

L'ÉPONGE MARINE OSCARELLA LOBULARIS : UN MODÈLE POUR COMPRENDRE L'ORIGINE ET L'ÉVOLUTION DES ÉPITHÉLIUMS

RENARD Emmanuelle^{1*}, SCHENKELAARS Quentin^{1*}, ROCHER Caroline¹,
VERNALE Amélie^{1,2}, DE PAO MENDONCA Cassandra^{1,2}, CAPPELLEN Laura¹,
MASSEY-HARROCHE Dominique², LE BIVIC André², BORCHIellini Carole^{1°}

1. Aix Marseille Univ, Avignon Université, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France

2. Aix Marseille Univ, CNRS, IBDM, Marseille, France

*Co-premiers auteurs

° Auteur-correspondant : carole.borchiellini@imbe.fr

MARINE SPONGE *OSCARELLA LOBULARIS* : A MODEL FOR UNDERSTANDING THE ORIGIN AND EVOLUTION OF EPITHELIA

ABSTRACT

In order to investigate the origin and evolution of epithelia, we are developing a model of sponge belonging to the homoscleromorph class. Sponges are one of the earliest emerged animal lineages and are therefore a key group for understanding the early steps of animal evolution. We aim to characterize the molecular mechanisms involved in the establishment of epithelia in our model in order to decipher, in a comparative approach, the mechanisms that are conserved across animals and thus probably acquired in their last common ancestor from those specific to our model. To address these central issues, we rely on a set of complementary approaches: comparative genomics and transcriptomics, classical histology, electron microscopy, immunofluorescence, biochemistry and proteomics.

KEY WORDS

Cell junctions, cell polarity, basement membrane, evo-devo, immunostaining

RESUME

Afin d'émettre des hypothèses sur l'origine et l'évolution des épithéliums, nous développons un modèle d'éponge appartenant à la classe des homoscléromorphes. Les éponges sont l'une des lignées ayant émergé le plus précocement au cours de l'évolution des animaux, elles constituent donc un groupe clé pour comprendre les premières étapes de l'évolution animale. Nous cherchons à caractériser les mécanismes moléculaires qui concourent à la mise en place des épithéliums dans notre modèle afin d'en déduire, dans une approche comparative, les mécanismes qui sont conservés à l'échelle des animaux et donc acquis très probablement chez leur dernier ancêtre commun et ceux spécifiques à notre modèle. Afin de répondre à ces questions fondamentales, nous nous appuyons sur un ensemble d'approches complémentaires : génomique et transcriptomique comparées, histologie classique, microscopie électronique, immunofluorescence, biochimie et protéomique.

MOTS CLÉS

Jonctions cellulaires, polarité cellulaire, lame basale, évo-dévo, immunomarquage

INTRODUCTION

Qu'est-ce qu'un épithélium ?

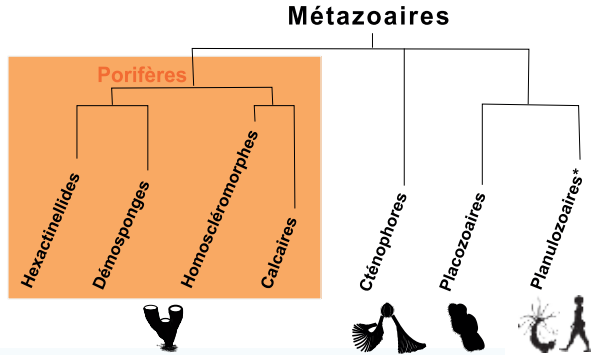
La définition des épithéliums chez les bilatériens

Les épithéliums sont des tissus mis en place très tôt au cours de l'embryogenèse, au stade blastula. Ils assurent tout le long de la vie des métazoaires (animaux) des fonctions vitales en assurant le rôle de barrières mécaniques et chimiques vis-à-vis de l'environnement tout en maintenant les échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. De plus, ces tissus complexes permettent l'intégrité et la robustesse des structures et des organes tout en conservant la plasticité nécessaire lors du remodelage des tissus à la fois au cours de l'embryogenèse et de l'organogenèse mais également lors des processus de cicatrisation et de régénération (pour revue voir [1] et littérature citée). De ce fait, toute altération de la morphologie ou de la fonction de ces épithéliums peut se traduire par des pathologies sévères comme des cancers [2–4].

D'un point de vue évolutif, l'invention d'un épithélium est considérée comme l'un des événements clés ayant permis, il y a plus de 700 millions d'années, l'acquisition d'une multicellularité permanente chez l'ancêtre commun des métazoaires [5–7]. Dans le but d'inférer les caractéristiques morphologiques et moléculaires de l'épithélium ancestral, il est nécessaire de développer des approches comparatives au sein des métazoaires.

Ces dernières ont été, dans un premier temps, exclusivement restreintes aux animaux à symétrie bilatérale (bilatériens), qui représentent 99% de la biodiversité animale actuelle et qui incluent la plus grande partie des organismes modèles incontournables en biologie cellulaire et du développement animal (drosophile, souris, xénope, poulet...) (**Figure 1**).

Figure 1 : Illustration schématique des relations de parenté chez les métazoaires et au sein des éponges et leurs principales caractéristiques épithéliales (*Nota bene* : la longueur des branches ne représente ni le temps de divergence ni la distance génétique entre les taxons) : observations histologiques des structures épithéliales et prédictions de gènes codant pour les principales protéines impliquées dans celles-ci. **P**= présence ; **A**=absence ; **P**= présent mais certains domaines protéiques absents ; **P/A**=dépend des espèces ; **?** = ambiguïté dans la littérature. *Planulozoaires = ensemble formé par cnidaires+bilatériens. Les silhouettes de cténophore, placozoaire, *Nematostella* et homme sont issues de Phylopic (<http://phylopic.org/>).



Polarité cellulaire

<i>Observations histologiques</i>	P	P	P	P	P	P	P
PAR	P	P	P	P	P	P	P
CRUMB	P	P	P	P	A	P	P
SCRIBBLE	P	P	P	P	P/A	P	P

Jonctions adhérentes

<i>Observations histologiques</i>	A	A	P	P	P	P	P
E- CADHERINE	P	P	P	P	P	P	P
α- CATENINE	P	P	P	P	P	P	P
β- CATENINE	P	P	P	P	P	P	P
δ- CATENINE	P	P	P	P	P	P	P

Jonctions communicantes

<i>Observations histologiques</i>	A	A	A	A	P	A	P
INNEXINE	A	A	A	A	P	A	P

Jonctions serrées

<i>Observations histologiques</i>	A	A	A	P	A	?	P
CLAUDINES	P	P	P	P	P	P	P
CONTACTINE	A	A	A	A	A	P	P
NEUREXINE	A	A	A	A	A	P	P
NEUROGLYCANE	A	A	A	A	A	P	P

Lame basale

<i>Observations histologiques</i>	A	A	P	P	P/A	A	P
COLLAGENE IV	A	P	P	P	P	P	P
LAMININES	P	P	P	P	P	P	P
PERLECAN	A	A	A	A	A	P	P
NIDOGENE	A	A	A	A	A	P	P

Chez les bilatériens, la comparaison des épithéliums a permis de mettre en évidence des caractéristiques partagées et d'établir des caractéristiques épithéliales « types » (**Figure 2**) (Pour revue voir [1] et références citées). Ces caractéristiques sont également présentes chez les cnidaires, suggérant que l'ancêtre commun de ces taxons présentait déjà un agencement tissulaire comparable (**Figure 2**). Ces épithéliums sont constitués de cellules jointives (une ou plusieurs couches) présentant une polarité apico-basale. Différents types de jonctions intercellulaires y assurent la cohésion, la communication et la perméabilité. Ces épithéliums reposent sur une lame basale contenant du collagène de type IV, protéine architecte majeure de cette structure. La lame basale n'est pas une structure inerte, elle assure grâce à des jonctions cellules-matrice, conjointement avec les jonctions intercellulaires, des fonctions clés dans l'intégrité épithéliale [8].

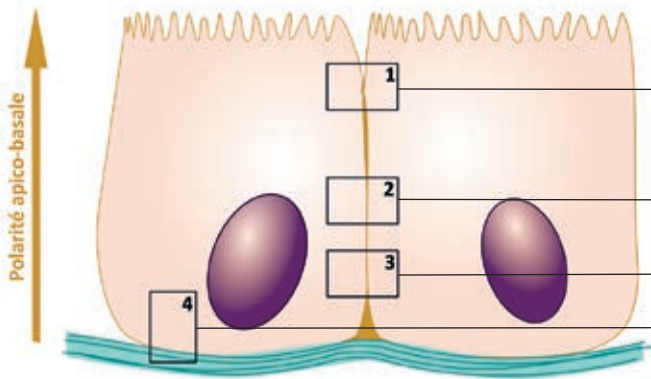
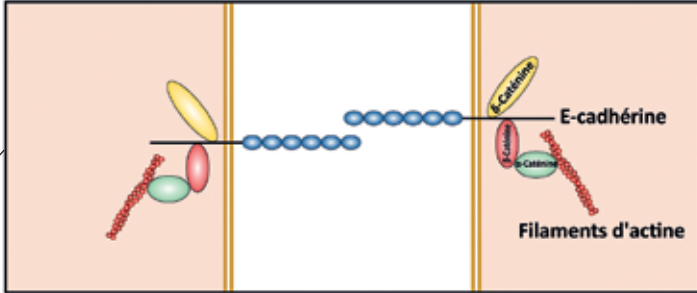


Figure 2 : Principales protéines structurales impliquées dans les épithéliums chez les bilatériens et les cnidaires.

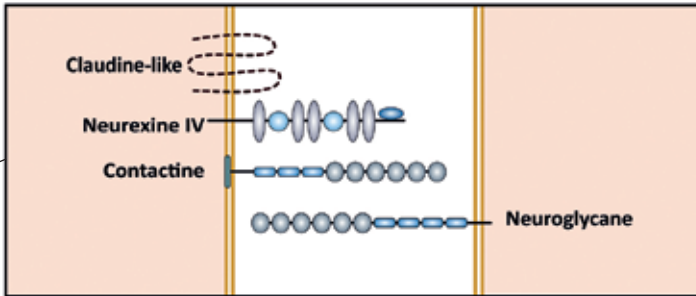
L'importance d'élargir le cadre comparatif

Lorsque l'on parcourt le peu de données bibliographiques disponible chez les animaux non-bilatériens et référencées dans [1] (cnidaires, placozoaires, cténophores et porifères (i.e. éponges ; **Figure 1**), force est de constater que, à l'exception des cnidaires, les caractéristiques épithéliales précédemment citées (polarité, lame basale et jonctions), ne sont pas toujours présentes et, de surcroît, pas de manière concomitante dans ces taxons ayant émergé précocement (**Figure 1**). Par exemple, la lame basale n'est pas observable chez le placozoaire *Trichoplax adherens*, chez certains cténophores comme *Mnemiopsis leidyi* ou également chez les éponges

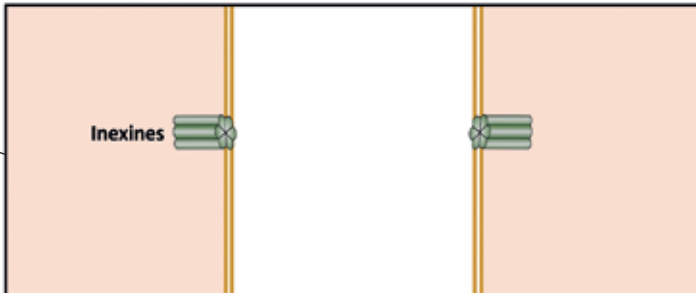
1: Jonctions adhérentes



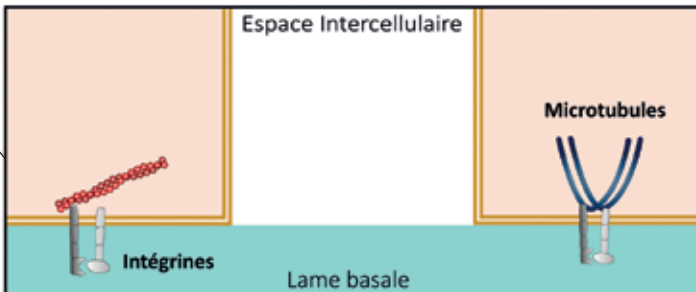
2: Jonctions serrées



3: Jonctions GAP



4: Adhésions focales



n'appartenant pas à la classe des homoscléromorphes. Cette absence de lame basale chez la plupart des éponges a d'ailleurs (et étrangement uniquement chez les éponges !) longtemps exclu les éponges des « vrais métazoaires » (eumétazoaires) supposés présenter de « vrais tissus ».

Au-delà de cet exemple, les caractéristiques épithéliales dans ces taxons sont de manière générale beaucoup plus contrastées et ne rentrent pas dans le schéma classique d'un « épithélium type » tel qu'il a été défini, bien que leur fonctionnalité ne puisse être mise en doute [6,9–11]. Il était donc urgent d'élargir le champ d'investigation aux non-bilatériens pour émettre des hypothèses évolutives pertinentes sur l'origine et l'évolution des épithéliums. La compilation des données bibliographiques, bien que parcellaires et contradictoires, a toutefois permis de dégager des caractéristiques épithéliales conservées à l'échelle des métazoaires et donc supposées héritées d'un ancêtre commun :

- 1) des cellules épithéliales polarisées,
- 2) une lame basale renfermant du collagène de type IV et, probablement,
- 3) des jonctions adhérentes, les autres types de jonctions n'étant pas ou très peu présentes dans les taxons situés basalement dans l'arbre des métazoaires (**Figure 1**).

Ce qui implique que les animaux actuels dépourvus de ces caractéristiques les ont perdues secondairement au cours de l'évolution. Cependant, il est indispensable d'étayer cette hypothèse par la caractérisation des mécanismes moléculaires qui concourent à la mise en place de ces structures dans ces différents taxons. En effet, des structures homologues, c'est-à-dire héritées d'un ancêtre commun, sont généralement mises en place par des mécanismes moléculaires également homologues reposant sur des gènes orthologues¹.

L'importance de dépasser l'aire de la génomique

Afin de caractériser les gènes codant pour les protéines clés impliquées dans la polarité, la lame basale et les jonctions adhérentes chez les bilatériens et les cnidaires (groupe nommé planulozoaires), nous étudions, depuis quelques années, les caractéristiques moléculaires épithéliales des éponges, qui constituent l'une des lignées située le plus basalement dans l'arbre des métazoaires (**Figure 1**) [12,13].

1. Gènes orthologues : gènes présents dans deux ou plusieurs espèces issus d'un événement de spéciation.

Nos résultats et les données acquises par d'autres équipes ont montré que tous les gènes codant pour les principales protéines structurales des épithéliums sont présents dans trois des quatre classes d'éponges (le gène codant pour le collagène de type IV est absent du génome des hexactinellides) et ce quelles que soient les caractéristiques histologiques observables dans les espèces étudiées (**Figure 1**) [14,15]. Par exemple, tous les gènes codant pour les protéines impliquées dans la mise en place et le maintien des jonctions adhérentes (cadhérines et caténines) ont été trouvés chez toutes les éponges étudiées bien que les hexactinellides et les démosponges ne présentent pas ce type de jonctions [1,16]. Il en est de même pour le gène codant pour le collagène de type IV qui a été retrouvé chez les éponges calcaires et les démosponges, chez le placozoaire *Trichoplax adherens* et chez certains cténophores comme *Mnemiopsis leidyi* qui ne possèdent pourtant pas de lame basale (**Figure 1**) [1,17]. Ces éléments interrogent donc sur la fonction de ces protéines en absence de la structure histologique correspondante ou sur leur fonctionnalité (capacité à interagir avec les autres protéines d'intérêt *in vivo*). Inversement, chez les cténophores, de nombreuses protéines impliquées dans la mise en place de la polarité cellulaire sont absentes (i.e. protéines du complexe CRUMBS et SCRIBBLE) malgré l'existence d'une polarité cellulaire [16]. Ceci suggère que cette dernière est sous le contrôle de mécanismes moléculaires différents dans ce taxon.

Plus globalement, cette non-congruence entre présence de gènes/protéines et structures morphologiques interpelle sur l'homologie des structures : est-ce que les mêmes mécanismes moléculaires sont impliqués dans la mise en place de structures considérées comme similaires ? Autrement dit est-ce que tout ce qui est appelé « jonction adhérente » ou « lame basale » est équivalent et est apparu une seule fois au cours de l'évolution (homologie) ?

NOTRE MODELE BIOLOGIQUE

Oscarella lobularis et ses propriétés épithéliales

Afin de répondre à ces questions fondamentales sur l'origine et l'évolution des caractéristiques épithéliales, nous développons depuis plusieurs années le modèle éponge *Oscarella lobularis* (homoscléromorphe) [18–20].

O. lobularis est l'espèce type du genre *Oscarella*. Il s'agit d'une espèce endémique de la mer Méditerranée que l'on trouve dans des eaux peu profondes entre 4 et 35 m sur les substrats durs ombragés, y compris à l'entrée des grottes sous-marines semi-obscurées et obscures. Comme la grande majorité des éponges, *O. lobularis* est un animal sessile filtreur. Le flux d'eau à l'intérieur de l'éponge est assuré par le battement des flagelles des choanocytes. Ces derniers s'organisent au sein de structures appelées chambres choanocytaires. L'eau pénètre dans l'éponge par des orifices inhalants (ostia) et chemine via des canaux inhalants vers les chambres choanocytaires où elle est filtrée. Les particules alimentaires sont piégées au niveau de la collerette de microvillosités des choanocytes et sont par la suite phagocytées. Enfin l'eau filtrée est acheminée par des canaux exhalants vers l'orifice de sortie d'eau (oscul) (**Figure 3**). Ce système de filtration est appelé système aquifère. Les choanocytes sont des cellules de forme conique, polarisées, jointives et reposent sur une lame basale. Cet épithélium interne constitue le choanoderme. L'épithélium de surface, le pinacoderme, est quant à lui constitué de cellules ciliées plus aplaties qui tapissent la surface de l'éponge ainsi que les canaux (**Figure 3**). Les cellules qui le constituent sont, comme les cellules du choanoderme, polarisées, jointives et reposent sur une lame basale renfermant du collagène de type IV. Ainsi, contrairement aux éponges des autres classes, *O. lobularis* possède des épithéliums répondant aux trois critères histologiques définis chez les bilatériens.

Cet article a pour objectif de reprendre les dernières avancées tant conceptuelles que techniques sur le modèle *O. lobularis* qui nous permettent maintenant d'avancer progressivement sur la compréhension de l'origine et l'évolution des épithéliums avec une attention plus particulière sur les jonctions adhérentes.

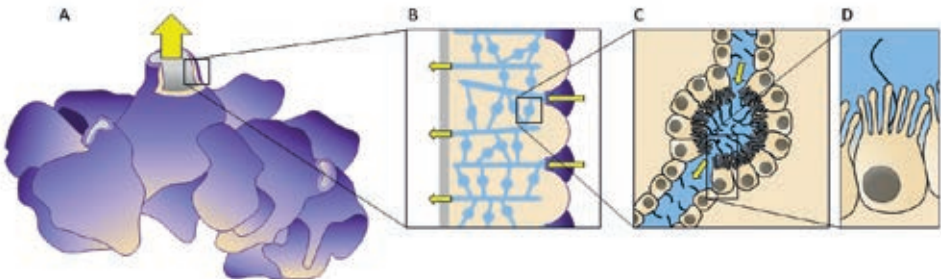


Figure 3 : A) Schéma simplifié d'un individu *Oscarella lobularis* adulte ; B) Schéma du système aquifère constitué de pores inhalants et exhalants, de canaux et de chambres choanocytaires (en bleu) ; C) Schéma d'une chambre choanocytaire formée de choanocytes présentant une collerette de microvillosités entourant un flagelle (D). Les flèches jaunes indiquent le sens de circulation de l'eau.

INVENTAIRE DES GENES CARACTERISTIQUES DES EPITHELIUMS ET ANALYSE DES DOMAINES PROTEIQUES CHEZ *O. LOBULARIS*

Chez les bilatériens, quatre protéines sont classiquement considérées comme étant les protéines clés impliquées dans les jonctions adhérentes (**Figure 2**). Brièvement, la protéine transmembranaire E-cadhérine interagit *via* ses deux domaines cytoplasmiques avec les protéines δ - et β -caténines. Cette dernière interagit quant à elle avec l' α -caténine afin de faire la liaison avec l'actine filamenteuse du cytosquelette. Ces quatre protéines constituent le complexe CCC (pour Complexe Cadhérine-Caténines) au sein duquel les domaines extracellulaires calcium dépendants de la E-cadhérine permettent l'adhérence entre deux cellules adjacentes [21,22].

Grâce à l'acquisition de divers transcriptomes et d'un draft de génome pour l'espèce *O. lobularis* [16,23,24], nous avons pu entreprendre la recherche, dans cette éponge, des gènes orthologues à ceux impliqués dans la constitution des épithéliums chez les bilatériens. Ainsi, grâce à l'avènement des techniques de séquençage haut débit, nous avons pu caractériser l'ensemble des gènes codant pour les protéines du complexe CCC dans le génome de notre modèle et plus largement chez un représentant de chaque classe d'éponge. Nous avons ensuite effectué une analyse des différents domaines impliqués dans les interactions entre ces protéines afin d'évaluer la potentielle conservation fonctionnelle des protéines identifiées. De manière inattendue, les protéines candidates trouvées chez les éponges étudiées présentent toutes l'intégralité des domaines fonctionnels nécessaires à leurs potentielles interactions bien que les jonctions adhérentes n'aient pas été observées dans les tissus de toutes ces éponges. Cependant, il a été montré que ces domaines sont mieux conservés chez *Oscarella lobularis* comparativement aux autres éponges [16]. Cette conservation peut-elle expliquer la présence de cette structure uniquement dans cette espèce et plus largement chez les homoscléromorphes ? L'analyse de ces protéines a également révélé que la partie extracellulaire de la E-cadhérine présentait une répétition de motifs EGF (epidermal growth factor), absente dans les E-cadhérines des bilatériens. Ceci suggère que d'autres types d'interactions protéine-protéine spécifiques des éponges pourraient exister bien qu'actuellement aucune hypothèse n'ait été avancée sur le rôle éventuel de ces domaines.

Cette approche « top-down » ne permet cependant pas de caractériser des protéines propres aux épithéliums d'*O. lobularis*. Ainsi nous avons également initié une approche « bottom-up » par séquençage en cellule unique qui permet de caractériser des gènes candidats sans aucune hypothèse *a priori*. Il est question ici d'obtenir un profil d'expression génique (transcriptome) spécifique pour chaque population de cellules chez notre modèle d'éponge. La comparaison des données entre populations cellulaires devrait permettre de mettre en avant des signatures moléculaires qui leur sont propres, avec l'idée que chaque signature est probablement reliée à une fonction ou une caractéristique particulière. Ainsi, bien que les types cellulaires aient traditionnellement été définis d'après le partage de caractères morphologiques et d'une fonction identifiée, cette approche nous permet aujourd'hui d'aborder les questions fondamentales de l'identité, l'homologie et l'évolution des types cellulaires en se basant sur le partage d'un ensemble de gènes régulateurs exprimés [25–27].

DIFFERENTS CONTEXTES MORPHOGENETIQUES POUR L'ETUDE DES EPITHELIUMS CHEZ *O. LOBULARIS*

Le processus de bourgeonnement

Les individus adultes de l'éponge *Oscarella lobularis* alternent entre une reproduction sexuée de juillet à septembre et une reproduction asexuée par bourgeonnement ou fragmentation le reste de l'année. Le bourgeonnement est un processus très intéressant d'un point de vue morphogénétique mais également technique car il permet d'engendrer rapidement (environ deux semaines) plusieurs centaines de clones à partir d'un fragment d'individu adulte. Ce processus naturel est maintenant maîtrisé en laboratoire tout au long de l'année, facilitant ainsi les différentes expérimentations entreprises [18,20,28]. Au cours du processus de bourgeonnement, la surface de l'éponge va drastiquement se modifier pour passer d'une structure très lisse à une structure en doigt de gant jusqu'au détachement de petites sphères que sont les bourgeons. Une fois émis dans le milieu, les bourgeons ont été suivis en conditions standardisées et quatre stades développementaux ont été définis (**Figure 4**). Au stade 1, juste après le détachement, le bourgeon ressemble à une petite sphère lisse. Quelques jours après, au stade 2, il commence à former des excroissances puis un oscule au stade 3. Enfin, quelques semaines

après son détachement, le bourgeon atteint le stade 4 ou juvénile qui correspond à une petite éponge fixée au substrat.

De manière intéressante, au-delà de ce processus morphogénétique plutôt atypique, le bourgeon présente des tissus, une organisation et un fonctionnement (filtration) comparables à ceux de l'adulte, quel que soit le stade de développement considéré. De plus, alors qu'il reste difficile de maintenir en aquarium les individus adultes, les bourgeons présentent l'avantage de pouvoir être maintenus vivants pendant plusieurs semaines, voire des mois en boîtes de Pétri, facilitant ainsi l'ensemble des études. La petite taille et la transparence des tissus facilitent l'observation des tissus fixés ou vivants ce qui constitue un atout non négligeable en microscopie. Il est désormais possible de s'affranchir de la réalisation de coupes histologiques en visualisant les marquages sur bourgeons entiers en microscopie à épifluorescence ou confocale. Dès lors, le bourgeon d'*O. lobularis* est devenu un système très avantageux pour nos études et est maintenant un incontournable au laboratoire pour le développement des divers projets.

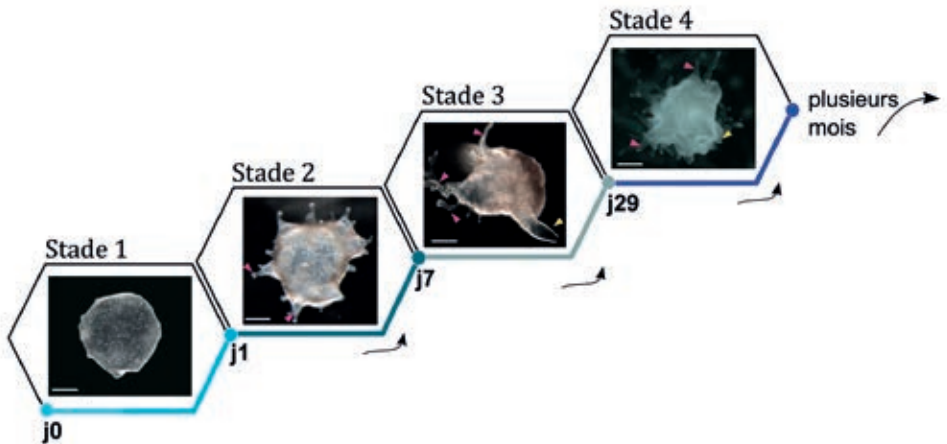


Figure 4 : Les différents stades du développement du bourgeon en conditions contrôlées. Les flèches roses indiquent les excroissances qui se forment dès le stade 2 et qui, au stade 4, permettent la fixation du juvénile au substrat. Les flèches jaunes indiquent la position de l'osclure, orifice de sortie d'eau. J= jours, la barre échelle correspond à 0.4 mm.

Dans le contexte de notre projet sur les épithéliums, bien que les protéines étudiées puissent *a priori* interagir *via* leurs domaines conservés (d'après les prédictions *in silico*), leur localisation dans les tissus pourrait limiter voire écarter une possible interaction. Afin de savoir où les protéines d'intérêt (e.g. caténines et E-cadhérine) se

localisent dans les tissus, nous réalisons des immunomarquages avec des anticorps spécifiquement dirigés contre les épitopes d'*O. lobularis* [18]. En effet, compte tenu de la divergence des protéines d'éponges par rapport à leurs homologues chez les autres métazoaires, nous avons fait synthétiser des anticorps spécifiques d'*O. lobularis*. La validation de ces anticorps et la localisation des protéines visées est en cours de progression sur les bourgeons.

Le processus de dissociation-réagrégation cellulaire

Les bourgeons d'*Oscarella lobularis*, comme l'adulte, sont dotés d'incroyables capacités de régénération et sont capables de se réagréger après une dissociation cellulaire totale ou partielle de l'individu.

En effet, lorsque les individus sont placés dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium, les cellules constitutives des épithéliums se dissocient spontanément les unes des autres [10,24]. De manière intéressante, ce processus est complètement réversible lors du retour en eau de mer naturelle. Cela fait écho avec ce que l'on connaît chez les mammifères et plus largement chez les bilatériens [24,29,30]. Chez ces derniers, une concentration en calcium extracellulaire faible entraîne une perte des contacts cellule-cellule et cellule-matrice et une déstructuration des épithéliums. En effet, les deux protéines transmembranaires que sont la E-cadhérine, impliquée dans la mise en place des jonctions adhérentes, et les intégrines, impliquées dans les jonctions cellule-matrice, sont calcium-dépendantes. Il a été montré qu'une déplétion en ions divalents dans le milieu entraînait un changement de conformation de ces protéines et une modification de leur interactome [30,31].

Cette propriété de dissociation/réagrégation cellulaire dépendante de la teneur en calcium et magnésium de l'eau de mer d'*O. lobularis* (et en général des éponges) suggère que les protéines impliquées dans les jonctions cellule-cellule et/ou cellule-matrice sont également calcium-dépendantes sans pour autant que ces protéines aient été identifiées.

Nous avons effectué des analyses des gènes différentiellement exprimés au cours de ce processus dynamique de dissociation/réagrégation cellulaire [24]. Dans ce contexte, des bourgeons ont été placés dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium et, avant la dissociation complète des tissus, remis dans de l'eau de mer naturelle. Au cours de ce processus nous avons pu identifier des étapes clés

du processus de déstructuration et restauration de l'épithélium interne (**Figure 5**). A 1h de dissociation nous avons observé un début de perte de la polarité apico-basale des choanocytes, une perte des contacts cellulaires ainsi qu'une désorganisation de la lame basale (**Figure 5B**). A 4h de dissociation, les chambres choanocytaires étaient complètement désorganisées avec notamment une perte de la lame basale comme attestée par la disparition du marquage immunohistochimique du collagène de type IV (**Figure 5C**). Dès 4h d'incubation dans de l'eau de mer naturelle, les chambres choanocytaires commençaient à retrouver leur morphologie initiale, les choanocytes réacquerraient une polarité apico-basale, les jonctions se reformaient ainsi que la lame basale. Toutefois, ce n'est qu'après 24h de réagrégation que les tissus retrouvaient leur aspect initial (**Figure 5D**). L'analyse par RNA-seq de l'expression des gènes codant pour les protéines clés orthologues à celles impliquées dans la mise en place et le maintien des épithéliums chez les planulozoaires au cours de ce processus de dissociation-réagrégation suggèrent une possible implication de ces protéines dans la mise en place et le maintien des épithéliums chez *Oscarella lobularis*. Par exemple, l'expression des gènes codant pour les protéines du complexe CCC diminuait au cours du processus de dissociation et réaugmentait au cours de la réagrégation (**Figure 5E**). Toutefois cette modulation d'expression n'est pas une preuve directe de l'implication des protéines correspondantes dans les jonctions chez *O. lobularis*, il reste à valider leur engagement par des techniques immunohistochimiques.

Les facteurs d'agrégation, protéoglycanes extracellulaires, sont également des candidats potentiels. Ils ont été identifiés comme des acteurs majeurs dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaires chez les éponges et les choanoflagellés (groupe d'unicellulaires le plus proche des métazoaires) via des récepteurs membranaires [24,32,33]. De manière intéressante, les gènes codant pour certains de ces facteurs d'agrégation chez *O. lobularis* présentaient un profil d'expression qui peut laisser envisager un rôle dans la mise en place et le maintien des épithéliums dans notre modèle. Cependant, la part respective de ces mécanismes d'adhérence et leur potentielle interaction au cours du processus de mise en place et de maintien des épithéliums reste à évaluer. Au-delà de ces recherches ciblées sur des gènes dont la fonction est déjà connue dans les épithéliums, les profils d'expression d'autres gènes suggèrent que la mise en place et le maintien des épithéliums dans cette espèce impliquent non seulement des gènes homologues conservés chez tous les animaux mais également des mécanismes spécifiques aux éponges qu'ils restent à définir.

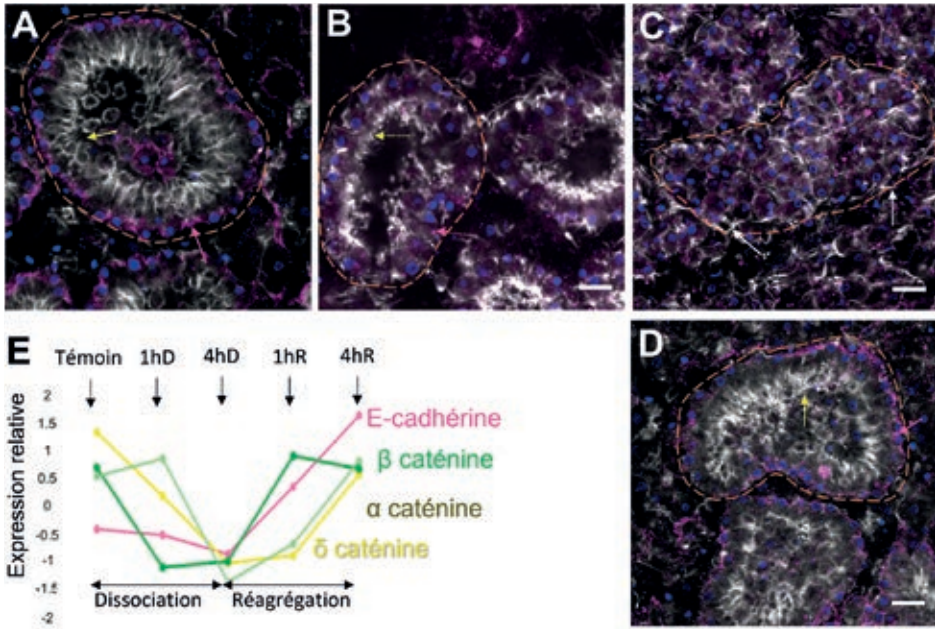


Figure 5 : Modification de l'expression des gènes codant pour les protéines orthologues à celles connues pour être impliquées dans la mise en place des jonctions adhérentes chez les planulozoaires au cours du processus de dissociation-réagrégation chez *Oscarella lobularis*. **A**) Echantillon témoin. Les chambres choanocytaires, entourées en pointillés orange, ont une structure arrondie, les choanocytes qui constituent ces chambres ont une polarité apico-basale bien marquée avec dans la partie apicale une collerette de microvillosités (flèches jaunes) et dont la partie basale repose sur une lame basale visible grâce au marquage immunohistochimique du collagène de type IV (flèches roses), protéine structurante majeure de ces structures. **B**) Echantillon après 1 heure d'incubation dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium (1hD). Bien que la chambre choanocytaire présente encore une structure arrondie, les caractéristiques épithéliales tendent à être perdues : réduction de la collerette de microvillosités des choanocytes (flèches jaunes pointillées), perte des contacts cellule-cellule et cellule-matrice ; désorganisation de la lame basale visible par une diminution du marquage collagène (flèches roses pointillées). **C**) Echantillon après 4 heures d'incubation dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium (4hD). A ce stade les chambres choanocytaires sont complètement déstructurées avec une perte totale des caractéristiques épithéliales : perte de la collerette de microvillosités, apparition de très nombreuses protrusions basales (flèches blanches), perte de la lame basale. **D**) Le processus de réagrégation cellulaire et de ré-épithétisation commence dès 1 heure d'incubation dans de l'eau naturelle mais ce n'est qu'après 24 heures d'incubation (24hR) que les chambres choanocytaires retrouvent leurs caractéristiques épithéliales. **E**) Expression relative des gènes du complexe CCC au cours du processus de dissociation-réagrégation aux différents temps de dissociation et réagrégation (1 heure de dissociation (1hD) ; 4 heures de dissociation (4hD) ; 1 heure de réagrégation (1hR) ; 4 heures de réagrégation (4hR)). La barre échelle représente 10 µm. Le collagène de type IV est marqué en rose, l'actine en blanc (phalloïdine), les noyaux en bleu (DAPI).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Défis techniques à relever pour la compréhension des épithéliums d'*O. lobularis*

A l'heure actuelle, les techniques d'inhibition génique ne sont malheureusement pas encore disponibles sur les éponges marines : c'est l'un des défis que nous essayons de relever. De ce fait, afin de tester la conservation des protéines impliquées dans la formation et le maintien des jonctions adhérentes chez *Oscarella lobularis*, nous devons développer des méthodes indirectes. Parmi celles-ci, nous avons précédemment évoqué le séquençage des ARN en cellules uniques qui devrait nous apporter des réponses concernant l'expression de gènes marqueurs des cellules épithéliales chez notre modèle. De même, nous avons initié la production et la validation d'anticorps dirigés contre les protéines homologues à celles engagées dans les jonctions chez les bilatériens. Les immunolocalisations des protéines correspondantes nous offrent d'ores et déjà des réponses plus qu'informatives sur le potentiel engagement de ces dernières dans les jonctions adhérentes et devraient rapidement faire l'objet d'une publication. L'enjeu est donc maintenant d'utiliser ces mêmes anticorps afin de mettre en évidence l'interactome de chacune des protéines d'intérêt par des techniques de co-immunoprécipitation et de séquençage par spectrométrie de masse. En effet, connaître précisément les protéines réellement capables d'interagir entre elles nous guidera vers une meilleure représentation de ce qui se passe au niveau des jonctions. Entre autres, cela nous permettra de valider l'existence du complexe CCC chez cette éponge ou, le cas échéant, d'émettre des hypothèses alternatives avec la mise en évidence de nouvelles protéines candidates pour ce rôle. Nos résultats préliminaires pourraient remettre en cause l'homologie des jonctions adhérentes d'*Oscarella* par rapport à celles des bilatériens mais nos résultats sont en cours de validation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les services communs sans qui la collecte des organismes et les expérimentations en cours ne seraient pas possibles : le service plongée de l'OSU Pythéas, les services communs de biologie moléculaire et de morphologie de l'IMBE. Nous remercions les financeurs de nos projets Spongex (fondation

A*MIDEX (n° ANR-11-IDEX-0001-02), JUNE (foundation A*MIDEX (ANR-16-CONV-0001), EvolAJ (ANR-21-CE13-0013-02). Nous remercions également nos tutelles, le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et l'Université Aix-Marseille (AMU) dont les crédits récurrents ont soutenu le développement du modèle et financé les contrats doctoraux d'Amélie Vernale et Cassandra de Pao Mendonca.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RENARD E. et al. Origin and Evolution of Epithelial Cell Types, edited by: Leys, S., & Hejnol, A. (Eds.). Origin and Evolution of Metazoan Cell Types (1st ed.). CRC Press., 2021:75–100. <https://doi.org/10.1201/b21831-5> <https://www.taylorfrancis.com/https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b21831-5/origin-evolution-epithelial-cell-types-emmanuelle-renard-andré-le-bivic-carole-borchiellini>
2. AKDIS C.A. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions?, *Nature Reviews Immunology*, 2021, **21**(11): 739–51. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00538-7>
3. SEKIGUCHI R. et al. Chapter Four - Basement Membranes in Development and Disease, In: *Current Topics in Developmental Biology: volume: 130*: Litscher ES et al., eds., volume130, edited by: Academic Press, 2018: **143**–91. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.005> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215318300371>
4. THIERY J.P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease, *Cell*, 2009, **139**(5): 871–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
5. BICH L. et al. Understanding Multicellularity: The Functional Organization of the Intercellular Space, *Frontiers in Physiology*, 2019, **10**:1170. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01170><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6759637/>
6. LEYS S.P. et al. Epithelia, an Evolutionary Novelty of Metazoans, *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2012, **318**(6): 438–47. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21442>
7. TYLER S. Epithelium - The Primary Building Block for Metazoan Complexity1, *Integrative and comparative biology*, 2003, **43**(1): 55–63.
8. BARCELONA-ESTAJE E. et al. You Talking to Me? Cadherin and Integrin Cross-talk in Biomaterial Design, *Advanced Healthcare Materials*, 2021, **10**(6): 2002048. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002048>

9. ADAMS E.D.M. et al. Freshwater Sponges Have Functional, Sealing Epithelia with High Transepithelial Resistance and Negative Transepithelial Potential, *PLoS ONE*, 2010, **5**(11): e15040.(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015040> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993944/>
10. LEYS S.P. et al. The Physiology and Molecular Biology of Sponge Tissues, In: *Advances in Marine Biology: volume: 62*, edited by: Elsevier, 2012: 1–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394283-8.00001-1> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123942838000011>
11. LEYS S.P. et al. Epithelia and integration in sponges, *Integrative and Comparative Biology*, 2009, **49**(2): 167–77. <https://doi.org/10.1093/icb/icp038>
12. REDMOND A.K. et al. Evidence for sponges as sister to all other animals from partitioned phylogenomics with mixture models and recoding, *Nature Communications*, 2021, **12**(1): 1783. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22074-7>
13. SCHULTZ D.T. et al. A chromosome-scale genome assembly and karyotype of the ctenophore *Hormiphora californensis*, *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2021, **11**(11): jkab302. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab302>
14. RENARD E. et al. Understanding Animal Evolution: The Added Value of Sponge Transcriptomics and Genomics, *BioEssays*, 2018, **40**(9):e1700237(9). <https://doi.org/10.1002/bies.201700237> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.201700237>
15. SANTINI S. et al. The compact genome of the sponge *Oopsacas minuta* (Hexactinellida) is lacking key metazoan core genes, 2022, Accessed date September 12, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.07.26.501511> <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03757223>
16. BELAHBIB H. et al. New genomic data and analyses challenge the traditional vision of animal epithelium evolution, *BMC Genomics*, 2018, **19**:393. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4715-9> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5968619/>
17. FIDLER A.L. et al. Collagen IV and basement membrane at the evolutionary dawn of metazoan tissues, *eLife*, 2017, **6**:e24176. <https://doi.org/10.7554/eLife.24176>
18. BORCHIPELLINI C. et al. Staining and Tracking Methods for Studying Sponge Cell Dynamics, In: *Developmental Biology of the Sea Urchin and Other Marine Invertebrates: Methods and Protocols: volume: Carroll DJ et al., eds.*, edited by: Springer US, 2021: 81–97. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0974-3_5
19. RENARD E. et al. The Homoscleromorph Sponge, *Oscarella lobularis*, In: *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: volume*, edited by: CRC Press, 2021.

20. ROCHER C. et al. The buds of *Oscarella lobularis* (Porifera): a new convenient model for sponge cell and developmental biology, *bioRxiv2020 Jun 23*; doi 10.1101/2020.06.23.167296. <https://doi.org/10.1101/2020.06.23.167296>
21. ARBORE C. et al. α -catenin switches between a slip and an asymmetric catch bond with F-actin to cooperatively regulate cell junction fluidity, *Nature Communications*, 2022, **13**(1): 1146. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28779-7>
22. VANSLEMBROUCK B. et al. Microscopic Visualization of Cell-Cell Adhesion Complexes at Micro and Nanoscale, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, **10**: 819534. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.819534>
23. SCHENKELAARS Q. Origine et évolution des voies Wnt chez les métazoaires : étude comparée de diverses espèces d'éponges., edited by: Aix-Marseille, 2015. <http://www.theses.fr/2015AIXM4014>
24. VERNALE A. et al. Evolution of mechanisms controlling epithelial morphogenesis across animals: new insights from dissociation-reaggregation experiments in the sponge *Oscarella lobularis*, *BMC ecology and evolution*, 2021, **21**(1): 160. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01866-x>
25. GRUENHAGEN G.W. et al. Single Cell RNA Sequencing Reveals Deep Homology of Dental Cell Types Across Vertebrates, *Frontiers in Dental Medicine*, 2022, **3**:845449. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fdmed.2022.845449>
26. TARASHANSKY A.J. et al. Mapping single-cell atlases throughout Metazoa unravels cell type evolution, *eLife*, 2021, **10**: e66747. <https://doi.org/10.7554/eLife.66747>
27. VERGARA H.M. et al. Whole-body integration of gene expression and single-cell morphology, *Cell*, 2021, **184**(18): 4819-4837.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.017>
28. FIERRO-CONSTAÍN L. et al. In Situ Hybridization Techniques in the Homoscleromorph Sponge *Oscarella lobularis*, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2021, **2219**: 181–94. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0974-3_11
29. BRODSKIY P.A. et al. Calcium as a signal integrator in developing epithelial tissues, *Physical biology*, 2018, **15**(5): 051001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aabb18>
30. D'SOUZA R.S. et al. Calcium-stimulated disassembly of focal adhesions mediated by an ORP3/IQSec1 complex, *bioRxiv2019 Dec 5*; doi 10.1101/866392. <https://doi.org/10.1101/866392>
31. GUO Z. et al. E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics, *Science signaling*, 2014, **7**(354): rs7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005473>

32. GRICE L.F. et al. Origin and Evolution of the Sponge Aggregation Factor Gene Family, *Molecular Biology and Evolution*, 2017, **34**(5): 1083–99. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx058>
33. LEITH A. Role of aggregation factor and cell type in sponge cell adhesion, *The Biological Bulletin*, 1979, **156**(2): 212–23. <https://doi.org/10.2307/1541044>