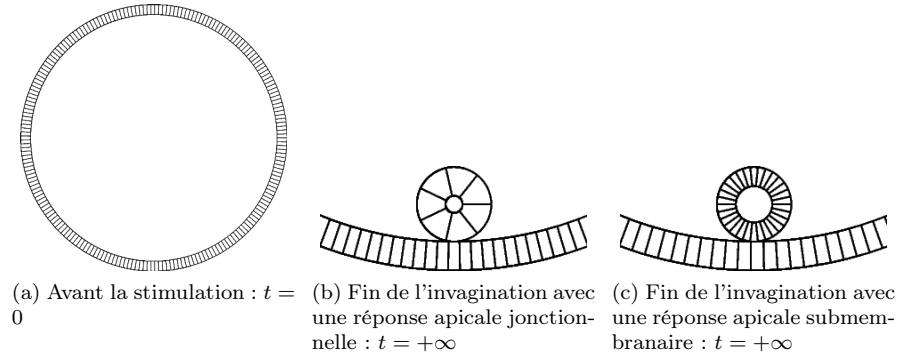


FIGURE 5.4 – Représentation en coupe du gastrae d'HAECKEL .

5.4a - état initial du gastrae d'HAECKEL avant la stimulation provoquée par le contact avec le plancher océanique. Nous pouvons observer la différence de rayon interne de la structure gastrique à la fin de l'invagination entre la réponse jonctionnelle des cellules. 5.4b (7 cellules invaginées) et la réponse apicale 5.4c (20 cellules invaginées). Nous pouvons noter que le rayon externe varie peu du fait de la contrainte d'épaisseur des cellules maintenue constante dans l'embryon

les cellules n'avaient pas le temps de finir leur constriction car elles étaient en permanence dilatées par les nouvelles cellules en cours de constriction.

À l'inverse avec une force de rappel jonctionnelle, la dynamique est plus rapide et les cellules en cours de constriction ont le temps de se stabiliser après le début de constriction d'une couronne. Cette dynamique rapide a donc pour conséquence une faible dilatation des cellules des couronnes suivantes par le disque de cellules en cours de constriction car peu de cellules participent simultanément, ce qui finit par stopper la propagation de la constriction plus vite qu'en présence de Fog.

Par conséquent, le nombre de couronnes qui peuvent se contracter et participer à l'invagination est ici de 6 couronnes seulement. La conséquence de ce nombre réduit de cellules qui peuvent contracter est de rendre la taille de l'invagination très faible — un rayon interne d'environ $4.45\mu m$ soit un volume de $370\mu m^3$ — (FIGURE 5.4). Cette valeur est donc 10 fois plus petite qu'avec la présence de Fog . Le nombre de cellules invaginant en réponse apicale jonctionnelle étant de 7 cellules alors que nous avons 21 cellules qui invaginent en cas de réponse apicale submembranaire.

Nous pouvons donc conclure que si la blastula sans Fog est capable d'amorcer les prémices d'une invagination avec uniquement la

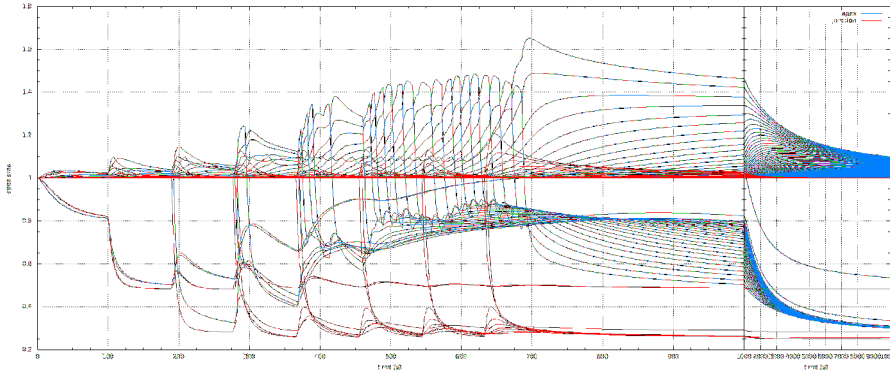


FIGURE 5.5 – Comparaison de la constriction des cellules en présence de Fog — courbe verte — et en l’absence de Fog — courbe rouge —. L’échelle temporelle est différente à gauche et à droite de la FIGURE (l’axe des ordonnées central faisant la séparation) afin de visualiser correctement la phase d’activation de la constriction (entre 0 et 1000 secondes) et toute la phase invagination (au delà de 1000 secondes). Nous pouvons voir qu’en l’absence de Fog (courbes rouges), une nouvelle couronne de cellule se met à constricter toutes les 80 secondes et qu’elles atteignent leur état final avec une surface apicale de 0.25 en 100 secondes environ. À l’inverse en présence de Fog (courbes bleues), on peut noter que la dynamique est très différente : les cellules déjà en cours de constriction sont dilatées continuellement par les nouvelles cellules activées, entraînant une surface apicale moyenne chez les cellules constrictées de 0.85 tant que l’activation de nouvelles cellules est possible. On peut également remarquer que le temps d’activation moyen entre deux couronnes diminue et se stabilise à 15 secondes.

réponse constitutive de Myo-II jonctionnelle des cellules, cette dernière est petite comparée à l’invagination générée en présence de Fog.

De plus sa dynamique jonctionnelle est responsable d’un temps caractéristique pour la constriction des cellules individuelles plus de dix fois plus court que l’invagination Fog dépendante. En effet l’invagination sans la présence de Fog entraîne un faible nombre de cellules à répondre à la stimulation initiale si bien que cette constriction se fini au bout d’environ 800 secondes. À l’inverse la présence de Fog augmente le temps de constriction — les cellules constrictées ont une surface moyenne de 0.3 à 10 000 secondes — mais permet finalement d’englober un volume près de dix fois plus important tout en se propageant sur ce domaine beaucoup plus rapidement.

La blastula n’est donc pas capable de former en l’absence de Fog une invagination satisfaisante pour remplir sa fonction de structure gastrique primitive.

Troisième partie

Mécanotransduction et
expression génétique au cours
de la gastrulation

L'étude des mécanismes sous-jacents au développement de l'embryon est primordiale pour comprendre comment l'organisme agit sur lui-même pour atteindre sa forme définitive.

D'une simple cellule lors de la fécondation à une larve parfaitement autonome, une grande quantité de processus vont s'enchaîner pour réguler les divisions, les migrations et les différenciations cellulaires qui rendent possible le passage d'une cellule-œuf à un organisme complexe.

Longtemps pensés comme des processus purement génétiques, le développement embryonnaire, l'invagination du mésoderme comme nous l'avons vu mais aussi comme nous allons le voir la spécialisation des cellules du mésoderme s'avèrent être des processus mêlant à la fois génétique — via les patrons d'expressions des différents gènes — et mécanotransductionnels — via les actions mécaniques résultants de l'expression génétique ou les activations mécaniques de l'expression de certains gènes —.

Le travail collaboratif effectué ici a consisté à participer à décortiquer aussi finement que possible les mécanismes — mécanotransductionnels — participant au sein de l'embryon à la différenciation des cellules du mésoderme en réponse aux sollicitations mécanique développées par sa propre invagination.

Chapitre 6

Régulation mécanique de l'expression de *twist* dans le mésoderme

Nous savons que la constriction stable et coordonnée des cellules du mésoderme requiert l'expression de *twist*. Comme nous l'avons déjà vu (Partie I), c'est par l'intermédiaire de l'activation mécanique de la voie de signalisation sous contrôle de la protéine Fog — dont l'expression est régulée par *twist* — que la stabilisation apicale de la Myo-II menant à l'invagination du mésoderme est possible.

Nous avons vu que dans un mutant de *snail*, on observe à la fois une disparition des contractions stochastiques contrôlées par *snail* mais également la constriction collective *twist*/Fog dépendante, et donc de l'invagination du mésoderme.

De façon importante, nous savons également que dans les embryons sauvages on observe après l'invagination une forte expression de *twist*, que l'on perd dans un mutant de *snail* qui n'invagine pas (Leptin, 1991).

Parce que nous savons que l'expression de *twist* est induite mécaniquement dans l'endoderme antérieur (Farge, 2003 ; Desprat et al., 2008), nous nous sommes alors demandé si l'expression de *twist* était contrôlée mécaniquement dans le mésoderme par les contraintes développées par son invagination.

Nous avons alors comparé l'expression de *twist* en immuno-fluorescence dans un WT, un mutant *sna*⁻ qui n'invagine pas et dans un mutant *sna*⁻ indenté dont on a rétabli l'invagination (FIGURES 6.1 et 6.2a).

Dans cette expérience (menée par Padra AHMADI), on peut observer qualitativement que l'expression de *twist* est faible dans un mutant de *snail*, quelle

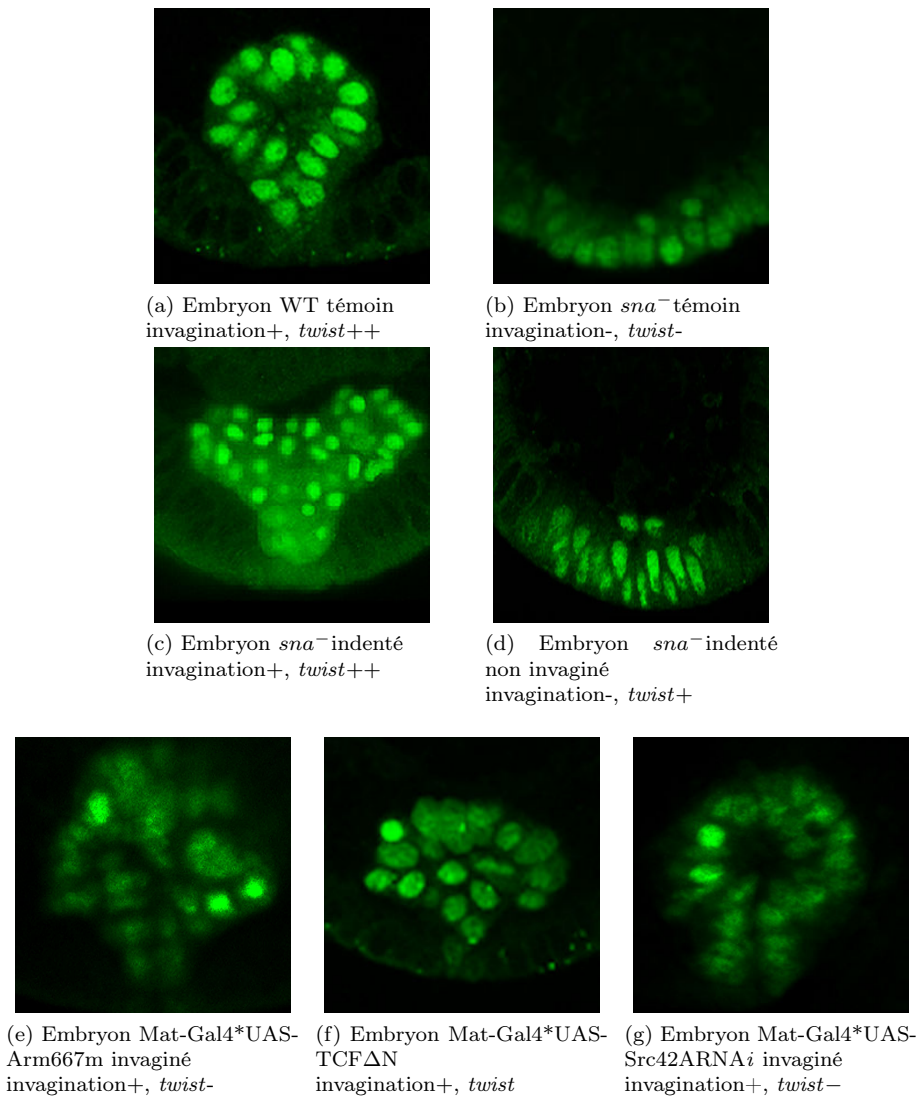


FIGURE 6.1 – L’expression de *twist* dans le mésoderme est mesuré par immunofluorescence (l’échelle est arbitraire, cf. 6.2 page 52).

6.1a, 6.1b, 6.1c et 6.1d - en comparant le niveau d’expression entre le sauvage et les différents cas de *sna*⁻, on remarque que le niveau d’expression de *twist* est corrélé à l’état du mésoderme (invaginé ou non).

6.1e - sur l’embryon Mat-Gal4*UAS-Arm667m, le site muté Y-667 empêche sa phosphorylation et sa transformation en p-β-cat.

6.1f - sur l’embryon Mat-Gal4*UASΔN, TCF est muté et ne peut pas se lier à la β-cat pour transcrire *twist*.

est faiblement augmentée dans un mutant indenté dont l'invagination n'est pas rétablie (30% des cas) et presque aussi importante dans le mutant dont l'invagination est rétablie par l'indentation que dans le sauvage (70% des cas) (FIGURES 6.1 et 6.2).

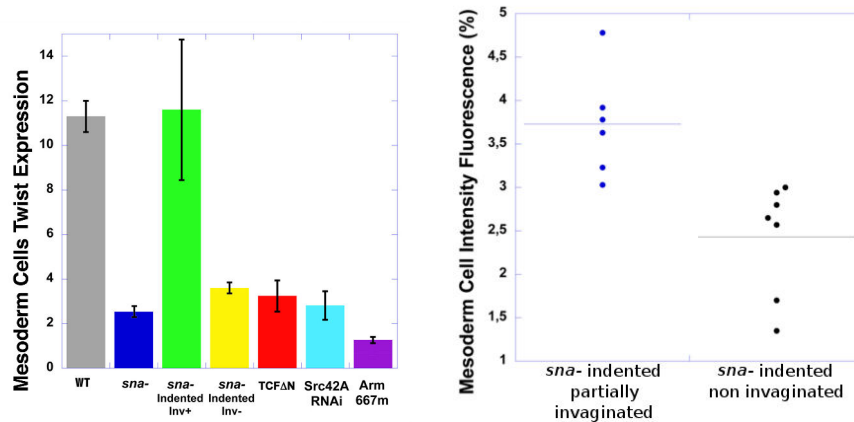
Afin de tester la robustesse de ces observations par des analyses quantitatives systématiques, des analyses en double aveugle ont été effectuées en collaboration avec Anne PLESSIS. Les expérimentations sur les embryons ont été faites dans notre laboratoire par PADRA, puis les embryons ont été marqués et imagés par Anne dans son laboratoire en aveugle. Pour finir, les images des embryons m'ont été transmises sans que je ne sois informé sur le pool d'origine des embryons.

L'analyse a été faite grâce au logiciel **IMARIS** de façon automatique, suivant la suggestion d'Anne PLESSIS pour maintenir la procédure en aveugle. Après une reconstruction en 3 dimensions des embryons, la luminosité a été mesurée dans 20 noyaux au niveau du mésoderme et dans 20 noyaux au niveau du dos afin de soustraire le bruit des noyaux au véritable signal de *twist*. Ce n'est qu'une fois les résultats établis que l'origine des échantillons et les résultats des mesures ont été comparés, les résultats des différents pools ayant été transmis par e-mail en aveugle, avant comparaison aux conditions expérimentales.

Nous obtenons les résultats présentés dans la FIGURE 6.2a. Nous pouvons observer que l'expression de *twist* dans le WT et dans le mutant de *snail* indenté et totalement invaginé est au même niveau, et qu'elle est près de 5 fois plus faible dans le mutant de *snail* non indenté. De plus, dans le mutant de *snail* indenté non invaginé, le niveau d'expression de *twist* est entre 30% et 40% supérieure à ce que l'on observe dans le mutant de *snail* non indenté mais toujours entre 4 et 5 fois plus faible que dans le WT ou le mutant de *snail* indenté et invaginé. Cela confirme l'implication de l'activation de l'expression de *twist* par l'indentation et sa surexpression engendrée par l'invagination du mésoderme aussi bien dans le WT que dans le mutant de *snail*. Pour finir, un test de Student à été réalisé sur l'ensemble des échantillons avec pour résultat une valeur de $p < 0.001$.

Il est intéressant de noter également que sur les embryons mutants de *snail* indentés mais non invaginés, on observe une certaine augmentation de l'expression de *twist* due à l'indentation, mais plus faible que dans l'embryon indenté invaginé (FIGURE 6.2a). Cela montre que *twist* est bien mécanosensible dans le mésoderme et que l'invagination du mésoderme est bien requise pour le maintien de la forte expression de *twist*.

On peut donc en déduire que l'invagination du mésoderme entraîne le maintien de l'expression de *twist* au cours de la gastrulation



(a) Expression de *twist* dans les cellules du mésoderme (b) Comparaison des deux sous-populations d'embryons *sna*⁻ indentés et non invaginés

FIGURE 6.2 – 6.2a - mesure de l'expression de *twist* par immuno-fluorescence (échelle arbitraire). Cette échelle fait référence aux images 6.1 page 50. On remarque clairement que les embryon *sna*⁻ dans lesquels l'invagination a été rétablie par l'indentation présente une expression de *twist* similaire aux embryon WT, soit environ 4 fois l'expression de *twist* dans un *sna*⁻ non indenté. À l'inverse, les embryons *sna*⁻ indentés mais non invaginés présente une expression de *twist* supérieure de 50% aux mutants non indentés. On voit donc que si l'indentation permet d'accroître l'expression de *twist*, c'est l'invagination du mésoderme qui permet ici de surexprimer au niveau de son expression normale dans le WT *twist*. On voit également que si l'on perturbe la phosphorylation de la β -cat (Arm667m et Src42ARN*i*) ou que l'on perturbe la transcription β -cat dépendante (TCFΔN), l'expression de *twist* est du même ordre de grandeur que dans les mutants *sna*⁻ non indentés, démontrant l'importance de la phosphorylation de la β -cat dans la transcription de *twist* suite à l'invagination (voir section suivante).

6.2b - comparaison de la luminosité des cellules du mésoderme d'embryons mutants de *snail* indentés mais n'invaginant pas et marqués en *twist*. L'échelle utilisée est la même que pour la FIGURE 6.2a. Nous pouvons observer le rétablissement partiel de l'expression de *twist* dans les embryons indentés ($p < 0.01$).

à l'échelle d'une heure.

Ces résultats indiquent que *twist* se trouve au cœur d'une boucle de rétroaction. Son activation permet l'expression de *Fog* nécessaire à l'invagination du mésoderme laquelle permet le maintien de l'expression de *twist* jusqu'au stade 8. Nous savons que *Fog* est au cœur de la première vague de mécanotransduction nécessaire à l'invagination du mésoderme. Mais il reste à caractériser le processus mécanosensible responsable de la seconde vague : la mécanotransduction menant au maintien de l'expression de *twist*.

Chapitre 7

Implication de la phosphorylation du site Y-667 de la β -caténine dans le processus de mécano-transduction initiant l'induction mécanique de l'expression de *twist*

Nous savons que la β -cat est la protéine clef du processus de mécanotransduction menant à l'indentation mécanique de l'expression de *twist* dans l'embryon de *Drosophile* (Farge, 2003; Desprat et al., 2008). L'implication de la mécanosensibilité de la voie β -cat a été depuis trouvée dans d'autres processus développementaux (Kahn et al., 2009) comme en culture cellulaire (Rubin et al., 2004; Robinson et al., 2006; Sen et al., 2008).

Nous savons que la β -cat transloque des jonctions dans le noyau de façon Src42A dépendante en réponse aux sollicitations mécaniques dans l'endoderme antérieur et que l'activité transcriptionnelle de la β -cat y est responsable de l'induction mécanique de l'expression de *twist* dans l'endoderme (Farge, 2003; Desprat et al., 2008).

Nous savons aussi que Src42A est impliqué dans le processus de phosphorylation de la β -cat dans l'embryon de *Drosophile* (M. Takahashi et al., 2005). Nous savons également que le site Y-667 (Y-654 chez les mammifères) de la β -cat est

un site impliqué dans l'interaction entre cette dernière et les E-Cadhérines. Ce site a la particularité de pouvoir se décrocher de manière réversible des E-Cadhérines s'il est phosphorylé chez les mammifères (Van Veelen et al., 2011).

De façon intéressante, nous voyons que les dominants négatifs de Y-667 et de Src42A montrent un défaut d'expression de *twist* après l'invagination du mésoderme (FIGURES 6.1 et 6.2). Cette observation pourrait s'expliquer par un processus d'induction mécanique Src42A dépendant de la phosphorylation de Y-667 β -cat menant à son relargage submembranaire, et permettant sa translocation nucléaire, et l'expression de *twist*. Pour tester l'implication de la phosphorylation Src42A dépendante de la Y-667 β -cat, de la translocation dans le noyau de la β -cat et son implication dans la transduction de l'expression de *twist*, le laboratoire a procédé à plusieurs expériences.

En premier lieu, ces expérimentations ont consisté à comparer la localisation de β -cat dans des embryons WT avant et après l'invagination (FIGURES 7.1a et 7.1b) à l'aide d'un anticorps spécifique de Armadillo — la β -cat chez la drosophile —. Puis nous avons procédé de même avec des embryons *sna*⁻ non indentés et indentés (FIGURES 7.1c et 7.1d).

Nous avons observé un relargage de la β -cat des jonctions dans le cytoplasme (FIGURES 7.1a et 7.1b dans les conditions de fixation 2%FA qui ne permettent pas de détection nucléaire de β -cat) et dans le noyau (FIGURES 7.2f, 7.4) dans les conditions de fixation 1%FA qui permettent la détection nucléaire de β -cat lié à l'invagination du mésoderme dans le WT.

Nous avons observé le même comportement dans l'embryon mutant de *snail* invaginé après l'indentation (FIGURES 7.1d, 7.2j → 7.2l, 7.4), alors que l'embryon *sna*⁻ qui n'invagine pas reste caractérisé par une localisation membranaire de la β -cat (FIGURE 7.1c, 7.2g → 7.2i et 7.4)

Nous avons donc pu déduire de ces résultats que le signal de β -cat nucléaire est lié à l'invagination du mésoderme. Nous avons donc un lien directe entre l'invagination du mésoderme et le relargage de la β -cat des jonctions vers le noyau dans le mésoderme.

Afin de tester l'hypothèse de l'apparition de β -cat cytoplasmique et nucléaire suite à la phosphorylation de la Y-667 β -cat nous avons commencé par étudier le dominant négatif Mat-Gal4*UAS-Arm667m. En mutant ce site Y-667 de la β -cat, nous obtenons une β -cat qui ne peut pas se phosphoryler. Nous observons dans ces conditions que la β -cat reste jonctionnelle, même après l'invagination (FIGURES 7.1e, 7.2m → 7.2o et 7.4). Le même résultat est obtenu dans le dominant négatif de Src42A (FIGURE 7.1f).

Nous voyons que sur ces mutants, le signal de β -cat est environ 25% supérieur

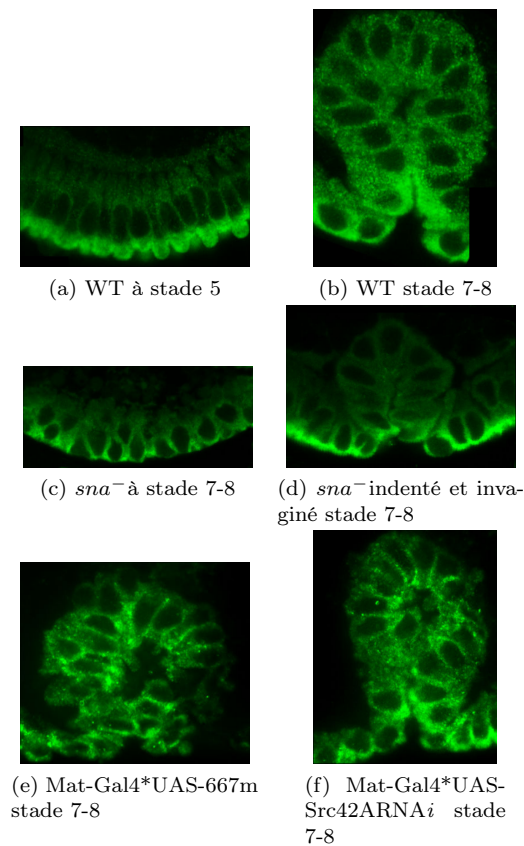


FIGURE 7.1 – Armadillo jonctionnel et cytoplasmique fixation à 2%FA.

7.1a - Arm est principalement localisé au niveau des complexes jonctionnels apicaux dans le futur mésoderme à stade 5 dans un embryon WT (n = 9).

7.1b - le relargage des jonctions vers le cytoplasme d'Arm est observé dans le mésoderme après l'invagination à la fin du stade 7-8 (n = 12).

7.1c - dans le *sna*⁻, Arm reste localisé apicalement dans le mésoderme non invaginé (n = 8).

7.1d - l'invagination rétablie suite à une indentation dans un mutant de *snail* rétabli le relargage apical d'Arm (n = 5).

7.1e et 7.1f - Arm reste localisé au niveau des jonctions apicales dans les dominants Mat-Gal4*UAS-*Src42ARNi* (n = 8) et Mat-Gal4*UAS-667m (n = 9) à stade 7-8. À noter qu'une fixation à 1%FA est requise pour pouvoir détecter Arm dans le noyau, ce qui n'est pas le cas ici.

Voir FIGURE 7.4. Les données sont caractérisées par un test de MANN-WHITNEY donnant $p < 0.001$ pour toutes les comparaisons pertinentes.

à l'embryon WT au stade 5 — mais bien inférieur au WT stade 6 qui a un signal 250% plus important —. Bien que ce mutant puisse invaginer, nous voyons que l'invagination seule ne suffit pas à maintenir un signal nucléaire de β -cat.

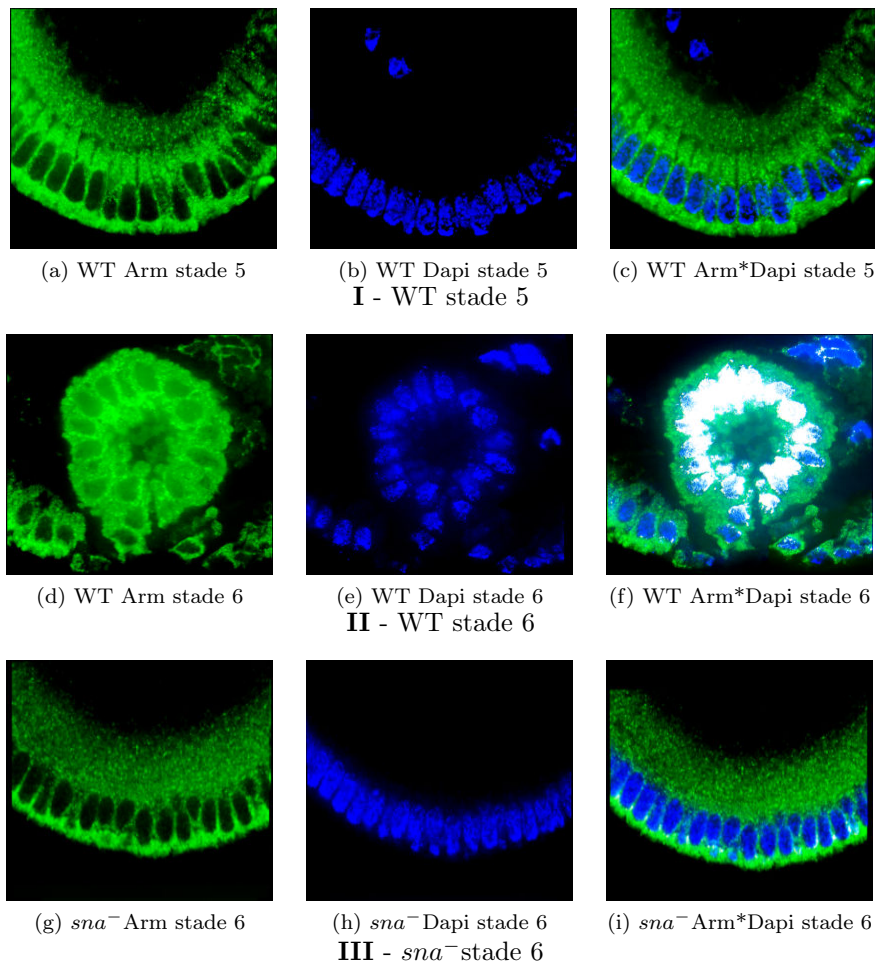


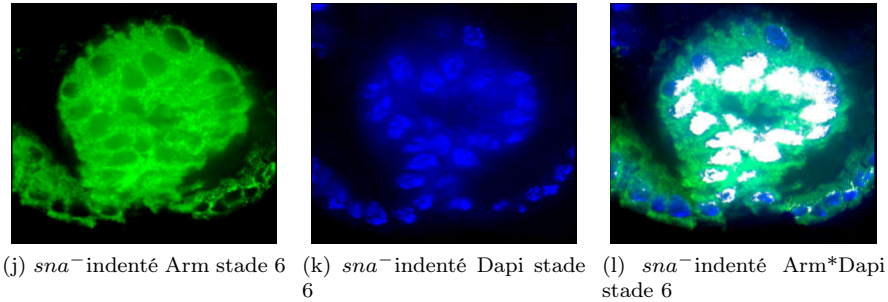
FIGURE 7.2 – Détection des Armadillos nucléaires à fixation à 1%FA. **I**, **II** - augmentation du signal nucléaire de Arm au cours de l'invagination du mésoderme à stade 6 (n =7) comparé au stade 5 (n=8).

III - l'augmentation du signal nucléaire de Arm est perdue dans le mutant de *sna* non invaginé à stade 6.

On peut noter la texture diffuse des image qui résulte de la fixation à 1%FA pour laquelle la détection du signal Arm est possible mais la résolution jonctionnelle est perdue.

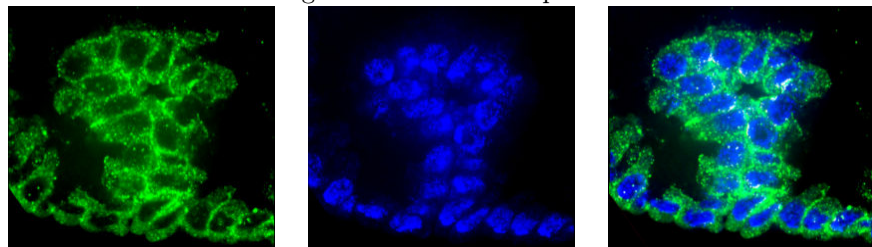
Voir 7.1 pour une meilleure résolution jonctionnelle avec une procédure de fixation à 2%FA permettant de caractériser seulement les membranes et le cytoplasme.

Voir page 58 et page 7.3 pour la suite des images et les explications détaillées



(j) *snail*⁻ indenté Arm stade 6 (k) *snail*⁻ indenté Dapi stade 6 (l) *snail*⁻ indenté Arm*Dapi stade 6

IV - *snail*⁻ dont l'invagination est rétablie par l'indentation stade 6



(m) Mat-Gal4*UAS-Arm667m Arm stade 6 (n) Mat-Gal4*UAS-Arm667m Dapi stade 6 (o) Mat-Gal4*UAS-Arm667m Arm*Dapi stade 6

V - Mat-Gal4*UAS-Arm667m stade 6

FIGURE 7.2 – **IV** - le signal nucléaire de Arm est rétabli après indentation dans le mésoderme invaginé de mutant de *snail* à un niveau équivalent au WT à stade 6 (**II**).

V - en dépit de l'invagination du mésoderme le signal nucléaire de Arm est absent dans le mutant Mat-Gal4*UAS-Arm667m possédant Y-667 non phosphorylable.

Voir 7.1 pour une meilleure résolution jonctionnelle avec une procédure de fixation à 2%FA permettant de caractériser seulement les membranes et le cytoplasme. À noter que le dominant négatif de Src42A n'a pas supporté la fixation à 1%FA et n'a pu être de ce fait testé.

Voir page 7.3 pour la suite des images et les explications détaillées

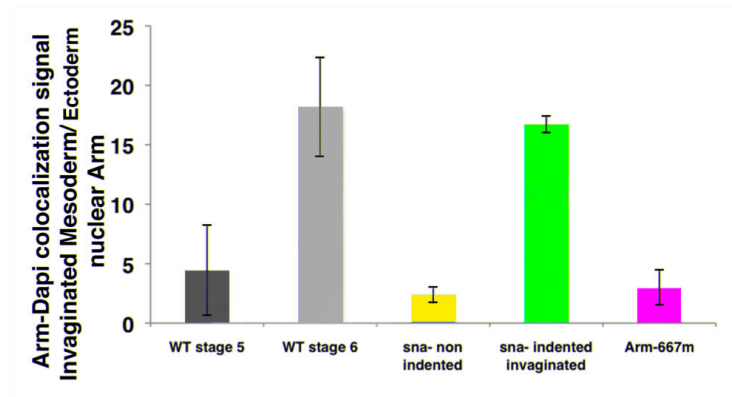


FIGURE 7.3 – Quantification de la translocation nucléaire de Arm — rapport du signal moyen de la colocalisation de Arm avec DAPI mésodermale (densité de pixels blancs) sur le signal de colocalisation ectodermale — dans les différentes conditions étudiés. Échelle arbitraire. Les données sont caractérisées par un test de MANN-WHITNEY donnant $p < 0.01$ pour toutes les comparaisons pertinentes. Les mutant sna^- ont été sélectionnés *a priori* — pas de constriction du mésoderme ni d’invagination avant l’amorce de l’extension de la bande germinale et un retard de l’invagination du sillon antérieur de 10 minutes (Pouille et al., 2009) — et *a posteriori* — plis latéral dorsal caractéristique du mutant de *snail* comme décrit dans (Leptin & Grunewald, 1990) et par le marquage de *snail*

Les expériences du laboratoire ont donc démontré que la mutation de Y-667 comme le RNAi de Src42A donnent tous les deux le même phénotype : la β -cat reste bloquée au niveau des jonctions (FIGURES 7.1 et 7.2) et l'expression de *twist* chute au niveau des contraintes du mésoderme (FIGURE 6.2a).

J'ai donc étudié l'état de phosphorylation du site Y-667 de la β -cat en fonction de l'état d'invagination du mésoderme à l'aide d'un anticorps spécifique de l'état phosphorylé de Y-667.

J'ai trouvé que Y-667- β -cat est phosphorylé durant l'invagination du mésoderme, mais pas avant (FIGURE 7.4). De plus, les mutants de *snail* ne montrent pas de phosphorylation de Y-667, mais les mêmes mutants invaginés après indentation montrent la phosphorylation du Y-667- β -cat .

J'ai donc montré l'induction mécanique de la phosphorylation de Y-667- β -cat en réponse aux sollicitation mécaniques de l'invagination du mésoderme.

L'interprétation que nous pouvons faire de ces expériences est la suivante. Nous savons que la β -cat est localisée au niveau des jonctions membranaires avant que les contraintes n'aient lieu. Elles sont à ce moment là liées aux cadhérines.

Les tensions jonctionnelles résultants de l'invagination du mésoderme vont entraîner une forte tension sur le site principal d'interaction entre β -cat et E-cadherine : Y-667.

Nous proposons qu'à une certaine valeur critique de la tension, la probabilité de trouver le site Y-667 ouvert va accroître suffisamment pour que Src42A — dont nous avons vérifié qu'il est déjà activé/phosphorilé avant les mouvements (Article 2 en annexe) — phosphoryle Y-667, inhibant ainsi l'interaction entre β -cat et E-Cadhérine rendant ainsi l'ouverture mécaniquement irréversible.

Cette inhibition du lien entre les deux molécules rendrait possible la séparation entre la β -cat et la cadhérine à laquelle elle est liée.

La β -cat transloque dans le cytoplasme, puis dans le noyau (FIGURES 7.1 et 7.2). Les conditions permettant la translocation nucléaire de la β -cat ne sont pas connues. Pour autant, il est connu que Y-667 par des voies purement biochimique est suffisant pour induire la translocation cytoplasmique et nucléaire de la β -cat (Van Veelen et al., 2011). Une fois dans le noyau, β -cat active **TCF** qui déclenche l'expression de *twist*.

Nous avons ainsi maintenant deux processus de mécanotransduction impliquant *twist* dans le mésoderme de l'embryon drosophile. Nous avons vu dans

la Partie I que nous avons dans un premier temps l'expression de *snail* qui entraîne des constrictions instables et stochastiques des cellules du mésoderme.

Ces mêmes constrictions contribuent à augmenter la tension membranaire au niveau des apex cellulaires. La tension membranaire accrue change l'équilibre entre endocytose et exocytose en minimisant l'endocytose — dynamique du fait de la difficulté accrue pour former des vésicules due à la traction que génèrent les cellules voisines en cours de constriction *snail* dépendante — tandis que la capacité d'exocytose de la cellule n'est pas modifiée.

La protéine Fog — qui est un signal excrété dont l'expression est sous le contrôle de *twist* — voit alors sa concentration extra-cellulaire augmenter à cause de la modification de l'équilibre endo/exocytose. Elle se lie alors à son récepteur spécifique mais du fait des tensions membranaires élevées les cellules ne sont plus en mesure d'endocyter le récepteur activé afin de dégrader son interaction avec la protéine Fog.

De ce fait, la voie Rho sous contrôle de Fog est suractivée, et mène à la stabilisation apicale de la Myo-II puis à l'invagination du mésoderme. C'est la première vague de mécanotransduction.

Nous venons de voir dans cette partie que ces contraintes associées à l'invagination du mésoderme induisent la phosphorylation Src42A dépendante du site Y-667 de la β -cat inhibant son interaction avec la E-Cadhérine, condition nécessaire à son relargage cytoplasmique et à sa translocation nucléaire. C'est la seconde vague de mécanotransduction.

Ce mécanisme suggère un lien étroit entre l'invagination du mésoderme d'une part et la différenciation du mésoderme d'autre part. En effet, l'expression de Fog dans le mésoderme se fait sous le contrôle de *twist*. Or l'invagination du mésoderme est possible grâce au processus de mécanotransduction dont Fog est la clef. Enfin l'activité de *twist* est maintenue par l'invagination.

Nous avons donc une boucle de rétroaction positive où *twist* active Fog, qui permet l'invagination du mésoderme, qui maintient l'activité de *twist*. Or le parcours de la totalité des étapes de cette boucle de rétroaction est de l'ordre de 20 minutes, ce qui est supérieur au 15 minutes nécessaires à l'invagination du mésoderme.

Nous pensons donc que cette boucle de rétroaction ne joue pas de rôle dans la régulation de l'invagination en elle-même, mais que sa fonction est de créer une coordination robuste entre la morphogénèse du tissu — l'invagination — et la différenciation du mésoderme. En effet, seules les cellules ayant invaginé peuvent maintenir une surexpression de *twist* pendant 1 heure, et seules les cellules maintenant *twist* activé vont alors se différencier pour former le mésoderme.

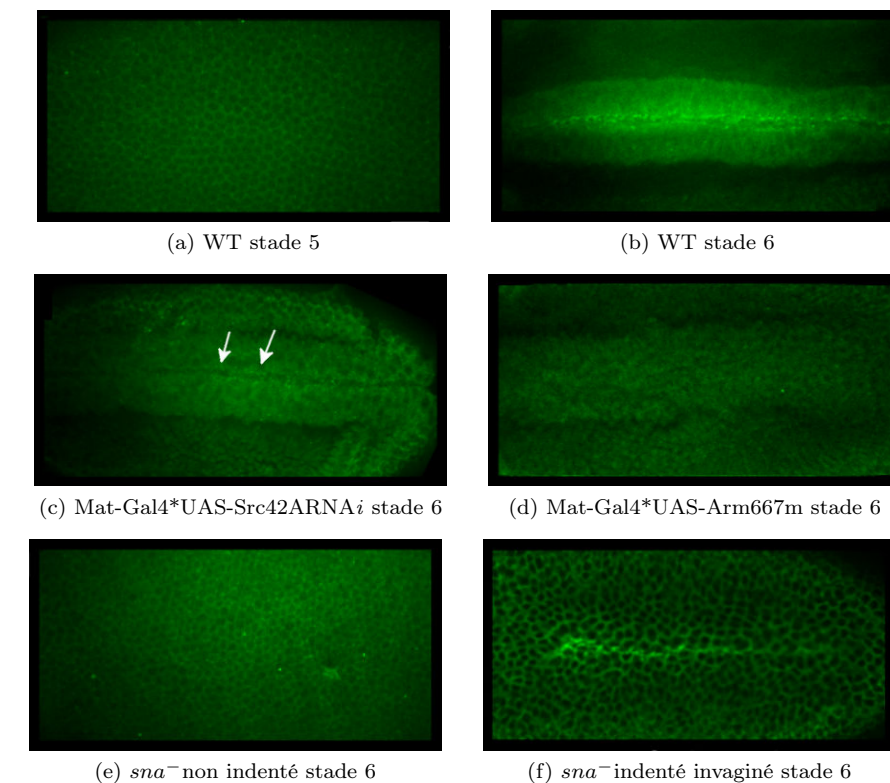


FIGURE 7.4 – Marquage de Y-667 β -cat. Le pôle antérieur se situe vers la gauche et le pôle postérieur vers la droite.

7.4a - phosphorylation à son niveau de référence dans l'embryon WT à stade 5 avant le début de la gastrulation.

7.4b - l'invagination du mésoderme dans le WT à stade 6 provoque une phosphorylation de la β -cat.

7.4c - dans le mutant Mat-Gal4*UAS-Src42ARNAi à stade 6, bien que l'invagination se produise on peut constater que la β -cat est comparable au WT à stade 5. Cependant on peut remarquer quelques spots légèrement plus brillants que la moyenne au niveau de l'invagination.

7.4d - dans le mutant Mat-Gal4*UAS-Arm667m à stade 6, l'invagination se produit mais nous observons un niveau de fluorescence du même ordre de grandeur que dans le WT stade 5. À la différence de 7.4c, la mutation Y-667 bloque la phosphorylation si bien qu'aucun spot n'est visible.

7.4e - l'invagination du mésoderme ne s'est pas produite dans l'embryon sna^- non indenté à stade 6, et le niveau de phosphorylation est au même niveau que le WT stade 5

7.4f - le niveau de phosphorylation est accru à stade 6 dans l'embryon sna^- indenté où l'invagination rétablie.

Voir FIGURE 7.1 pour la quantification et les statistiques des phénotypes. Ces données sont caractérisées par un test de MANN-WHITNEY donnant $p \leq 0.001$. L'échelle est donnée par la barre noire de $10\mu m$.

Quatrième partie

Induction mécanique de la
stabilisation apicale de la
Myo-II et de l'invagination de
l'endoderme postérieur par
l'invagination du mésoderme

Chapitre 8

L'invagination du pôle postérieur provoquée par la stabilisation apicale de la Myo-II est localement Fog dépendante mais *snail* indépendante

Comme nous l'avons montré précédemment, l'invagination du mésoderme nécessite à la fois l'expression du gène *snail* — qui induit les oscillations actives stochastiques de cellules et permet d'augmenter la tension moyenne apicale des cellules du mésoderme — et du gène *twist* — qui permet l'induction mécanique Fog dépendante de la constriction coordonnée des cellules en stabilisant apicalement la myosine nécessaire à l'obtention de l'invagination (Partie I et Partie III).

Nous avons en effet montré que si Fog est effectivement nécessaire à l'invagination du mésoderme, l'activation de la voie Rho en aval de Fog est la conséquence mécanotransductionnelle de l'augmentation de la tension cellulaire produites par les contractions *snail* dépendantes (Partie I et Partie III Chapitre 6).

En effet, les mouvements de constriction stochastiques résultants de l'expression du gène *snail* entraînent une augmentation globale de la tension membranaire au niveau du mésoderme. Cette augmentation de tension membranaire entraîne un déplacement de l'équilibre dynamique entre endocytose et exocytose en in-

hibant l'endocytose — les vésicules cellulaires peuvent toujours fusionner avec la paroi ce qui permet de relâcher en partie les tensions, mais la création de ces mêmes vésicules par endocytose ayant pour fonction de "dégrader" l'interaction de Fog avec son récepteur est inhibée par l'augmentation de tension de la membrane.

Il s'ensuit donc de ce changement d'équilibre entre endocytose et exocytose que la quantité de protéines extra-cellulaires — et notamment celle de la protéine Fog — augmente au cours du temps. Le modèle est qu'à partir d'une certaine concentration critique $C_{Critique}$, Fog active un nombre suffisant de récepteurs spécifiques, ce qui permet l'activation de la voie Rho en aval qui permet alors une stabilisation apicale de la Myo-II, et donc l'invagination du mésoderme.

De façon intéressante, lors de l'extension de la bande germinale, on peut observer sur l'embryon qu'une invagination se fait également au niveau du pôle postérieur de l'embryon (FIGURE 8.2). Il est connu que cette invagination de l'endoderme postérieur est, comme pour l'invagination du mésoderme, dépendante de la stabilisation apicale de la Myo-II (Young et al., 1991). Cependant, si nous avons bien à cet endroit l'expression de *twist* et de Fog (Costa et al., 1993 ; Morize et al., 1998) nous n'avons pas d'expression de *snail* contrairement au mésoderme (Costa et al., 1993). Au premier abord cela peu sembler être en contradiction avec les données connues sur la régulation de l'attraction apicale de la Myo-II dans le mésoderme (FIGURE 8.1).

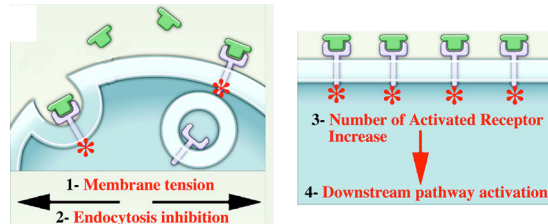


FIGURE 8.1 – Schéma du blocage de la formation et du dépliement des vésicules d'endocytose. Ce blocage empêche la dégradation de Fog.

D'un côté, nous savons que pour l'invagination du mésoderme nous avons besoin de *snail* — pour «amorcer» le système en augmentant la tension membranaire via les contractions stochastiques et instables des cellules — et de *twist*/Fog — pour engendrer une constriction stable et coordonnée des cellules qui entraîne l'invagination du tissu — et que la mutation d'un seul de ces deux gènes entraîne une perte de l'invagination du mésoderme.

De l'autre côté nous avons au niveau du pôle postérieur de l'embryon une zone qui invagine également mais où seul *twist*/Fog sont exprimés. Comment alors, sans *snail*, est-il possible de provoquer une stabilisation apicale de la Myo-

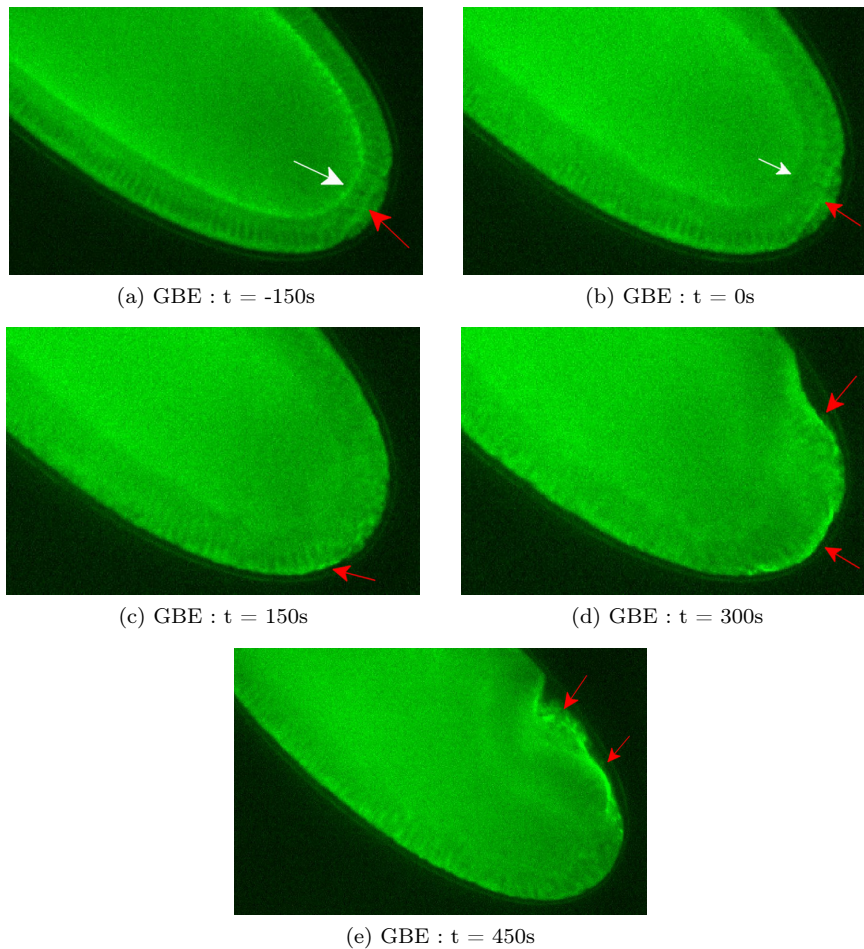


FIGURE 8.2 – Pôle postérieur d'un embryon Zipper-GFP (Myo-GFP) durant la gastrulation. Comme nous pouvons le voir sur l'image 8.2a, la cellularisation n'est pas encore finie et on remarque distinctement la localisation basale de la Myo-II au niveau du front de cellularisation (flèche blanche) et son absence au niveau apical (flèche rouge). Sur l'image 8.2b, la Myo-II disparaît du domaine basal (flèche blanche) et mais n'est pas encore présente apicalement (flèche rouge).

Enfin, sur les images 8.2c, 8.2d, et 8.2e, on voit clairement l'invagination du pôle postérieur qui entraîne les cellules polaires dans l'embryon et une stabilisation accrue de la Myo-II apicale (flèches rouges) (N = 5) .

II dans le pôle postérieur, alors que *snail* est requis pour la stabilisation apicale de la Myo-II dans le mésoderme ?

D'après ce que nous savons de l'invagination de mésoderme, une telle configuration génétique (*sna*⁻/*twi*⁺) ne doit en effet pas permettre au tissu d'invaginer si la régulation génétique est autonome cellulaire et de nature purement biochimique.

Il semble *a priori* improbable que les conditions nécessaires à un tissu pour invaginer au même stade changent en fonction de l'endroit où se situe la cellule dans l'embryon. Cela signifie donc que ce n'est pas réellement le duo *snail/twist* qui est nécessaire et suffisant pour obtenir une invagination mais un processus non purement biochimique qui ne dépendent pas de l'expression du gène *snail* en soi.

Une solution à cette contradiction apparente peut-être trouvée sachant que dans le mésoderme, ce n'est pas *snail* en lui-même qui est nécessaire à l'obtention de l'invagination mais les contraintes mécaniques développées par les fluctuations actives de la forme des apex par l'expression de *snail*. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'il existe de même au pôle postérieur une contrainte mécanique qui permet à ses cellules de stabiliser apicalement la Myo-II par l'activation mécanique de la voie Fog, et d'invaginer.

Les mouvements morpho-génétiques candidats à cette activation sont :

1. la dilatation des cellules de l'endoderme postérieur résultant de l'invagination du mésoderme
2. la compression des cellules de l'endoderme postérieur par l'extension de la bande germinale, cependant cette dernière se produit 10 minutes après le début de l'invagination du mésoderme

Si cette hypothèse est correcte, nous devrions être capable d'inhiber cette invagination en ablatant les tissus responsables de ces mouvements morpho-génétiques ou par l'étude de mutants appropriés inhibant spécifiquement les mouvements morphogénétiques. Puis nous devrions être capable de rétablir la stabilisation apicale de la Myo-II et l'invagination en rétablissant les contraintes manquantes (FIGURE 8.3) .

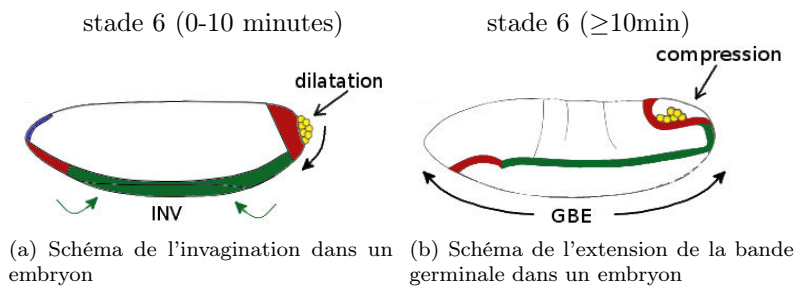


FIGURE 8.3 – Schéma des mouvements lors de la gastrulation.

8.3a - au début du stade 6, l'invagination du mésoderme entraîne une dilatation des cellules de l'endoderme postérieur.

8.3b - à partir de la moitié du stade 6, l'extension de la bande germinale génère une compression des cellules de l'endoderme postérieur.

Chapitre 9

Première approche : La photoablation des tissus moteurs de l'invagination du mésoderme et de l'extension de la bande germinale

9.1 L'hypothèse d'une induction mécanique par l'extension de la bande germinale

Si les contraintes mécaniques inhérentes à la morphogenèse de la gastrulation sont responsables de l'activation de la stabilisation apicale de la Myo-II des cellules de l'endoderme postérieur et de son invagination, nous devons être capables en supprimant ces contraintes par une photoablation des tissus moteurs de ces mouvements de les inhiber. Bien sûr l'inhibition de tissus entiers de l'embryon est un processus lourd. Mais il permettra dans le cadre d'une première approche, de savoir quel mouvement est potentiellement à l'origine du processus de mécanotransduction.

Mais avant d'essayer de supprimer ces contraintes il convient avant tout de les identifier afin de pouvoir mieux les inhiber.

L'invagination de l'endoderme postérieur a lieu pendant la deuxième partie de la gastrulation. Cette gastrulation se décompose en deux étapes différentes :

- l'invagination du mésoderme dans un premier temps qui dure 20 minutes
- l'extension de la bande germinale dans un deuxième temps (qui résulte d'un processus d'intercalation de cellules dorsales vers le ventre, FIGURES

3B gauche et 3C gauche dans l'**Introduction**) et qui survient 10 minutes après le début de l'invagination du mésoderme.

C'est lors de l'extension de la bande germinale que les cellules de l'endoderme postérieur vont migrer vers le dos de l'embryon en même temps que leur invagination se produit — ce qui a pour résultat de faire rentrer vers l'intérieur de l'embryon les cellules de l'endoderme postérieur —.

L'hypothèse qui pourrait paraître *a priori* la plus probable, compte tenu de l'ampleur du mouvement incriminé, serait que l'extension de la bande germinales soit responsable de l'activation de la stabilisation apicale de la Myo-II en comprimant les cellules du pôle postérieur et en inhibant l'endocytose de Fog comme dans l'invagination du mésoderme (Chapitre 6).

Pour tester cette hypothèse, nous avons procédé à la photo-ablation du tissu dorsal dont nous avons déjà montré qu'elle retarde l'extension de la bande germinale (Farge, 2003). En ablatant par irradiation à 2 photons à forte puissance (Supatto et al., 2005) un domaine dorsal de $50 \mu m$ de long et de $5 \mu m$ de large nous avons pu bloquer l'extension de la bande germinale.

Les résultat de cette expérience est que nous observons toujours une certaine stabilisation apicale de la Myo-II, bien que moins importante que dans le WT, et une invagination du pôle postérieur retardée d'environ 10 minutes (FIGURE 10.1e). Donc l'extension de la bande germinale n'est pas seule responsable du processus d'induction mécanique de la stabilisation de la Myo-II et de l'invagination de l'endoderme postérieur.

Nous pouvons cependant noter l'existence d'un mouvement d'attraction ventral des cellules de l'endoderme postérieur dû à l'invagination du mésoderme susceptible de provoquer sur ces cellules un processus de dilatation mécanique (FIGURE 10.3).

Après ce mouvement, les cellules de l'endoderme postérieur reprennent leur mouvement normal de migration vers le dos de l'embryon (avec 10 minutes de retard) et l'invagination commence à se produire. On peut noter que dans ce cas-ci l'invagination se produit à un endroit moins éloigné de la position de départ des cellules du pôle postérieur que dans l'embryon non ablaté, puisque l'extension de la bande germinale est en retard.

Nous pouvons donc supposer que ce sont les contraintes de dilatation générées par l'invagination du mésoderme qui sont responsables des contraintes qui s'appliquent aux cellules de l'endoderme postérieur et qui pourraient activer la voie Fog responsable de la stabilisation apicale de la Myo-II et de leur invagination indépendante de l'extension de la bande germinale.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons décidé d'étendre la zone photoablatée au mésoderme de l'embryon en espérant cette fois-ci stopper toutes les contraintes qui s'appliquent aux cellules du mésoderme postérieur.

9.2 Photoablation dorsale et ventrale de l'embryon

Afin de tester le rôle de l'invagination du mésoderme dans l'activation mécanique du processus menant à l'invagination de l'endoderme postérieur, nous avons en plus de l'ablation dorsale procédé à une ablation ventrale. Nous observons dans ces conditions que les cellules de l'endoderme postérieur ne sont d'une part plus soumises à la dilatation résultant de l'invagination du mésoderme, et qu'elles n'ont également plus de stabilisation apicale de la Myo-II et plus d'invagination (FIGURE 10.1). On observe une localisation peri-cellulaire de Myo-II dans les cellules polaires qui est toujours présente quelles que soient les conditions expérimentales, mais pas de stabilisation apicale de la Myo-II dans l'endoderme postérieur (FIGURE 10.3).

En effet, plus de deux heures après la fin de la cellularisation (qui nous sert de référence), les cellules du pôle postérieur n'ont toujours pas invaginé dans l'embryon photoablaté.

Nous en concluons que les contraintes de dilatation des cellules du pôle postérieur par l'invagination du mésoderme sont susceptible d'activer le processus de mécanotransduction menant à la stabilisation apicale de la Myo-II et à l'invagination de l'endoderme postérieur. Les contraintes liées à l'extension de la bande germinale étant par ailleurs susceptibles d'amplifier le processus, mais pas de le déclencher. Nous pouvons donc voir ici que les cellules du pôle postérieur sont bien soumises à des contraintes mécaniques, comme les cellules du mésoderme, induisant dans les deux cas une stabilisation apicale de la Myo-II et l'invagination.

Mais à la différence du mésoderme, les cellules de l'endoderme postérieur expriment le duo *twist* *fog* mais *snail* n'est pas exprimé. Dans le cas de l'endoderme postérieur, ce sont les contraintes liées à l'invagination du mésoderme qui induisent l'invagination de l'endoderme. Dans celui du mésoderme, ce sont celles développées par les fluctuations stochastiques de forme des apex *snail* dépendantes. Nous nous demandions comment l'invagination du mésoderme pouvait être corrélée à l'expression de *snail* et *twist*/Fog dans le mésoderme alors que l'invagination de l'endoderme postérieur se fait en présence de *twist*/Fog mais en l'absence totale de *snail* dans l'endoderme.

Nous avons émis l'hypothèse que pour l'invagination du pôle postérieur ; de façon similaire à ce que l'on peut avoir dans l'embryon *sna*⁻ indenté ; l'expression de *snail* dans les cellules impliquées dans l'invagination n'est pas en soi une condition *sine qua non* à la possibilité du tissu d'invaginer mais les contraintes mécaniques, pouvant être développées par l'expression de *snail* le sont.

Mais étant donné que l'invagination du mésoderme dépend de l'expression de *snail*, alors on peut en conclure que l'invagination de l'endoderme postérieur, qui dépend de l'invagination du mésoderme, dépend pourtant bien de l'expression de *snail* mais exprimé dans le mésoderme et non dans l'endoderme postérieur. Ce qui montre bien le caractère distant (non autonome cellulaire) des interactions mécaniques entre les différents tissus.

De façon intéressante, il est à noter que l'ablation femto-seconde à 2 photons est connue pour n'être pas délétère pour les tissus non-ablatés — la machinerie transcriptionnelle des cellules proches de l'ablation reste intact (Supatto et al., 2005 ; Supatto, 2005) —. Nous avons cependant souhaité tester plus en avant ce résultat sur des embryons mutants de *snail* bloquant l'invagination du mésoderme donc l'activation de la stabilisation de la Myo-II dans l'endoderme postérieur aux stades précoces de l'invagination du mésoderme, et permettant par ailleurs des expériences de rétablissement des déformations manquantes à l'aide de pinces magnétiques. Ce que les embryons ablatés ne permettent pas de faire — les set-ups 2 photons et magnétiques étant distincts et distants —.

Chapitre 10

Deuxième approche : Rétablissement des mouvements de l'endoderme postérieur par manipulation magnétique sur des mutants *halo snail*

Nous savons que dans l'invagination du mésoderme, la stabilisation apicale de la Myo-II est due à l'expression de *snail* qui génère des contraintes mécaniques sur les cellules. Nous avons également pu observer que suite à la photoablation dorsale des embryons Zipper-GFP, l'invagination du mésoderme semble être responsable d'un mouvement de traction des cellules du pôle postérieur et de la stabilisation apicale de la Myo-II dans les cellules du mésoderme antérieur.

Or nous savons que *snail* est nécessaire à la première vague de constriction stochastiques qui permet de déclencher la stabilisation apicale de la Myo-II dans le mésoderme et l'invagination de ce dernier et que la mutation de *snail* entraîne une disparition de l'invagination.

Nous avons donc entrepris de rétablir les contraintes physiologiques générées par l'invagination du mésoderme dans un embryon mutant de *snail* en mimant par voie magnétique les mouvements cellulaires dus à l'invagination du mésoderme afin de tester le rétablissement de la stabilisation apicale de la Myo-II dans les cellules de l'endoderme postérieur et l'invagination de ce dernier.

Nous avons opté pour l'utilisation d'un double mutant *halo-snail* .

Les deux gènes sont présents sur le chromosome II . Dans l’embryon homozygote, la mutation *halo* provoque une perturbation dans le transport des gouttelettes de lipides hors des cellules lors de la phase de cellularisation (Welte et al., 1998).

Cela se traduit par un phénotype cellulaire opaque facilement reconnaissable lors de la phase de cellularisation (FIGURE B.2). Alors que dans un embryon non *halo* nous pouvons observer le front de *yolk* et le front de cellularisation très distinctement, dans le mutant de *halo* on observe une disparition du front de *yolk* et le front de cellularisation est alors noyé par la forte concentration de lipides.

En choisissant spécifiquement les embryons *halo*, nous sommes donc assurés d’avoir des embryon *sna*⁻ et donc de ne pas avoir d’invagination du mésoderme. Nous réalisons l’injection de liposomes ultramagnétiques (Ultra Magnetic Liposome - UML) fait de ferro-fluides encapsulés dans les liposomes fluorescents à la rhodamine (Béalle et al., 2012) au cours de la première phase de la cellularisation — 30 premières minutes —. Les conditions d’injection sont de 30pL d’une solution d’UML (voir Article 2 pour les concentrations). Puis la stimulation est réalisée durant la seconde phase de la cellularisation — dans les 15 minutes qui précèdent la fin de la cellularisation et le début de l’expression de *snail*, suivie 4 minutes plus tard par l’invagination du mésoderme dans le WT —.

Nous nous assurons ainsi d’avoir un embryon suffisamment résistant pour supporter les contraintes et un tissu suffisamment cohésif pour que la propagation des contraintes appliquées à l’embryon se fasse convenablement, ce qui après avoir essayé d’injecter dans les embryons photoablatés n’était pas possible.

De plus, au cours de la deuxième phase de cellularisation et de ces 15 minutes restantes jusqu’à la fin de la cellularisation, le tissu n’est sujet à aucune contrainte endogène. Seules nos contraintes appliquées au tissu vont donc le perturber dans ce laps de temps. La stimulation s’effectuant pendant environ 5 minutes (± 15 secondes), nous avons à la fin de la stimulation une dizaine de minutes pour laisser le tissu répondre à la stimulation avant la fin de la cellularisation et 20 minutes avant le début de l’activation de la stabilisation apicale de la Myo-II par l’extension de la bande germinale.

La stimulation exercée sur le tissu est faite de façon à être le plus physiologique possible en reproduisant quantitativement la dilatation générée par l’invagination du mésoderme sur l’endoderme postérieur. Pour cela, les UML injectés dorsalement dans le *yolk* de l’embryon sont rassemblés au niveau du dernier cinquième postérieur de l’embryon à l’aide d’une pointe aimantée de 2mm située à 40 μ m de la surface de l’embryon et caractérisée par un champ de 1.2T.

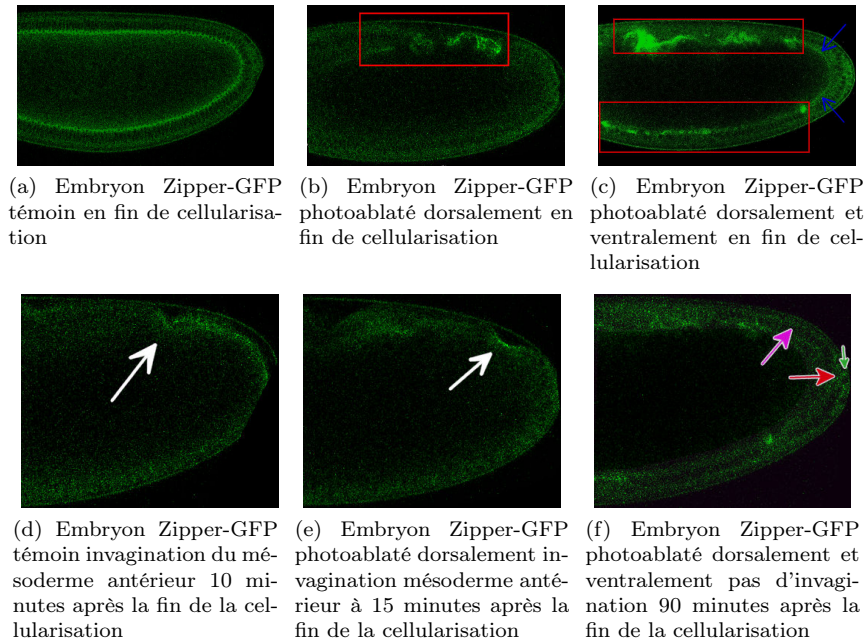


FIGURE 10.1 – Les flèches bleues montrent le front de cellularisation qui se poursuit en dehors des zones photoablatées, ce qui nous confirme que les autres cellules de l'embryon ne subissent aucun dégât (Supatto et al., 2005).

10.1a - embryon témoin au cours de la cellularisation. 10.1d - invagination de l'endoderme postérieur (flèche blanche) 10 minutes après la fin de la cellularisation (dans 5 sur 7).

10.1b - embryon photoablaté dorsalement (rectangle rouge). 10.1e - la photoablation dorsale entraîne un retard de 10 minutes de l'extension de la bande germinale. L'invagination de l'endoderme postérieur (flèche blanche) est visible avec le même retard de 10 minutes (dans 8 embryon sur 12) montrant le lien entre l'extension de la bande germinale et l'invagination de l'endoderme postérieur.

10.1c - embryon photoablaté dorsalement *et* ventralement en cours de cellularisation. 10.1f - l'extension de la bande germinale est totalement bloquée (dans 4 sur 5). Nous pouvons observer l'absence de stabilisation apicale de la Myo-II (flèche rouge). Nous pouvons voir que les cellules polaires (flèche verte) se trouvent toujours au niveau du pôle postérieur, or ces dernières se situent à l'aplomb du mésoderme et suivent ce dernier lors de l'extension de la bande germinale pour être internalisées lors de l'invagination de l'endoderme au niveau de la flèche rose. Leur présence au niveau du pôle postérieur nous montre donc que l'extension de la bande germinale est totalement bloquée.

Puis cette pointe aimantée est déplacée le long du ventre en direction du pôle antérieur de l'embryon sur un intervalle de temps de 5 minutes jusqu'à être à mi-chemin entre les pôles antérieurs et postérieurs avec une dynamique $50\mu m \cdot \text{min}^{-1}$. Les cellules dans lesquels les ferro-fluides se sont amassés se mettent alors à suivre la trajectoire de la pointe et il s'ensuit une tension croissante appliquée sur les cellules du pôle postérieur.

L'analyse par chemographe montre un mouvement d'attraction antérieur des cellules du futur endoderme postérieur dû à l'invagination du mésoderme dans le WT perdue dans le mutant de *snail* qui n'invagine pas. Ce mouvement est rétabli par manipulation magnétique du mutant de *snail* (FIGURE 10.3). Bien que sur une monocouche de cellules la PIV ne soit pas assez sensible pour pouvoir quantifier la dilatation des cellules du futur endoderme dû à ce mouvement, le chemographe permet de montrer que la dynamique d'attraction des cellules de l'endoderme les plus antérieures est de $1.9 \pm 0.5\mu m \cdot \text{min}^{-1}$ dans le WT. Cette dynamique étant de $2.1 \pm 0.5\mu m \cdot \text{min}^{-1}$ dans le *snail* manipulé par voie magnétique. Le rétablissement des contraintes endogènes du WT sur les cellules de l'endoderme postérieur d'un mutant de *snail* par manipulation magnétique sont donc quantitativement physiologiques.

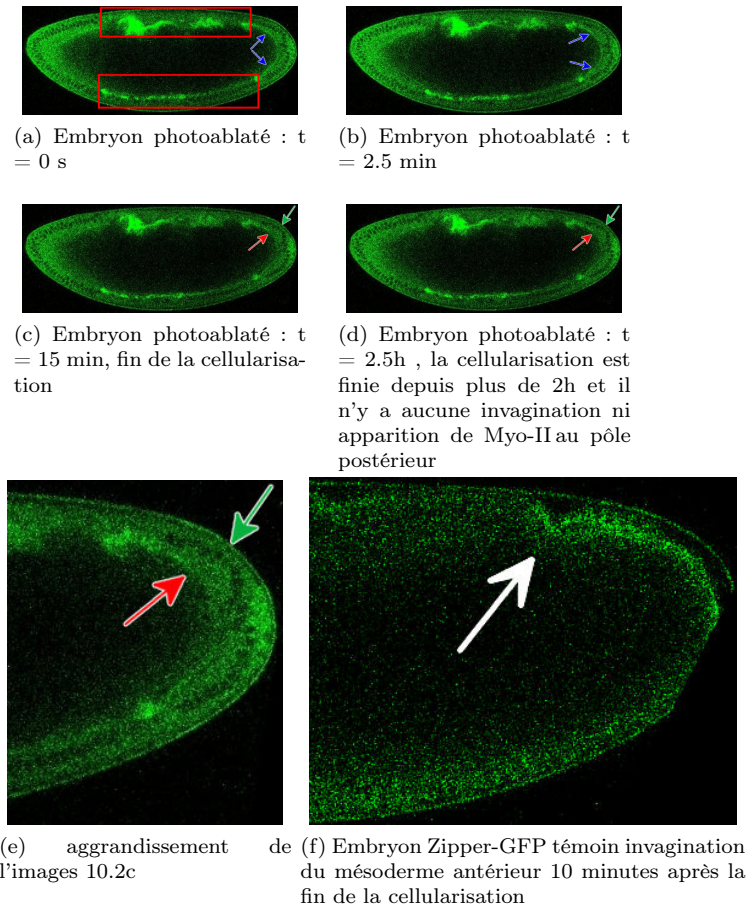


FIGURE 10.2 – Embryon WT photoablaté ventralement et dorsalement. 10.2a et 10.2b - nous pouvons voir que la cellularisation se poursuit naturellement dans les zones non photoablatées (flèches bleues). 10.2c - une fois la cellularisation finie, nous observons comme dans le WT une perte de signal de la Myo-II au niveau du front de cellularisation (flèche rouge), mais nous n'avons plus ici contrairement au WT non ablaté la relocalisation apicale de la Myo-II (flèche verte). 10.2d - plus de 2 heures après la fin de la cellularisation, nous n'observons pas d'invagination de l'endoderme postérieur (flèche violette) alors que dans le WT non ablaté elle survient 10 minutes après la fin de la cellularisation (10.2f flèche blanche).

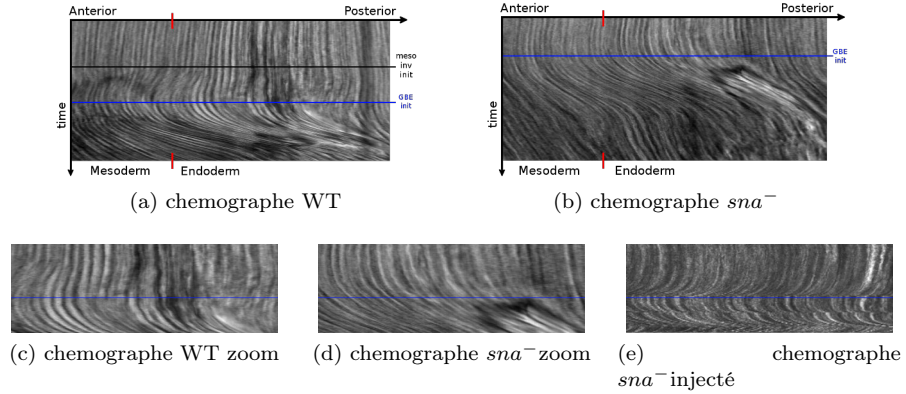


FIGURE 10.3 – La ligne verticale noire marque le début de l’invagination du mésoderme tandis que la ligne bleue marque le début de l’extension de la bande germinale. Les repères rouges indiquent quant à eux la séparation entre le mésoderme — à gauche — et l’endoderme postérieur — à droite—.

10.3a - sur ce chemographe d’un embryon WT, nous pouvons observer l’invagination du mésoderme — zone sombre à gauche avant l’extension de la bande germinale — qui entraîne des cellules de l’endoderme postérieur vers l’antérieur.

10.3b - sur un embryon mutant de *snail*, il n’y a pas d’invagination du mésoderme et les cellules de l’endoderme postérieur ne subissent donc pas de contraintes avant le début de l’extension de la bande germinale.

10.3c et 10.3d - agrandissement des images précédentes.

10.3e - à l’aide des UML injectés et de la pointe magnétique, nous sommes en mesure de reproduire le mouvement appliqué aux cellules de l’endoderme postérieur engendré par l’invagination du mésoderme. Ce mouvement doit engendrer une dilatations des apex des cellules de l’endoderme postérieur dont la mesure n’est pas accessible aux techniques de PIV aujourd’hui au point en 2D, mais pas assez sensibles en 1D ; et sans possibilité d’observation directe sous microscope compte tenu de la géométrie de l’embryon nécessairement couché sur le côté.

Lorsque nous débutons le déplacement de la pointe aimantée, nous voyons dans un intervalle d'environ 30 secondes après l'apparition de spots de Myo-II très localisés apicalement au niveau des jonctions cellulaires (non montré ici). Puis au fur et à mesure que la pointe aimantée est déplacée vers le ventre — et donc que la dilatation membranaire augmente — nous voyons la fluorescence apicale des cellules du pôle postérieur augmenter et former une ligne de stress corticale subapicale de Myo-II qui se propage sur plusieurs cellules (FIGURE 10.4).

Cette augmentation de la fluorescence et l'apparition de cette ligne de stress se fait environ 15 minutes après.

Dans un embryon contrôlé *сна*⁻ non stimulé, l'apparition jonctionnelle de la Myo-II commence environ 2 à 3 minutes après le début de l'extension de la bande germinale — soit 12 à 13 minutes après la fin de la cellularisation —, puis la ligne de stress apparaît encore 10 minutes plus tard (non montré ici). **Nous voyons donc que la stimulation mécanique mimant les contraintes développées par l'invagination du mésoderme sur l'endoderme postérieur permettent de rétablir la stabilisation apicale de la Myo-II manquante dans le mutant de *snail*. Cela suggère donc que l'invagination du mésoderme induit mécaniquement la stabilisation apicale de la Myo-II dans l'endoderme postérieur, et son invagination.**

Puis, l'extension de la bande germinale commence. Nous observons par ailleurs que dès que les cellules du pôle postérieur commencent à migrer vers le dos de l'embryon et que les cellules ne sont plus dans la zone sphérique, les cellules qui étaient alors en tension avec la ligne de stress de Myo-II commencent à invaginer (non montré ici). Cette invagination est anticipée par rapport à ce que l'on peut observer dans l'embryon sauvage car nous avons anticipé de 15 minutes la stimulation mécanique des cellules.

De façon intéressante les contraintes développées par l'extension de la bande germinale sont donc aussi susceptibles d'activer — mais plus tard — le processus en l'absence d'invagination du mésoderme dans un mutant de *snail* sans perturbation mécanique .

L'ensemble de ces observations montre donc l'existence d'un processus d'induction mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II à l'œuvre dans l'endoderme postérieur suite à l'induction mécanique résultant de l'invagination du mésoderme, avant l'extension de la bande germinale.

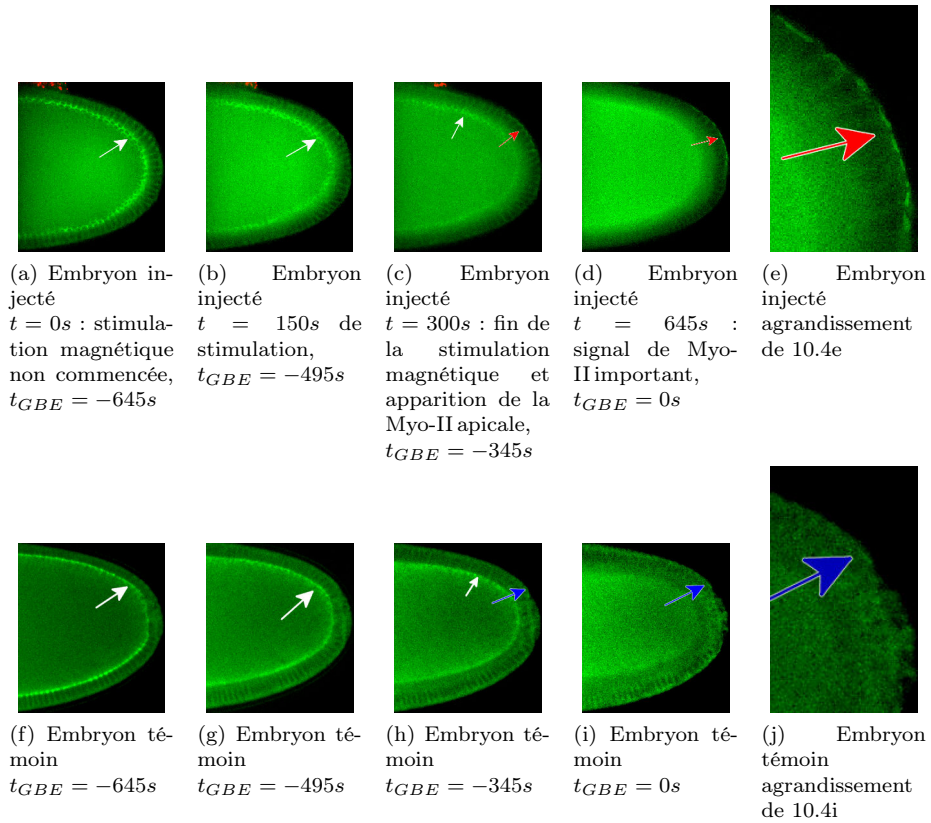


FIGURE 10.4 – Anticipation de l'attraction apicale de la Myo-II (en vert) dans un embryon *halosnail* injecté en UML (en rouge).

10.4a, 10.4b, 10.4f et 10.4g - les flèches blanches montrent le front de cellularisation.

10.4c - nous pouvons observer dans l'embryon injecté et soumis au gradient de champ magnétique que la Myo-II est stabilisée apicalement au cortex au niveau du futur endoderme postérieur (flèches rouges) alors que la cellularisation n'est pas encore finie (flèche blanche). Elle est absente au même stade dans le mutant non injecté (10.4h flèche bleue).

10.4d - le signal de Myo-II est toujours présent au début de l'extension de la bande germinale (flèche rouge). Au même stade dans le mutant non injecté ne présente aucun signal de Myo-II apicale (flèche bleue). Cette stabilisation de la Myo-II n'arrive dans le WT que 15 minutes après l'extension de la bande germinale, alors qu'à $t_{GBE} = 0s$ la Myo-II semble essentiellement jonctionnelle (10.4d flèche rouge), et c'est donc la stimulation mécanique générée par les liposomes magnétiques qui permet d'anticiper ce phénomène.

10.4e et 10.4j - sur ces agrandissements nous pouvons remarquer le signal de Myo-II dans l'embryon injecté qui est absente dans l'embryon témoin au même stade

Annexe A

Mise au point d'une méthode d'injection de liposomes ultra-magnétiques pour mimer les déformations mécaniques endogènes dans l'épithélium vivant de l'embryon de *Drosophile*

Mon objectif est donc de tester l'activation mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II dans l'endoderme postérieur par l'invagination du mésoderme. Pour ce faire, l'expérience que j'ai menée a consisté à rétablir par voie magnétique les contraintes manquantes au pôle postérieur dans un embryon mutant de *snail* Zipper-GFP dans lequel le mésoderme est incapable d'invaginer. Une méthode d'injection permettant la compression de l'endoderme antérieur par des forces physiologiques a déjà été utilisée au sein de l'équipe (Desprat et al., 2008). Mais les cellules injectées, bien que ne servant qu'à comprimer les cellules d'intérêt étaient altérées par la présence des ferrofluides.

L'étape suivante a été ici d'adapter l'injection de particules magnétiques qui été réalisée sur le dos pour l'invagination de la bouche (Desprat et al., 2008) en réussissant à faire une injection non délétère dans le mésoderme. Cette expérience présente une difficulté accrue par rapport à la simple indentation car les particules magnétiques doivent être injectées dans l'embryon au

cours de la cellularisation sans endommager le mésoderme. Puis à l'aide d'une pointe aimantée, les particules magnétiques sont attirées dans les cellules au cours de la cellularisation.

Enfin, une fois la cellularisation finie, et en l'absence d'invagination — preuve que nous sommes dans un mutant *sna⁻* — nous pouvons utiliser la pointe aimantée pour attirer les cellules du mésoderme antérieure et simuler ainsi les contraintes générées par l'invagination du mésoderme.

En comparaison avec l'indentation (Pouille et al., 2009), l'injection de particules magnétiques est plus délicate. Elle nécessite d'injecter les particules magnétiques — il faut donc transpercer la paroi vitelline et traverser les cellules au niveau du point d'injection — dans un embryon en cours de cellularisation. Le fait que l'embryon n'ait pas fini sa cellularisation le rend plus fragile qu'un embryon ayant fini sa cellularisation.

De plus, le fait d'injecter des particules ajoute une difficulté supplémentaire en comparaison à la simple indentation d'un embryon collé sur une lamelle.

La difficulté est due également au fait que l'injection provoque une augmentation de pression dans l'embryon due à l'introduction de la pipette d'injection puis de la solution de particules magnétiques, une perte de matière au niveau du point d'entrée de la pipette d'injection — du fait de la surpression dans l'embryon au moment de l'injection le *yolk* et les cellules présentes autour du trou dans la paroi vitelline vont s'échapper et déstructurer le feuillet cellulaire — et à la toxicité des particules utilisées.

Les difficultés liées à la fragilité de l'embryon ne font malheureusement pas parti des paramètres sur lesquels nous pouvons jouer, et seul une amélioration de l'injection peut nous permettre d'améliorer ce point.

Les difficultés liées à l'injection ont quant à elles été simples — quoique longues — à maîtriser.

Afin de mimer les forces qui peuvent s'appliquer sur les cellules du pôle postérieur sans les perturber, nous avons entrepris de magnétiser les cellules du mésoderme. Nous pouvons ainsi mimer les forces générées par l'invagination du mésoderme en "tirant" l'endoderme vers le ventre, ou mimer les forces générées par l'extension de la bande germinale en «poussant» l'endoderme vers le dos.

Pour magnétiser les cellules du mésoderme, nous avons essayé d'injecter dans plusieurs endroits — par le pôle antérieur, et en plusieurs endroits au niveau du dos — dans l'embryon pour minimiser les dégâts sur les cellules du pôle postérieur. Nous avons également testé de déposer les particules magnétiques dans le *yolk* pour les attirer à l'aide de la pointe aimantée, et près des cellules que l'on souhaite magnétiser.

Finalement c'est la solution de l'injection dorsale — au troisième quart — qui a été retenue car elle permet de minimiser la distance d'embryon à traverser, et les particules magnétiques sont injecté à l'aplomb des cellules que l'on veut magnétiser tout en injectant le plus possible au milieu du *yolk* afin de ne pas perturber la cellularisation.

Le problème lié à la toxicité des particules magnétiques a été réglé grâce à l'utilisation d'UML (Béalle et al., 2012) dans lesquelles les particules sont encapsulées.

Enfin, les difficultés liées à l'injection sont plus compliquées à résoudre. Pour limiter la sortie de matière de l'embryon lors de l'injection, nous pouvons désécher partiellement ce dernier à l'aide de gel de silice. On réduit ainsi la pression à l'intérieur de l'embryon, ce qui permet de limiter grandement la quantité de matière perdue par l'embryon au point d'injection.

Cependant, on ne résout pas entièrement le problème de la matière sortant de l'embryon — même s'il est grandement amélioré —. Le plus gros problème reste les dommages créés localement aux cellules entourant le point d'injection, et la seule solution trouvée à ce problème à été d'injecter dorsalement en faisant passer l'aiguille aussi loin que possible de la zone que l'on veut magnétiser afin de s'assurer de ne pas la perturber autrement que par les mouvements provoqués par la pointe magnétique. Cependant nous sommes obligés d'injecter à proximité de la zone que l'on veut magnétiser, et pour cela c'est le troisième quart de l'embryon qui a été choisi. On peut ainsi injecter près du mésoderme sans détériorer les cellules du pôle postérieur A.1.

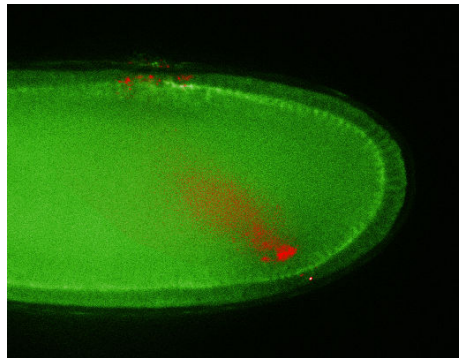


FIGURE A.1 – Embryon *halo snail* Myo-II-GFP injecté avec les UML. L'embryon est approximativement à la moitié de la cellularisation comme nous pouvons le voir par rapport à la position du front de cellularisation marqué grâce à la Myo-II-GFP. Les UML (en rouge) injectés dans le *yolk* à proximité du front de cellularisation vont pouvoir être manipulés à l'aide du gradient magnétique afin de stimuler le futur endoderme postérieur.

Une fois l'injection effectuée, les particules magnétiques — qui ont été injectées dans le *yolk* — sont manipulées à l'aide d'une pointe magnétique. Dans un premier temps, la pointe est approchée du mésoderme afin de simplement faire migrer les particules magnétiques du *yolk* dans les cellules en cours de cellularisation.

Les particules magnétiques se heurtent au front de cellularisation, et il faut veiller à approcher suffisamment l'aimant des cellules pour faire rentrer une partie des particules dans la partie basale des cellules, sans pour autant être trop proche et se retrouver avec des particules magnétiques qui traversent les cellules et qui peuvent perturber leur physiologie apicalement.

Une fois toutes ces étapes réalisées avec succès, il nous reste à attendre la fin de la cellularisation de l'embryon.

L'une des difficultés de cette méthode — en dehors de toutes les difficultés liées à l'injection dans l'embryon de particules magnétiques — est qu'elle nous oblige à injecter tous les embryons présent sur la lame dans l'espoir d'avoir au moins un mutant *sna*⁻ avec lequel faire une expérience. Nous nous retrouvons donc à devoir injecter des embryons qui peuvent se révéler ne pas être mutant alors que nous n'avions avant qu'à attendre la fin de la cellularisation avant de commencer — ou pas — à manipuler l'embryon.

Grâce aux particules injectées et aux champs magnétiques appliquées, nous sommes en mesure de déplacer les cellules du mésoderme. Ces déplacements entraînent une déformation mécanique des cellules de l'endoderme postérieur (FIGURE 10.3). Cette déformation entraîne le rétablissement de la stabilisation apicale du la Myo-II dans les cellules de l'endoderme postérieur (FIGURE 10.4).

Plusieurs avantages se dégagent de cette approche. En mesurant la luminosité des particules magnétiques nous sommes capable d'estimer leur nombre. Comme nous connaissons le gradient de champ magnétique et la concentration de ferrofluides injectés ($30pL$), nous sommes donc capable de mesurer les forces appliquées au tissus qui sont de l'ordre de 50 à 100nN. Cela n'était auparavant pas possible avec l'indentation car nous n'avons pas une vue 3D l'embryon ni la pression interne pour pouvoir calculer les forces exercées à partir des déformations appliquées.

De plus, le recours aux particules magnétiques nous permet d'être fin sur l'application des forces et de mimer les forces physiologiques (FIGURE 10.3)

Annexe B

Mesure de la vitesse de cellularisation

Pour faciliter le travail avec les mutants de *snail*, nous avons essayé de trouver un moyen de différencier les embryons avant la fin de la cellularisation. L'idée est de pouvoir à l'avance savoir quels sont les embryons *sna*⁻ afin de ne pas avoir à injecter tous les embryons mais seulement ceux qui sont homozygotes *sna*⁻.

La seule information que l'on pouvait mesurer sur l'embryon sans le détruire était la position du front de cellularisation.

Nous avons donc filmé le processus de cellularisation de plusieurs embryons du début de la cellularisation jusqu'au début de l'extension de la bande germinale. Nous avons donc accès à tout le processus dans le film, et en regardant simplement si l'extension de la bande germinale était précédée ou non de l'invagination du mésoderme, nous étions alors en mesure de savoir *a posteriori* quels étaient les embryons WT et quels étaient les mutants homozygotes *sna*⁻.

Nous avons donc utilisé ces différents films pour mesurer la vitesse de cellularisation dans les différents embryons. Il s'est révélé que la vitesse de cellularisation diffère entre les embryons mutants de *snail* homozygotes des autres embryons.

La cellularisation se décompose en deux phases différentes. La première s'étend de l'apparition du front de cellularisation jusqu'à ce qu'elle arrive à la moitié de la taille des cellules pleinement cellularisées soit environ les dix premières minutes de la cellularisation.

La seconde phase s'étend sur les dix minutes suivantes, c'est à dire de la fin de la première phase de cellularisation jusqu'à la fin de cette dernière.

C'est deux phases sont aisément reconnaissable. En effet, la première phase est plutôt lente (FIGURE B.1) et l'on voit la vitesse de cellularisation croître lors de la deuxième phase.

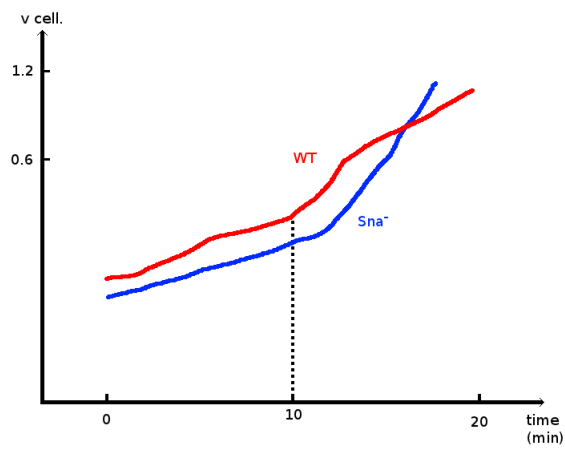


FIGURE B.1 – Vitesse de cellularisation dans les embryons homozygotes *sna⁻* et WT. Les ordonnées sont exprimées en pixels.

WT : $0.167 \pm 0.019 \text{ px.min}^{-1}$

Sna : $0.287 \pm 0.029 \text{ px.min}^{-1}$

WT/Sna : $p = 0.016$

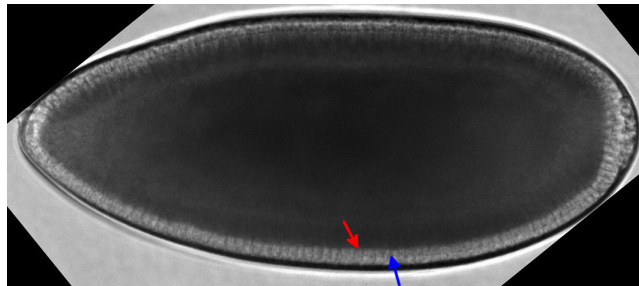
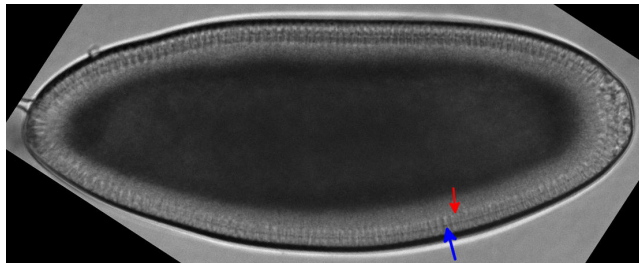
(a) Embryon mutant homozygote *halosnail*(b) Embryon non homozygote *halosnail*

FIGURE B.2 – Comparaison entre un embryon homozygote *halosnail* et un embryon WT. Sur les deux images, le pôle postérieur se situe à droite de l'image, le pôle antérieur à gauche, la partie dorsale vers le haut de la page et la partie ventrale vers le bas de la page.

Les flèches bleues indiquent la ligne du front de cellularisation, et les flèches rouges indiquent le front de *yolk*. On remarque que dans l'embryon *halo*, le front de *yolk* est directement en contact avec les lipides repoussés par la cellularisation (masse sombre). À l'inverse dans l'embryon WT, on remarque une zone claire franche entre le front de *yolk* et la masse des lipides repoussés par la cellularisation. Ce phénotype est facilement identifiable et nous permet de récolter uniquement des embryons dont on est sûr qu'ils sont homozygotes *sna*⁻.

Perspectives

Le travail effectué durant la thèse aborde la question de l'implication des processus de mécanotransduction au cours du développement embryonnaire, en mettant l'accent sur le contrôle mécanique de la stabilisation apicale de la Myo-II menant à l'invagination du mésoderme et de l'endoderme postérieur.

Les prédictions de la simulation montrant la possibilité d'une activation de ce processus par les fluctuations actives de forme des apex *snail* dépendantes dans l'invagination du mésoderme sont actuellement testées expérimentalement au sein du laboratoire.

Dans ce cadre, l'étude du rôle de l'invagination du mésoderme dans l'activation de l'invagination du pôle postérieur sera achevée, en particulier en étudiant la nécessité de l'expression de Fog dans le processus.

Les implications en terme d'évolution et de génération mécaniquement induite de gastrula à partir de blastula devront être testées expérimentalement sur plusieurs espèces, en particulier en réponse à leur contact avec le sol sous l'effet de la gravité.

De façon générale, l'étude expérimentale du rôle des processus de mécanotransduction dans les processus d'évolution d'organismes primitifs a par ailleurs commencé au laboratoire. Les résultats auxquels j'ai participé sur l'induction mécanique de pY-667 β -cat dépendant du gène mésodermique *twist* a en effet été trouvé conservé dans le mésoderme du *zebrafish* (voir article 2 en révision), les deux espèces ont divergé autour de 500-600 millions d'années, époque supposée de l'émergence du mésoderme à partir des organisme primitifs diploblastiques moins complexes. Ce qui ouvre la possibilité d'un processus de mécanotransduction β -cat dépendant à l'origine de l'émergence du mésoderme au cour de l'évolution.

Références

- Acheson, D. J. (1990). *Elementary fluid dynamics*.
- Alberga, A., Boulay, J., Kempe, E., Denefeld, C., & Haenlin, M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development*, *111*(4), 983–992.
- Arendt, D. (2004). Comparative aspects of gastrulation. *Gastrulation*, edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Béalé, G., Di Corato, R., Kolosnjaj-Tabi, J., Dupuis, V., Clément, O., Gazeau, F., ... Ménager, C. (2012). Ultra magnetic liposomes for MR imaging, targeting, and hyperthermia. *Langmuir*, *28*(32), 11834–11842.
- Bertet, C., Sulak, L., & Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature*, *429*(6992), 667–671.
- Claret, S., Sanial, M., & Plessis, A. (2007). Evidence for a novel feedback loop in the hedgehog pathway involving smoothed and fused. *Current biology*, *17*(15), 1326–1333.
- Conte, V., Muñoz, J. J., & Miodownik, M. (2008). A 3d finite element model of ventral furrow invagination in the *Drosophila Melanogaster* embryo. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, *1*(2), 188–198.
- Costa, M., Sweeton, D., & Wieschaus, E. (1993). Gastrulation in drosophila : cellular mechanisms of morphogenetic movements. In (Vol. 1, pp. 425–465). Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Davidson, E. H. (2001). Genomic regulatory systems. development and evolution. In A. Press (Ed.), (pp. 75–80). Access Online via Elsevier.
- Davidson, E. H., Cameron, R. A., & Ransick, A. (1998). Specification of cell fate in the sea urchin embryo : summary and some proposed mechanisms. *Development*, *125*(17), 3269–3290.
- Dawes-Hoang, R. E., Parmar, K. M., Christiansen, A. E., Phelps, C. B., Brand, A. H., & Wieschaus, E. F. (2005). Folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization. *Development*, *132*(18), 4165–4178.
- Desprat, N., Supatto, W., Pouille, P.-A., Beaurepaire, E., & Farge, E. (2008). Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior mid-gut differentiation in *Drosophila* embryos. *Developmental cell*, *15*(3), 470–477.
- Dike, L. E., Chen, C. S., Mrksich, M., Tien, J., Whitesides, G. M., & Ingber, D. E. (1999). Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, *35*(8), 441–448.
- Driquez, B., Bouclet, A., & Farge, E. (2011). Mechanotransduction in mechanically coupled pulsating cells : transition to collective constriction and mesoderm invagination simulation. *Physical Biology*, *8*(6), 066007.
- Farge, E. (2003). Mechanical induction of twist in the *Drosophila* fore-gut/stomodeal primordium. *Current biology*, *13*(16), 1365–1377.

- Farge, E. (2013). Biological theory : integrating development, evolution, and cognition. In KLI (Ed.), (Vol. 7, chap. Mechano-sensing in Embryonic Biochemical and Morphologic Patterning : Evolutionary Perspectives in the Emergence of Primary Organisms). Springer.
- Fernandez-Gonzalez, R., Simoes, S. d. M., Röper, J.-C., Eaton, S., & Zallen, J. A. (2009). Myosin-II dynamics are regulated by tension in intercalating cells. *Developmental cell*, *17*(5), 736–743.
- Galbraith, C. G., & Sheetz, M. P. (1998). Forces on adhesive contacts affect cell function. *Current opinion in cell biology*, *10*(5), 566–571.
- Garber, R. L., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus *antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO J.* *2*, 2027–2036.
- Gilbert, S. (1994). Specification of cell fate by progressive cell-cell interactions. In (pp. 575–622).
- Hamant, O., Heisler, M. G., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., ... others (2008). Developmental patterning by mechanical signals in arabidopsis. *science*, *322*(5908), 1650–1655.
- Johnston, D. S., & Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the drosophila embryo. *Cell*, *68*(2), 201–219.
- Kahn, J., Shwartz, Y., Blitz, E., Krief, S., Sharir, A., Breitel, D. A., ... others (2009). Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate. *Developmental cell*, *16*(5), 734–743.
- Kam, Z., Minden, J. S., Agard, D. A., Sedat, J. W., & Leptin, M. (1991). *Drosophila* gastrulation : analysis of cell shape changes in living embryos by three-dimensional fluorescence microscopy. *Development*, *112*(2), 365–370.
- Kelly, C., Chin, A. J., Leatherman, J. L., Kozlowski, D. J., & Weinberg, E. S. (2000). Maternally controlled (β)-catenin-mediated signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Development*, *127*(18), 3899–3911.
- Khachigian, L. M., Resnick, N., Gimbrone Jr, M. A., & Collins, T. (1995). Nuclear factor-KB interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Journal of Clinical Investigation*, *96*(2), 1169.
- Landau, L. D., & Lifshitz, E. M. (1965). *Elasticity theory* (M. . Mir, Ed.). Pergamon Press.
- Lawrence, P. A., et al. (1992). The genetics of animal design. In (chap. The making of a fly). Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Leptin, M. (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.*(5), 1568–1576.
- Leptin, M., & Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in drosophila. *Development*, *110*(1), 73–84.
- Lewis, E. B., et al. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, *276*(5688), 565–570.

- Martin, A. C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., & Wieschaus, E. F. (2010). Integration of contractile forces during tissue invagination. *The Journal of cell biology*, *188*(5), 735–749.
- Martin, A. C., Kaschube, M., & Wieschaus, E. F. (2008). Pulsed contractions of an actin–myosin network drive apical constriction. *Nature*, *457*(7228), 495–499.
- McClay, D. R., Peterson, R. E., Range, R. C., Winter-Vann, A. M., & Ferkowicz, M. J. (2000). A micromere induction signal is activated by beta-catenin and acts through notch to initiate specification of secondary mesenchyme cells in the sea urchin embryo. *Development*, *127*(23), 5113–5122.
- Morize, P., Christiansen, A. E., Costa, M., Parks, S., & Wieschaus, E. (1998). Hyperactivation of the folded gastrulation pathway induces specific cell shape changes. *Development*, *125*(4), 589–597.
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795–801.
- Odell, G. M., Oster, G., Alberch, P., & Burnside, B. (1981). The mechanical basis of morphogenesis : I. epithelial folding and invagination. *Developmental biology*, *85*(2), 446–462.
- Pauchard, L., Pomeau, Y., & Rica, S. (1997). Déformation des coques élastiques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIB-Mechanics-Physics-Chemistry-Astronomy*, *324*(7), 411–418.
- Pogorelov, A. V. (1988). *Bendings of surfaces and stability of shells* (N° 72). AMS Bookstore.
- Pouille, P. A., Ahmadi, P., Brunet, A. C., & Farge, E. (2009). Mechanical signals trigger myo-ii redistribution and mesoderm invagination in *Drosophila* embryos. *Sci. Signal*.
- Pouille, P.-A., & Farge, E. (2008). Hydrodynamic simulation of multicellular embryo invagination. *Physical biology*, *5*(1), 015005.
- Rauch, C., Brunet, A.-C., Deleule, J., & Farge, E. (2002). C2c12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of bmp2 endocytosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *283*(1), C235–C243.
- Rauch, C., & Farge, E. (2000). Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry. *Biophysical journal*, *78*(6), 3036–3047.
- Rauzi, M., Hočevar Brezavšček, A., Zihlerl, P., & Leptin, M. (2013). Physical models of mesoderm invagination in *Drosophila* embryo. *Biophysical journal*, *105*(1), 3–10.
- Ray, R., Arora, K., Nusslein-Volhard, C., & Gelbart, W. (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the drosophila embryo. *Development*, *113*(1), 35–54.
- Robinson, J. A., Chatterjee-Kishore, M., Yaworsky, P. J., Cullen, D. M., Zhao, W., Li, C., ... others (2006). Wnt/ β -catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(42), 31720–31728.

- Roth, S., Stein, D., & Nüsslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, *59*(6), 1189–1202.
- Royou, A., Field, C., Sisson, J. C., Sullivan, W., & Karess, R. (2004). Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin-II during furrow formation in early drosophila embryos. *Molecular biology of the cell*, *15*(2), 838–850.
- Rubin, C., Recker, R., Cullen, D., Ryaby, J., McCabe, J., & McLeod, K. (2004). Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli : a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *Journal of Bone and Mineral Research*, *19*(3), 343–351.
- Rusch, J., & Levine, M. (1996). Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Current opinion in genetics & development*, *6*(4), 416–423.
- Sen, B., Xie, Z., Case, N., Ma, M., Rubin, C., & Rubin, J. (2008). Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable β -catenin signal. *Endocrinology*, *149*(12), 6065–6075.
- Speman, H., & Mangold, H. (1924). In foundations of experimental embryology. In B. Willier & J. Oppenheimer (Eds.), (chap. Introduction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species). New York : Hafner.
- Supatto, W. (2005). *Imagerie multiphoton quantitative et ablation laser par impulsions femtosecondes pour l'étude de l'expression génétique mécanosensible chez l'embryon de Drosophile sauvage*. Thèse de doctorat non publiée, Paris 7 René DESCARTES.
- Supatto, W., Débarre, D., Moulia, B., Brouzés, E., Martin, J.-L., Farge, E., & Beaurepaire, E. (2005). In vivo modulation of morphogenetic movements in drosophila embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(4), 1047–1052.
- Sweet, H. C., Hodor, P. G., & Etensohn, C. A. (1999). The role of micromere signaling in notch activation and mesoderm specification during sea urchin embryogenesis. *Development*, *126*(23), 5255–5265.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M., & Wieschaus, E. (1991). Gastrulation in *Drosophila* : the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development*, *112*(3), 775–789.
- Takahashi, M., Takahashi, F., Ui-Tei, K., Kojima, T., & Saigo, K. (2005). Requirements of genetic interactions between Src42A, Armadillo and shotgun, a gene encoding E-cadherin, for normal development in *Drosophila*. *Development*, *132*(11), 2547–2559.
- Takahashi, Y., Bontoux, M., & Le Douarin, N. M. (1991). Epithelio-mesenchymal interactions are critical for Quox 7 expression and membrane bone differentiation in the neural crest derived mandibular mesenchyme. *The EMBO journal*, *10*(9), 2387.
- Van Veelen, W., Le, N. H., Helvensteijn, W., Blondin, L., Theeuwes, M., Bakker, E. R., ... others (2011). β -catenin tyrosine-654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut*, *60*(9), 1204–1212.

- Welte, M. A., Gross, S. P., Postner, M., Block, S. M., & Wieschaus, E. F. (1998). Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos : Forces and kinetics. *Cell*, *92*(4), 547–557.
- Young, P. E., Pesacreta, T. C., & Kiehart, D. P. (1991). Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, *111*(1), 1–14.

