HAL
open science

Rôle de la voie de signalisation Insuline dans le couplage des informations nutritionnelles et développementales au cours de l'ovogenèse chez la drosophile

Patrick Jouandin

To cite this version:

Patrick Jouandin. Rôle de la voie de signalisation Insuline dans le couplage des informations nutritionnelles et développementales au cours de l'ovogenèse chez la drosophile. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4102 . tel-00932409

HAL Id: tel-00932409

https://theses.hal.science/tel-00932409

Submitted on 17 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Nice Sophia-Antipolis

Faculté des Sciences

Ecole Doctorale 85

Thèse de Doctorat

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Rôle de la voie de signalisation Insuline dans le couplage des informations nutritionnelles et développementales au cours de l'ovogenèse chez la drosophile

Présentée par

Patrick JOUANDIN

Soutenue le 6 décembre 2013

Muriel GRAMMONT	(Rapporteur)
Jean-René HUYNH	(Rapporteur)
Pierre LEOPOLD	(Président de Jury)
Stéphane NOSELLI	(Directeur de thèse)

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon Jury, Messieurs Huynh, Léopold et Madame Grammont d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie Stéphane NOSELLI de m'avoir accepté dans son équipe, de m'avoir permis de réaliser librement l'ensemble de ces travaux et d'avoir su me conseiller en poussant toujours plus loin nos discussions au cours de ma thèse.

Merci également à Christian GHIGLIONE, mon co-directeur officiel à deux ou trois formalités administratives près, qui aura eu la tâche ingrate de m'encadrer dans l'ombre au quotidien.

Je remercierai Delphine CEREZO, notre « Lab Manager » dont la vie sera bien plus simple après mon départ, pour son aide précieuse tous les après-midis.

Concernant l'ensemble des membres de l'équipe, et pour continuer sur ce ton très sobre, je dirai que je les remercie pour leurs discussions scientifiques de qualité, leurs conseils et leur bonne humeur.

Je remercierai au même titre tous les membres des équipes drosophilistes au sein de l'institut.

Merci à Nathalie, de me supporter tous les jours…

Enfin, je remercie ma famille de toujours m'avoir soutenu.

Abréviations

AKH :	Hormone Adipocinétique
AMH :	Hormone antimüllérienne
CB :	Cellule de la Bordure
CBe :	Cellule de la Bordure externe
CF :	Cellule Folliculaire
CP :	Cellule Polaire
DILPs :	*drosophila* Insulin-Like Peptides
FSC :	Cellule Souche Folliculaire
FSH :	Hormone Folliculostimulante
GH :	Hormone de croissance
GSC :	Cellule Souche Germinale
IGF :	Insulin-like-growth factor
IGFPB:	IGF Binding Protein
IIS :	Signalisation Insuline/IGF
IPCs :	Insulin Producing Cells
JH :	Hormone Juvénile
LCE :	Longue Extension Cellulaire
LH :	Hormone Lutéinisante
M/E :	Transition Mitose/Endocycle
NRE :	Elément de Réponse à Notch
PGC :	Cellule Germinale Primordiale
PMES :	Transition M/E en pause
PTTH :	Hormone Prothoracicotropique
SGP :	Précurseurs Somatiques de la Gonade

Avant-propos

Le développement d'un organisme multicellulaire fait appel à une large diversité de processus que l'on regroupe sous des termes généraux que sont la prolifération, la mort, la migration, la différenciation et la croissance des cellules. Ces mécanismes sont contrôlés par des signaux intrinsèques, prédéfinis par les programmes génétiques propres à chaque espèce. Le développement repose sur une succession d'étapes dont chacune dépend de - et est engendrée par - la précédente, ce à partir de la fusion des gamètes lors de la fécondation. Orchestrés de cette manière, l'ensemble de ces mécanismes cellulaires permet de générer des individus correctement formés suivant des proportions harmonieuses. Cependant, le développement est également sensible à des signaux de nature extrinsèque, et donc variables. De cette manière, la densité de population, la température, l'oxygène ou la nutrition sont autant de paramètres auxquels doivent s'adapter les organismes afin de maintenir une coordination des mécanismes mis en jeu et assurer leur homéostasie.

Dans cette étude, je discuterai de l'influence des contraintes nutritionnelles sur l'ovogenèse chez *Drosophila melanogaster*, ainsi que des mécanismes mis en place afin de pallier aux dommages inhérents à ces fluctuations environnementales. La puissance des outils génétiques développés chez ce diptère permet en effet de comprendre en détails de nombreux processus biologiques généraux. Un taux de génération élevé, un court cycle de vie ainsi qu'une faible redondance génique facilitent amplement leur description, et la plupart restent bien conservés jusqu'aux mammifères.

Afin de mieux comprendre les particularités de l'ovogenèse vis-à-vis de la croissance, je donnerai, en introduction de mes travaux, une rapide vision d'ensemble des mécanismes généraux de ce processus ainsi que de son contrôle. Dans le but de replacer l'ovogenèse chez la drosophile par rapport à nos connaissances chez les mammifères, les deux modèles

seront présentés en parallèle. Par la suite, je décrirai les résultats de mon étude, qui ont permis de mettre en évidence deux mécanismes participant à l'intégrité de l'ovogenèse en dépit des contraintes nutritionnelles. Le premier permettant d'adapter croissance et développement des follicules ovariens, le second permettant de coordonner un processus migratoire intra-folliculaire avec le développement des follicules. La contribution de mes travaux sera enfin discutée de manière à replacer ces événements dans le contexte global de l'ovogénèse chez la drosophile. J'envisagerai également cette étude en termes de principes potentiellement conservés au cours de l'évolution, dans le but d'élargir la manière de percevoir les relations entre ovogenèse et nutrition.

Table des matières

Introduction 8
Croissance des organismes 9
Croissance et taille finale 9
Croissance tissulaire et nutrition 12
La signalisation Insuline/Insulin-like-growth factor (IIS) 13
IIS et croissance chez les mammifères 15
IIS et croissance chez la drosophile 16
Récepteurs et transduction du signal 19
Les facteurs de transcription FoxO 23
Conclusion 26
Ovogenèse 27
Introduction 27
L'ovogenèse chez les mammifères 27
Nutrition, IIS et ovogenèse chez les mammifères 35
L'ovogenèse chez la drosophile 39
Nutrition, IIS et ovogenèse chez la drosophile 48
Transition mitose/endocycle des cellules folliculaires 53
Endocycle 53
La voie de signalisation Notch 56
Signalisation Notch et transition mitose/ endocycle 58
La migration des Cellules de la Bordure 62
Introduction 62
Spécification des Cellules de la Bordure 63
Migration des Cellules de la Bordure 67
Stéroïdes et déclenchement de la migration 70
Résultats 74
Rôle de la signalisation Insuline lors de la transition mitose/ endocycle 75
Introduction 75
Article 1 77
Résultats complémentaires et discussion 117

Rôle de la signalisation Insuline lors de migration des Cellules de la Bordure 128
Introduction..... 128
Article 2 130
Discussion 163
Discussion générale 166
Ovogenèse : croissance des follicules et sélection..... 167
Les apports du modèle drosophile 168
Transition mitose/endocycle et sélection des follicules ovariens..... 170
Transition mitose/endocycle, atrésie et facteurs de survie 171
Dominance des follicules ovariens 172
Ovogenèse et longévité..... 176
Conclusion 178
Bibliographie..... 179
Annexes 197
Annexe 1..... 198
Annexe 2..... 209
Résumés 226

Introduction

Croissance des organismes

Croissance et taille finale

La croissance d'un organisme définit sa taille finale, qui influe sur l'écologie des individus en termes de santé, prédation ou compétition. Différentes stratégies sont utilisées selon les espèces. Certaines croissent tout au long de leur vie. A l'inverse, la croissance de la majorité des organismes supérieurs est principalement restreinte aux phases juvéniles du développement et s'achève après maturation sexuelle. La vitesse de croissance durant ces phases et leur durée définissent ainsi la taille finale des individus. C'est également le cas des insectes holométaboles, dont fait partie la drosophile. Chez ces insectes, les œufs donnent naissance à des larves, qui muent deux fois après éclosion. Par la suite, elles s'encapsulent dans une pupe où a lieu la métamorphose, après laquelle les adultes émergent (Figure 1). Cette espèce subit une forte période de croissance (x150) durant les stades larvaires, qui prend fin lors de la métamorphose. La taille de la larve avant pupaison définit donc la taille finale de l'organisme. Vitesse et durée de la période de croissance des organismes supérieurs sont contrôlées par des hormones.

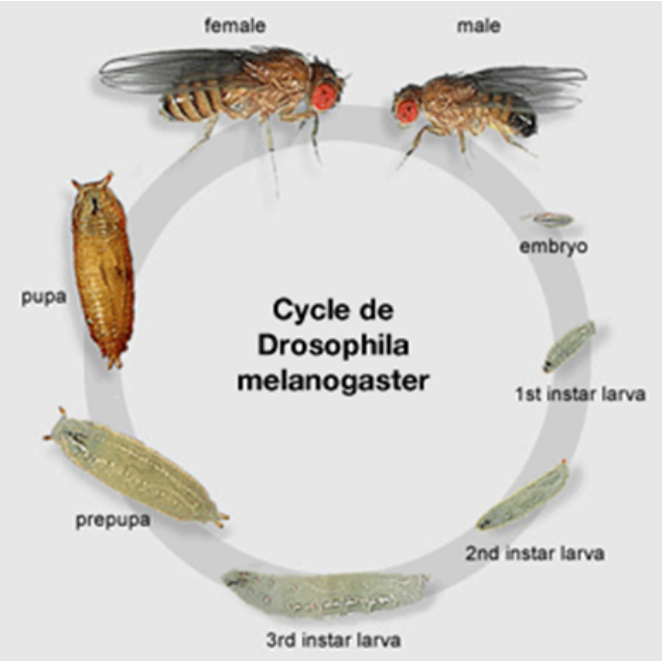
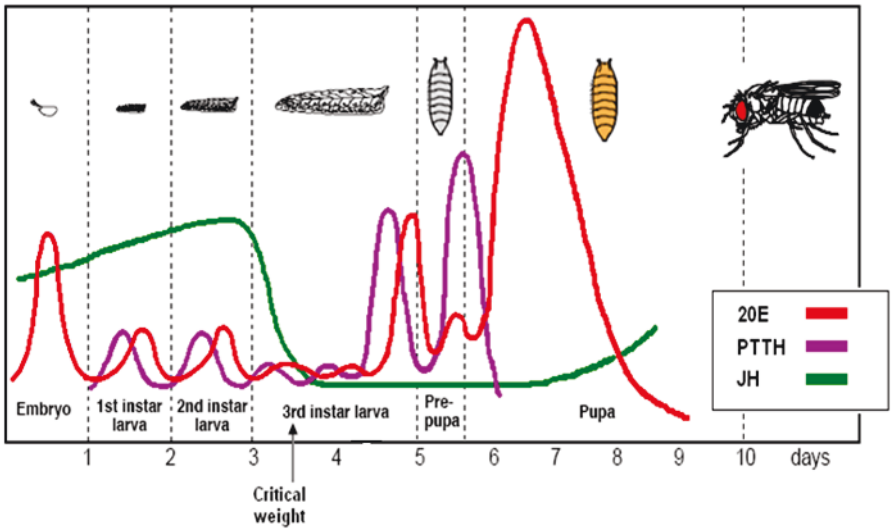


Figure 1 : Cycle de vie de *Drosophila melanogaster*. Le temps de génération d'un adulte est de 13 jours à 25°.

Chez la drosophile, trois circuits endocriniens principaux sont mis en jeu : les DILPs (*Drosophila* Insulin-Like Peptides) qui sont des peptides homologues de l'insuline, l'hormone prothoracicotropique (PTTH) et l'hormone stéroïde ecdysone (20-hydroxyecdysone). Les DILPs et la PTTH sont produits et sécrétés par des neurones présents dans le cerveau, respectivement les IPCs (Insulin Producing Cells) et les « neurones PTTH ». L'ecdysone est sécrétée par une glande endocrine tripartite connectée au cerveau par les projections axonales : la glande en anneau. Elle est composée par la *corpora cardiaca*, la *corpora allata*, qui sécrète l'Hormone Juvénile (JH ; voir ci-après), et enfin la glande prothoracique qui sécrète l'ecdysone (Siegmund and Korge, 2001). Les DILPs contrôlent la vitesse de croissance des tissus (Brogiolo et al., 2001). Quand la larve atteint une taille suffisante, un signal encore inconnu, probablement lié à l'état de croissance des tissus, induit la production de PTTH qui à son tour induit un pic de sécrétion d'ecdysone et la formation de la pupe (Riddiford, 1993). Le pic d'ecdysone contrôle ainsi la durée de la période de croissance. Les études menées chez la drosophile montrent que les composantes de vitesse et durée de croissance sont liées. En effet, plus la croissance est forte, plus la période de croissance est courte et inversement. Les ajustements entre ces paramètres, dépendamment des conditions environnementales comme la nutrition, ont lieu durant la « période de croissance terminale de la larve », juste avant pupaison (Layalle et al., 2008). Cependant, la sécrétion basale d'ecdysone est dépendante des DILPs, et réprime en retour la croissance des tissus périphériques (Colombani et al., 2005; Delanoue et al., 2010). Ce mécanisme suggère qu'une croissance trop forte serait délétère au développement de l'organisme. Par ailleurs, dans des conditions pathologiques où la croissance des tissus périphériques n'est plus coordonnée, ces derniers sécrètent DILP8, un inhibiteur de croissance qui bloque la sécrétion d'ecdysone, permettant aux tissus endommagés de rattraper leur retard (Colombani et al., 2012). La mutation de *dilp8* empêche la coordination de la croissance des tissus périphériques, et conduit à une forte augmentation de l'asymétrie fluctuante (Garelli et al., 2012). L'ensemble de ces mécanismes contrôle les tailles et proportions des organismes, qui doivent rester en adéquation avec leur milieu.

A



B

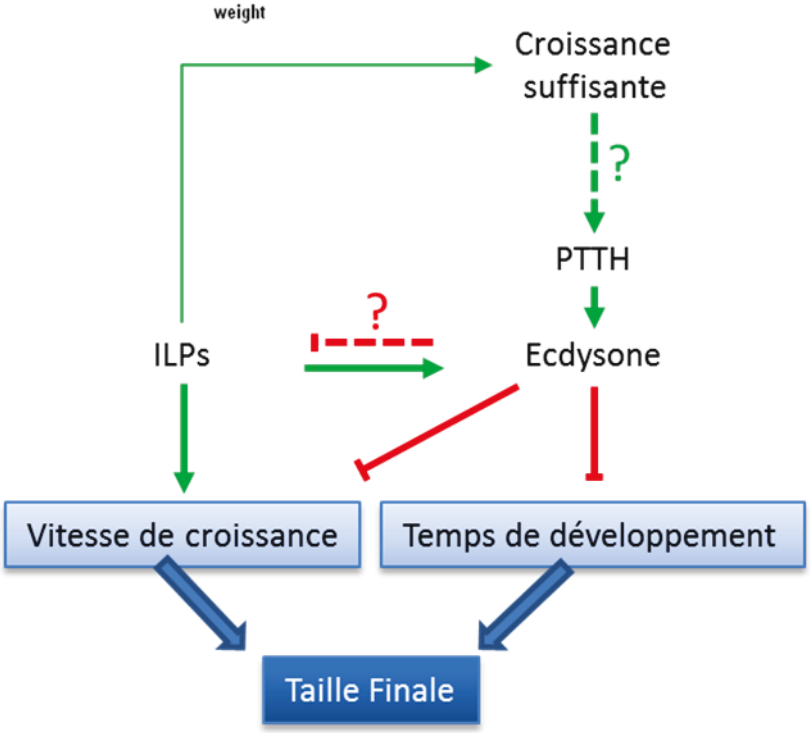


Figure 2 : Régulation de la taille finale chez la drosophile. A) Schématisation des différents pics hormonaux régulant le temps de développement de la drosophile. Des pics de sécrétion de faible amplitude de PTTH et d'ecdysone (20E) régulent les transitions larvaires. Passé un poids critique, la JH n'est plus sécrétée (bien que son rôle soit inconnu dans ce contexte) et un pic de sécrétion de haute amplitude de PTTH et d'ecdysone induit la pupaison. B) Interaction inter-hormones dans le contrôle de la taille finale. Trois hormones principales régulent la taille finale de la drosophile. Dépendamment de la vitesse de croissance, les pics de sécrétion de PTTH et d'ecdysone induisent la formation de la pupe, terminant ainsi la période de croissance. PTTH : hormone prothoracicotropique, ILPs : Insulin-Like Peptides. (D'après (Edgar, 2006; Riddiford, 1993))

Croissance tissulaire et nutrition

La taille des individus dépend de la croissance orchestrée des tissus qui les composent. Cette dernière résulte du nombre de cellules ainsi que de leur taille au sein de chaque tissu (Su and O'Farrell, 1998). La prolifération cellulaire et l'apoptose régulent la quantité de cellules. Leur taille dépend de la croissance cellulaire, reposant sur la capacité des cellules à accéder aux nutriments ainsi que leur environnement en facteurs de croissance. Les nutriments peuvent être mobilisés à partir de stocks internes, mais l'apport en nourriture en est la source principale. La nutrition affecte à la fois croissance, prolifération et mort cellulaire. Elle a donc pour effet de promouvoir la croissance des tissus. Les types d'aliments ou encore les ressources nutritives sont variables aux cours du développement, et les organismes doivent donc intégrer ces fluctuations environnementales à leurs programmes de croissance intrinsèques. La composante extrinsèque de croissance est traduite par des signaux paracrines et endocrines, relayés au sein des tissus par des programmes génétiques définissant les tailles et proportions relatives à atteindre. En fonction des conditions environnementales, un découplage des taux de croissance imposés par les régulations intrinsèques et extrinsèques est donc susceptible de se mettre en place. En cas d'abondance en nutriments, la croissance des tissus est limitée par la régulation intrinsèque, tandis qu'en cas de carence nutritionnelle, elle est limitée par l'environnement. Les organismes ont donc développé des mécanismes adaptatifs afin de coordonner leurs programmes de croissance, inter et intra-tissulaires, avec les conditions nutritionnelles.

La signalisation Insuline/Insulin-like-growth factor (IIS)

Les organismes doivent réguler la croissance des tissus au sein d'un organe et coordonner la croissance des organes entre eux, ce en intégrant les paramètres nutritionnels. La voie de signalisation des Insuline/Insulin-like-growth factor-(IGF) (IIS) permet le couplage entre croissance et nutrition. Chez les métazoaires, cette régulation hormonale est impliquée dans une large diversité de processus comme le temps de développement, la taille des organismes, le métabolisme, la réponse au stress, la reproduction, ou la longévité. Bien que les sources endocrines diffèrent entre mammifères et drosophile, la voie IIS est remarquablement bien conservée structurellement et fonctionnellement. Les insulines/ IGFs traduisent l'état nutritionnel de l'organisme en un signal anabolique de stockage d'énergie et de croissance.

Chez les mammifères comme chez la drosophile, l'insuline ou les DILPs (*Drosophila* insulin-like-peptides) induisent l'import de glucose, d'acides gras et d'acides aminés par les cellules (Figure 3). Certains tissus sont spécialisés dans le stockage à long terme de ces réserves, qui peuvent être remobilisées en cas de carence nutritionnelle. Chez les mammifères, le tissu adipeux stocke les acides gras sous forme de triacylglycérol. Les muscles squelettiques, le tissu adipeux et le foie stockent le glucose sous forme de glycogène. Chez la drosophile, les oenocytes et le corps gras, analogue du foie et du tissu adipeux des mammifères, accumulent à la fois triacylglycérol et glycogène. Le glycogène est également stocké par les muscles. D'autres hormones, l'AKH (adipokinetic hormone) chez la drosophile, ou le glucagon chez les mammifères, portent des fonctions opposées à celles d'IIS et régulent l'utilisation des ressources énergétiques en période de manque. L'effet métabolique de la voie IIS ne sera cependant pas décrit plus en détails mais je discuterai de ses fonctions de croissance.

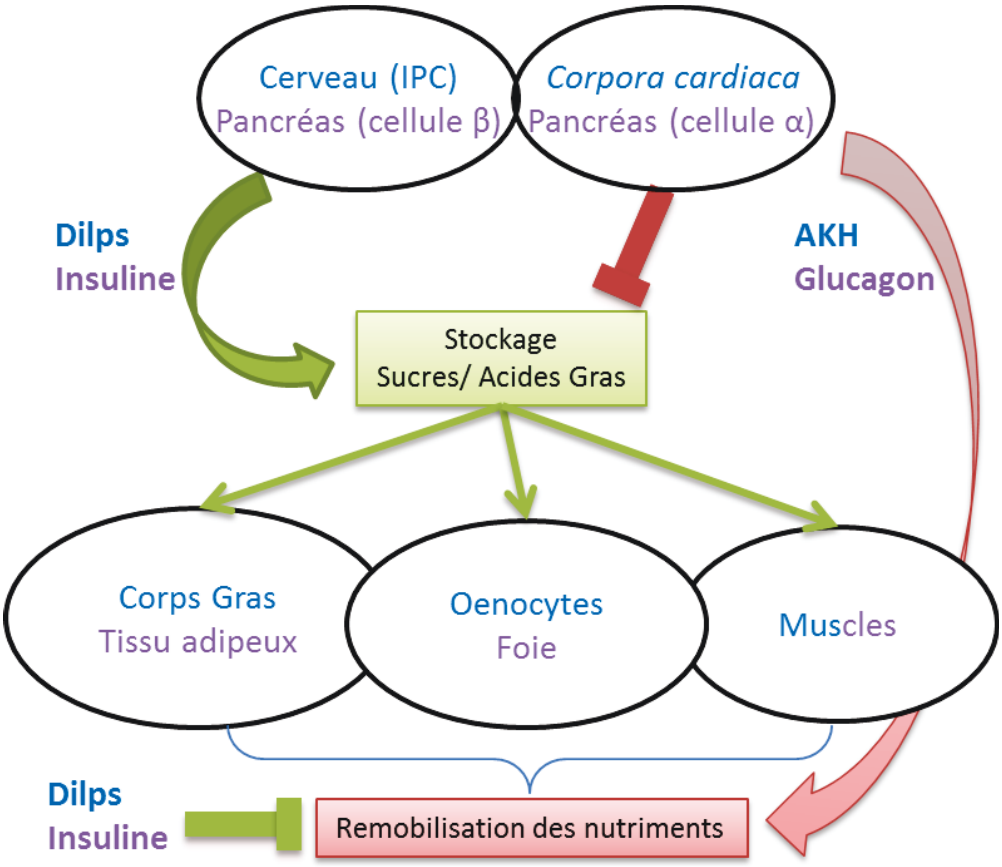


Figure 3 : Equivalence fonctionnelle des organes régulant l'homéostasie du sucre et des acides gras chez la drosophile et chez les mammifères. En bleu sont représentés les tissus de la drosophile. Leurs équivalents chez les mammifères sont en violet. Les Insuline et DILPs induisent le stockage des nutriments et le blocage de leur remobilisation en période d'abondance (en vert). L'AKH et le glucagon induisent leur remobilisation et l'inhibition de leur stockage en conditions de carence (en rouge). (D'après (Schlegel and Stainier, 2007)).

Chez les mammifères comme chez la drosophile, IIS contrôle la croissance de manière systémique. La présence de nutriments induit la sécrétion d'insuline/IGFs/DILPs par des cellules spécialisées. En se fixant sur leurs récepteurs présents de manière ubiquitaire au sein des tissus périphériques, ces hormones activent la cascade de signalisation IIS pour induire croissance, prolifération et survie des cellules. Certains tissus peuvent exprimer leurs propres insuline/IGFs/DILPs, qui agissent alors de manière paracrine ou autocrine, afin de potentialiser leur croissance en relayant l'effet humoral de ces hormones. A l'inverse, en condition de carence en nutriments, la sécrétion des insuline/IGFs/DILPs est limitée et la croissance est ralentie (Butler and Le Roith, 2001; Geminard et al., 2009). IIS interagit avec la

voie de signalisation TOR (Target Of Rapamycin), un senseur nutritionnel autonome cellulaire qui régule la croissance notamment en contrôlant la traduction protéique (Hietakangas and Cohen, 2009). Afin d'uniformiser la réponse à l'insuline au sein des tissus, certains organes sont spécialisés pour évaluer l'état nutritionnel des organismes et adapter en fonction la sécrétion humorale des IGFs/DILPs. J'en discuterai dans les paragraphes suivants.

IIS et croissance chez les mammifères

Chez les mammifères, les fonctions métaboliques et de croissance de la voie IIS sont réparties en deux systèmes complémentaires qui interagissent. Tandis que l'insuline, sécrétée par les cellules β -pancréatiques, régule le métabolisme du glucose et des acides gras, les IGFs (IGF-1 et IGF-2) portent la fonction de croissance primaire. Si deux IGFs uniquement sont majoritairement responsables du contrôle de ce processus majeur, c'est que leur effet est largement diversifié par des protéines extracellulaires, les IGFBP 1 à 6 (IGF-Binding Protein) et ALS (Acid Labil Subunit). Elles forment un complexe avec les IGFs suivant une affinité au moins égale à celle des récepteurs aux ILPs. Les IGFBPs activent ou inhibent l'action des IGFs sur leurs cellules cibles en modifiant leur stabilité, leur transport, leur adressage, leur distribution et l'interaction avec leurs récepteurs (Baxter, 2000).

La croissance primaire des mammifères repose principalement sur l'axe hormone de croissance (GH)/ IGF1. En fonction de l'état nutritionnel et énergétique des organismes, la sécrétion de GH par la glande pituitaire active la transcription d'IGF-1 dans le foie. La sécrétion hépatique d'IGF-1 relaie la fonction de croissance de la GH au niveau des tissus périphériques (Figure 4). La majorité de ces tissus expriment également IGF-1 indépendamment de la GH mais en fonction de l'état nutritionnel, activant IIS de manière paracrine ou autocrine. La GH et IGF-1 peuvent agir indépendamment ou de concert. Par ailleurs, ces hormones sont requises de manière différentielle selon les périodes croissance : IGF-1 agit pendant les périodes pré et post natale, tandis que la GH régule la croissance post natale exclusivement (Butler and Le Roith, 2001).

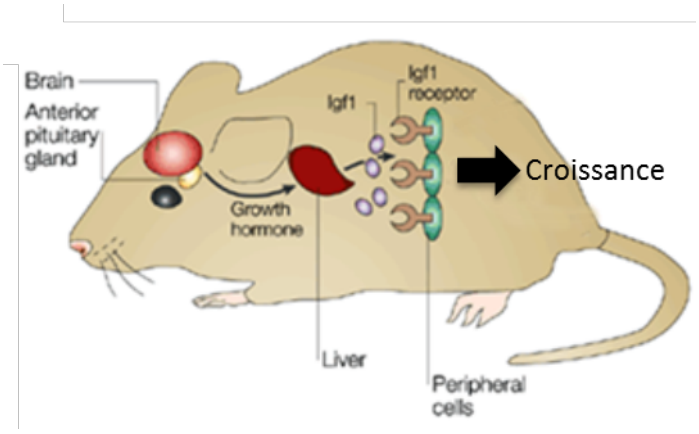


Figure 4 : Régulation de la croissance par l'axe GH/ IGF-1 chez la souris.

(D'après Partridge and Gems ; 2002)

L'IGF-2 est exprimé de manière ubiquitaire et semble également être contrôlé par la nutrition, au moins au niveau de la biogenèse du peptide, quoique cette régulation puisse être dépendante de l'âge (Espelund et al., 2005; Oldham et al., 1999). La prévalence d'IGF-1 ou d'IGF-2 en fonction des périodes de croissance est variable selon les espèces. Les deux peptides sont utilisés tout le long du développement des humains tandis que l'IGF-2 semble principalement requis pour la croissance embryonnaire de la souris (Nakae et al., 2001).

IIS et croissance chez la drosophile

Rendue possible par la puissance des outils génétiques développés chez la drosophile, l'étude de la fonction de la voie IIS ces dix dernières années a révélé nombre de similitudes et différences avec le modèle mammifère, nous donnant cependant une vision plus globale du processus de croissance. Chez la drosophile, parmi 8 peptides de type insuline appelés DILPs (*Drosophila* Insulin-like-peptides), 7 sont capables d'activer la voie IIS (Brogiolo et al., 2001; Colombani et al., 2012) (Figure 5). A l'exception de DILP6 qui ne régule pas le métabolisme du glucose ou des acides gras (Slaidina et al., 2009), ces DILPs 1-5, 7 portent à la fois les fonctions métaboliques de l'insuline et les fonctions de croissance des IGFs.

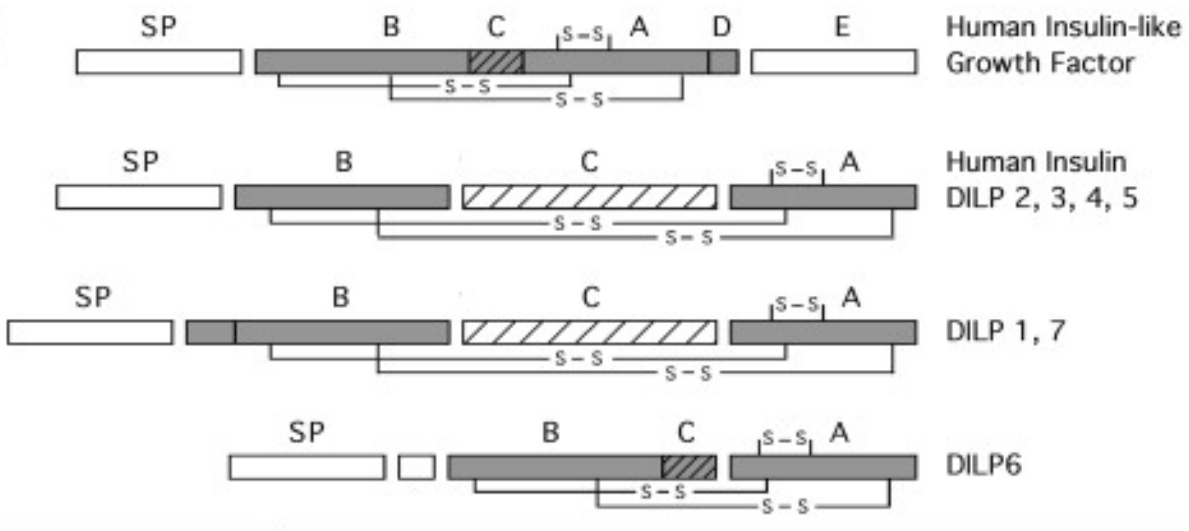


Figure 5 : Structures comparées des DILPs 1-7 avec les Insuline/ IGFs humains. Les différents domaines protéiques conservés sont représentés par des lettres. Leur espacement représente les sites de clivage protéolytiques lors de la biogenèse des peptides. Les peptides actifs sont représentés par les encadrés noirs. Les DILPs 1-5 et 7 ont une structure commune à l'insuline. Seul Dilp6 possède une structure similaire aux IGFs. (D'après (Brogiolo et al., 2001)).

Les DILPs 1, 2, 3 et 5 sont majoritairement sécrétés par deux clusters symétriques de neurones, les IPCs (Insulin Producing Cells), présents dans chaque hémisphère du cerveau (Ikeya et al., 2002). DILP7 est exprimé spécifiquement dans des neurones qui innervent l'appareil reproducteur de la femelle, mais ne semble pas porter de fonction de croissance spécifique, ni de reproduction (Gronke et al., 2010; Miguel-Aliaga et al., 2008; Yang et al., 2008). DILP6, dont la structure est proche de celle des IGFs, est exprimé principalement dans le corps gras, équivalent du foie chez les mammifères. Il est donc tentant d'envisager une homologie de fonction entre DILP6 et IGF-1. De manière surprenante, DILP6 promeut la croissance au même titre qu'IGF-1, mais en condition de carence, à l'inverse de ce dernier (Slaidina et al., 2009). DILP5 et 6 sont également exprimés dans les ovaires (Gronke et al., 2010; Ikeya et al., 2002). Au moins certains DILPs sont régulés par des protéines homologues des IGFBP et ALS (ImpL2 et dALS) (Arquier et al., 2008; Honegger et al., 2008).

Chez la drosophile, le corps gras sert de senseur de l'état nutritionnel de l'organisme. La voie de signalisation TOR y est cruciale, renseignant les cellules sur la quantité d'acides aminés circulants, majoritairement en provenance de l'intestin (Colombani et al., 2003). Suite à l'activation de la voie TOR en réponse aux acides aminés, un signal encore inconnu est envoyé dans la circulation (hémolymphe) et perçu par les IPCs (Geminard et al., 2009). Ces neurones agissent en tant que régulateurs centraux de la croissance des tissus périphériques *via* la sécrétion de DILPs (Figure 6). La plupart des tissus expriment également des DILPs, relayant ainsi l'effet systémique des IPCs. Selon les types d'aliments ingérés, d'autres signaux en provenance du corps gras contrôlent la sécrétion de DILPs par les IPCs, comme la cytokine Unpaired 2, sensible aux lipides ou aux sucres (Rajan and Perrimon, 2012). Le mécanisme sous-jacent de l'arrêt de la sécrétion de DILPs en condition de carence reste inconnu.

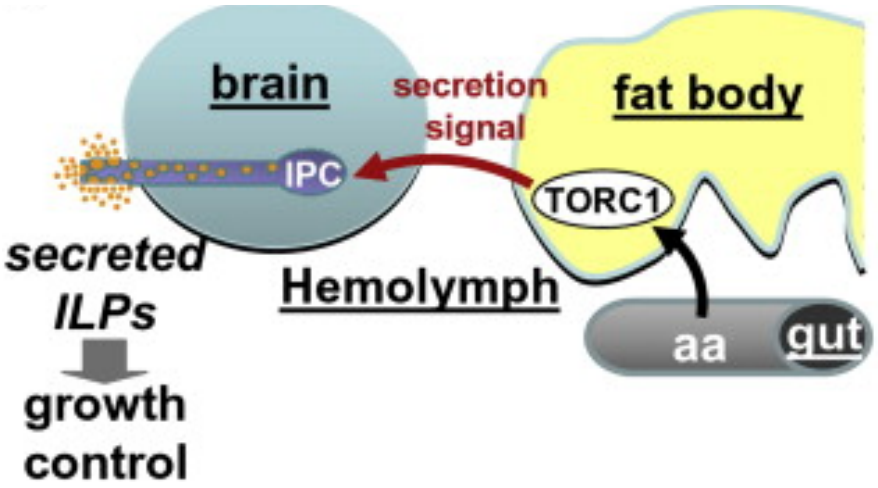


Figure 6 : Modèle de régulation de la sécrétion d'ILPs par les IPCs en fonction de l'état nutritif du corps gras. Les acides aminés en provenance de l'intestin activent le complexe TOR 1 (TORC1) dans le corps gras. Un signal positif retour est envoyé aux IPCs qui sécrètent alors les ILPs. (D'après (Geminard et al., 2009))

Au sein des IPCs, les DILPs peuvent être régulés d'une part au niveau de l'expression de leurs gènes. C'est le cas des *dilps 1*, *3* et *5*, dont la transcription est dépendante de la nutrition. D'autre part, ils peuvent être régulés directement au niveau de leur sécrétion, autorisant ainsi une régulation fine et rapide de la réponse à la nutrition. C'est le cas de DILP2, dont la sécrétion est rapidement bloquée dans les IPCs en carence, entrainant ainsi une accumulation de la protéine (Geminard et al., 2009).

Les DILPs ont des fonctions redondantes, et ils promeuvent tous la croissance s'ils sont surexprimés de manière ubiquitaire et constitutive (Gronke et al., 2010; Ikeya et al., 2002). Cependant, leurs différents profils d'expression selon les conditions nutritionnelles, les organes, les périodes de croissance larvaires ou chez l'adulte, suggèrent qu'ils portent des fonctions spécifiques. Par exemple, DILP6 contrôle la prolifération des neuroblastes chez la larve (Chell and Brand, 2010). Cependant, les rôles respectifs de chaque DILP restent encore indéterminés. Il est possible qu'ils agissent de concert pour potentialiser leur effet, étant donné qu'ils activent tous un même récepteur et une même cascade de signalisation.

Récepteurs et transduction du signal

IIS régule la croissance systémique des organes en activant croissance, prolifération et survie de manière autonome cellulaire suite à l'activation de voies de signalisation intracellulaires par leurs récepteurs. Les récepteurs Insuline/IGFs/ILPs font partie de la famille des Récepteurs Tyrosine Kinase. Ils sont présents sous forme de tétramères, constitués par des hétérodimères de chaines α et β. Les ligands se fixent sur les sous-unités α, et libèrent l'activité kinase des sous-unités β. La trans-phosphorylation des chaines β induit un changement de conformation, activant ainsi le récepteur (Patti and Kahn, 1998)).

Des protéines adaptatrices, substrats spécifiques des récepteurs aux ILPs (Insulin Receptor Substrate-IRS), permettent d'activer la voie de signalisation de la phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K) en aval (Figure 7). Ils fixent les protéines présentant un domaine SH (Src-homology). La PI3K interagit avec les IRS par l'intermédiaire de ses sous-unités régulatrices. Ainsi recrutée à la membrane, la sous-unité catalytique de la PI3K induit la

phosphorylation de divers substrats. Plus particulièrement, la PI3K phosphoryle le phosphatidyl inositol-(4, 5)-phosphate (PIP2) en position 3 pour générer le second messager phosphatidyl inositol-(3, 4, 5)-phosphate (PIP3). Des phosphatases comme PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN) ou SHIP2 (Src Homology 2 Inositol Phosphatase) sont antagonistes de la fonction de la PI3K en régénérant du PIP2 à partir du PIP3.

Le PIP3 fixe des molécules contenant un domaine PH (pleckstrin-homology), altérant ainsi leur activité ou leur localisation subcellulaire. En particulier, le PIP3 active PDK1 (phosphoinositide-dependent-Kinase 1), et recrute la kinase AKT/PKB à la membrane. PDK1 phosphoryle et active ainsi AKT.

Parmi les nombreux substrats d'AKT impliqués dans la croissance et le métabolisme, on retrouve TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Complex 1 and 2), un régulateur négatif de la kinase TOR (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002). En inhibant TSC1/2, AKT active TOR permettant ainsi une intercommunication entre ces deux voies de signalisation régulant la croissance. Si AKT contrôle la traduction protéique *via* TOR, il régule également l'activité des facteurs de transcription de type FoxO (Forkhead Box transcription factor sub-class O) (Uhlenhaut and Treier, 2011), ce qui sera discuté dans un paragraphe suivant.

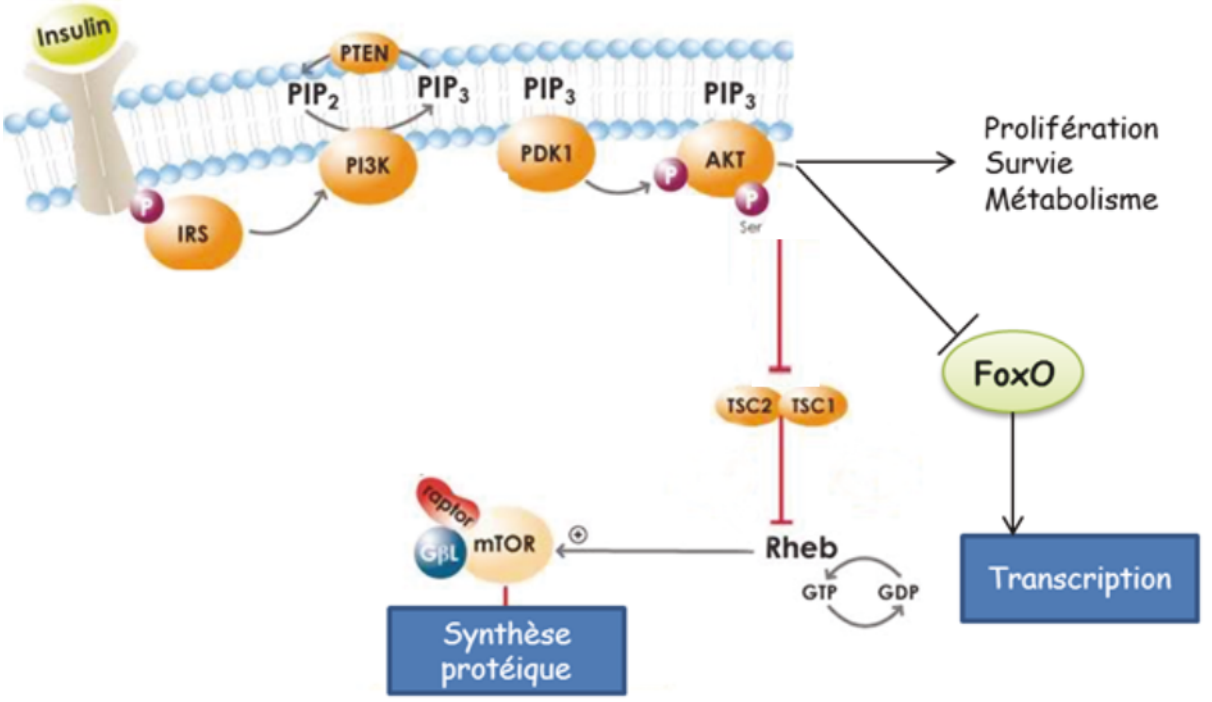


Figure 7 : La voie de signalisation PI3K. L'insuline active la cascade de signalisation de la PI3K. AKT contrôle de nombreuses cibles impliquées dans le cycle cellulaire, le métabolisme du glucose ou la régulation de l'apoptose. En parallèle, il interagit avec la voie TOR, qui régule la croissance au travers de la traduction des protéines. Enfin, AKT régule les facteurs de transcription FoxO, qui antagonisent la croissance. (D'après (Oldham and Hafen, 2003))

Récepteurs et transduction du signal chez les mammifères

Chez les mammifères, la signalisation des récepteurs Insuline/ IGFs est complexe, du fait de la redondance génique ainsi que des voies de signalisations induites en aval. Il existe trois gènes codant pour des récepteurs aux ILPs : le récepteur de l'insuline (*inr)*, présent sous deux isoformes, et les récepteurs des IGFs, de type 1 et 2 (*igfr-1* et *igfr-2*). Si l'insuline fixe préférentiellement InR et l'IGF1 IGFR-1, l'IGF2 fixe tous les récepteurs, quoique avec des affinités variables (Nakae et al., 2001). L'IGFR-2 possède une structure différente dépourvue d'activité kinase. Il est cependant capable d'internaliser et de dégrader l'IGF-2. C'est donc un antagoniste de la voie IIS qui titre l'IGF-2. Les récepteurs aux ILPs peuvent également former des hybrides fonctionnels, auquel cas une mutation perte de fonction d'un récepteur peut inhiber l'activité de l'autre (Belfiore et al., 2009). Ces récepteurs hybrides, ainsi que les

redondances d'affinité des ILPs pour leurs récepteurs, permet une certaine complémentarité des mécanismes de contrôle de la croissance et du métabolisme. Les mammifères possèdent également différents substrats du récepteur de l'insuline, incluant quatre IRS. Ces substrats permettent l'activation de la PI3K mais également d'autres voies de signalisation comme celle de Ras/MAPK ERK (Mitogen- Activated Protein Kinase Extracellular signal-Regulated Kinase) qui contrôle des programmes de transcription (Boulton et al., 1991). Un seul gène, *p110*, code pour la sous-unité catalytique de la PI3K. Cependant, trois gènes codent pour huit isoformes de sous-unités régulatrices, et deux gènes codent pour AKT, ajoutant à la complexité du système.

Récepteur et transduction du signal chez les la drosophile

Chez la drosophile, l'absence de redondance génique en aval des DILPs simplifie l'étude de la voie IIS. Un gène unique code pour l'homologue du récepteur de l'insuline (*dinr*) et fixe les DILPs 1 à 7. Un seul gène, *chico*, code pour l'homologue des IRS chez la drosophile (Bohni et al., 1999). Par ailleurs, cet adaptateur pourrait être dispensable à la transduction du signal. En effet, dInR présente des homologies avec les IRS des mammifères dans sa partie C-terminale intracellulaire, permettant probablement la fixation directe de la PI3K (Yenush et al., 1996). Lnk, une autre protéine à domaine SH2 agit en parallèle de *chico* dans la transduction du signal (Werz et al., 2009). Des gènes, uniques également, codent pour les sous-unités catalytiques et régulatrices de la PI3K, respectivement *dp110*, *dp60*, ainsi que pour dAKT. Enfin, il n'existe pas d'activation directe des MAPK par IIS, quoique ces voies de signalisations soient tout de même liées, du fait que dRas participe à l'activation de la PI3K (Orme et al., 2006).

Les facteurs de transcription FoxO

Les FoxOs, principaux facteurs de transcription en aval d'AKT, contrôlent l'expression d'un très grand nombre de gènes. Par exemple, sept cents gènes ont été montrés comme étant des cibles directes de FoxO chez la drosophile (Alic et al., 2011), soit 5% du génome. Les FoxOs sont impliqués dans une large diversité de processus comme la croissance, le métabolisme, la réponse au stress, la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose ou la longévité (Greer and Brunet, 2008; Partridge and Bruning, 2008; Salih and Brunet, 2008).

Si peu de données sont disponibles sur la régulation transcriptionnelle des FoxOs, c'est qu'ils sont majoritairement contrôlés au niveau de leur activité par des modifications post-traductionnelles. Chez les mammifères comme chez la drosophile, phosphorylations, acétylations, méthylation ou encore ubiquitination induisent soit leur inactivation par rétention cytoplasmique et/ou dégradation, soit leur activation par translocation nucléaire. Différentes enzymes et voies de signalisation modifient l'activité des FoxOs en fonction de facteurs extrinsèques ou intrinsèques, comme divers types de stress ou encore des signaux développementaux (Puig and Mattila, 2011).

Cependant, ils restent principalement des cibles de la voie IIS. Les FoxOs, inhibiteurs de la croissance, sont négativement régulés par AKT suite à la phosphorylation de trois résidus conservés (Brunet et al., 1999; Puig et al., 2003). Ces motifs sont reconnus par des protéines de la famille des 14-3-3. En s'y fixant, ces protéines d'échafaudage masquent les séquences de localisation nucléaire (nls) des FoxOs, induisant ainsi leur séquestration cytoplasmique (Obsilova et al., 2005; Puig and Mattila, 2011; Tzivion et al., 2011). Sept protéines 14-3-3 existent chez les mammifères contre deux chez la drosophile. Un unique facteur de transcription FoxO existe chez la drosophile, dFoxO. On en trouve quatre chez les mammifères, FoxO1, FoxO3a, FoxO4 et FoxO6. La régulation de FoxO6 est cependant différente : il n'est pas régulé par les Insuline/IGFs au travers d'AKT et reste principalement nucléaire (Jacobs et al., 2003).

dFoxO et croissance

Chez la drosophile, dFoxO répond donc indirectement à la nutrition par l'intermédiaire d'IIS. dFoxO est réprimé en présence de nutriments, tandis qu'il est activé en leur absence (Puig and Mattila, 2011). En conditions de nutrition favorables, la mutation nulle de *dfoxo* est viable et n'entraîne pas de phénotype développemental majeur, suggérant un rôle de dFoxO principalement pour la réponse à la carence (Junger et al., 2003; Slack et al., 2011). Plusieurs études à l'échelle du génome ont montré que dFoxO relaie en partie la réponse transcriptionnelle aux conditions de nutrition (Alic et al., 2011; Gershman et al., 2007; Teleman et al., 2008).

La mutation de *chico* induit une réduction de la taille des organismes due à une réduction du nombre et de la taille des cellules (Goberdhan et al., 1999). La suppression de *dfoxo* restaure le nombre de cellules mais pas leur taille, indiquant que dFoxO régule la croissance principalement en inhibant la prolifération et la survie cellulaire en réponse à une réduction de l'activité d'IIS (Junger et al., 2003).

Le rôle de dFoxO sur la croissance stricte des cellules est moins évident mais se révèle en condition de carence de par les cibles qu'il contrôle (Alic et al., 2011; Junger et al., 2003; Teleman et al., 2008). Par exemple, FoxO active l'expression de *4EBP*, codant pour un inhibiteur de la traduction des ARNm capés (Figure 8). Il régule également l'expression de *myc*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la biogenèse des ribosomes (Teleman et al., 2008). dFoxO a donc un effet sur la croissance des cellules au moins *via* un contrôle global de la traduction. Parmi les cibles principales de dFoxO, on retrouve également *inr*, engendrant un mécanisme de rétrocontrôle d'IIS permettant la sensibilité et la rapidité de la réponse aux fluctuations nutritionnelles (Puig and Tjian, 2005).

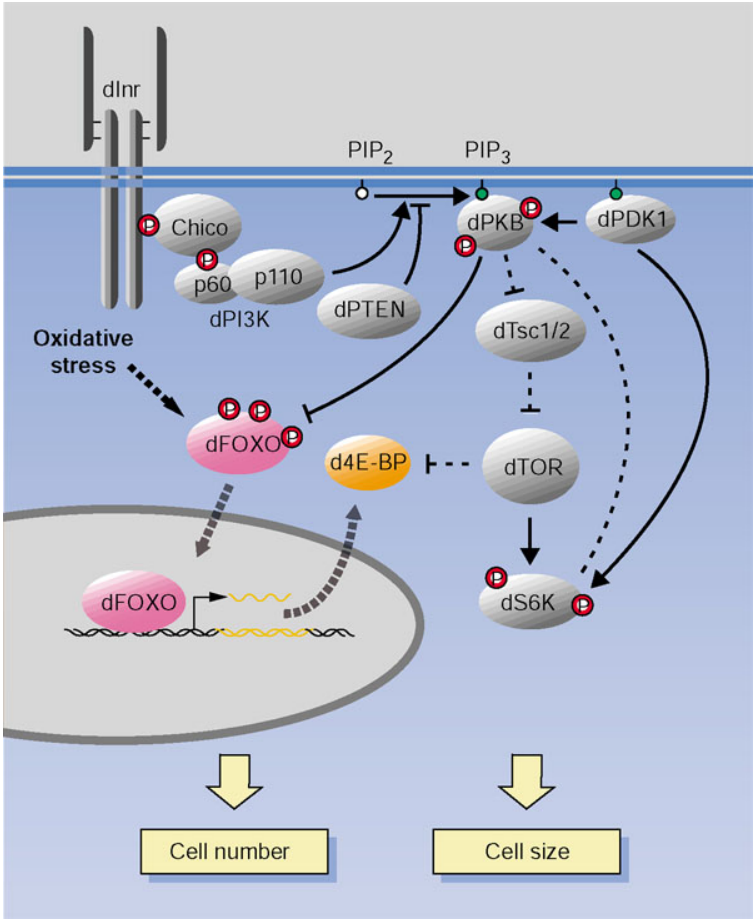


Figure 8: dFoxO contrôle la croissance en aval de la voie IIS. dFoxO est activé par le stress, comme le stress nutritionnel ou oxydatif en exemple sur la figure. dFoxO réduit la prolifération cellulaire et induit l'apoptose. En parallèle, il bloque en partie la synthèse protéique au travers de l'expression de *4EBP*. En absence de stress nutritionnel, l'activation d'AKT conduit à la phosphorylation et à la rétention cytoplasmique de dFoxO. Par conséquent, l'inhibition du nombre et de la taille des cellules est levée afin de promouvoir la croissance. (D'après (Junger et al., 2003)).

Conclusion

Bien que la voie de signalisation IIS possède nombre de spécificités fonctionnelles selon les organes ou les types cellulaires, ses fonctions, notamment le mécanisme du contrôle de la croissance, sont très bien conservées entre mammifères et drosophile (Figure 9). Des organes senseurs de l'état nutritionnel induisent la sécrétion systémique d'IGFs/DILPs, qui promeut une croissance autonome cellulaire uniforme *via* l'activation de la cascade de la PI3K. Etant donnée l'implication générale de la voie IIS dans le relai des informations de nutrition, cette voie de signalisation régule nombre de processus physiologiques et développementaux. En particulier, IIS influence largement la reproduction des organismes, notamment au travers de son implication dans la maturation des follicules ovariens. Ayant donné les mécanismes généraux du contrôle de la croissance *via* IIS, je discuterai par la suite de son implication spécifique au cours de l'ovogenèse.

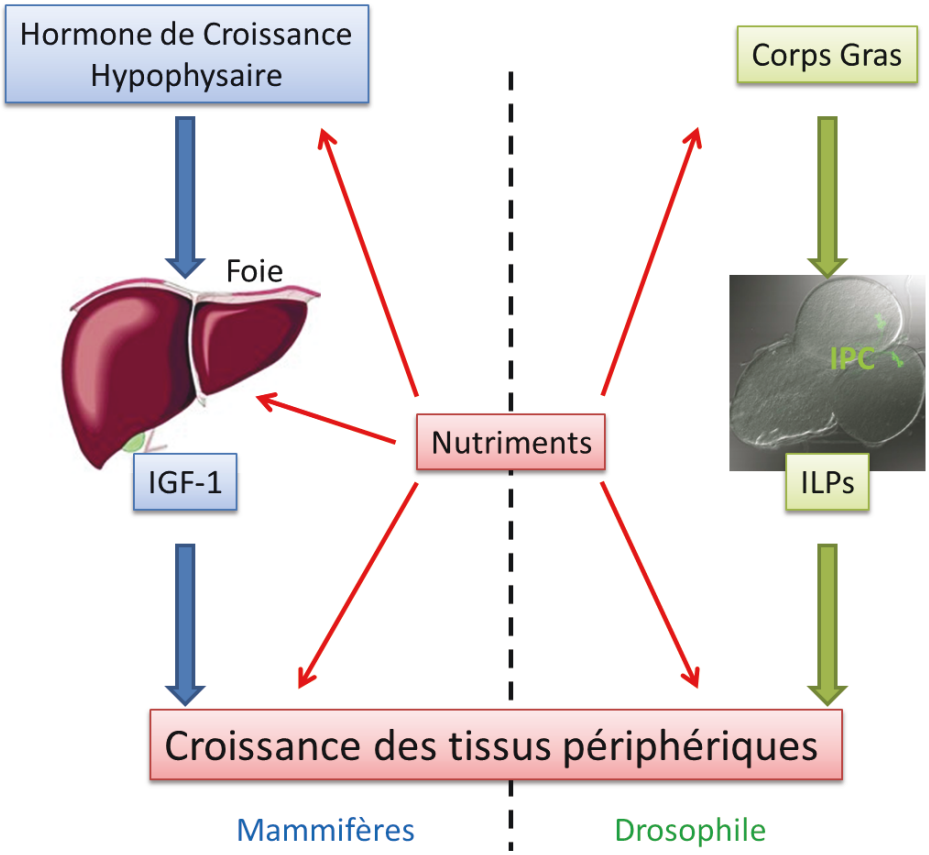


Figure 9 : Schéma comparatif des principaux mécanismes de contrôle de la croissance chez les mammifères et la drosophile. (Photographie des IPCs d'après (Geminard et al., 2009))

Ovogenèse

Introduction

L'ovogenèse consiste en la génération d'un ovocyte mature, capable d'être fécondé. Elle résulte du développement concomitant et interdépendant de tissus d'origine somatique et germinale, assemblés pour former le follicule ovarien, appelé « chambre d'œuf » chez la drosophile. Ces follicules subissent une phase de croissance spectaculaire, nécessitant la prolifération des cellules somatiques qui entourent les cellules germinales, ainsi que la croissance propre de toutes ces cellules. Cette phase a majoritairement lieu après la puberté chez les mammifères, ou au cours de la vie adulte chez la drosophile.

Si les phases précoces de la folliculogenèse sont concomitantes à la formation des ovaires, l'ovogenèse ne nécessite pas d'être coordonnée continuellement au développement des autres organes, qui auront fini leur croissance tandis que celle des follicules se poursuivra. Cette particularité soulève la question de la présence d'une régulation systémique *via* IIS. Cependant, cette phase de croissance reste soumise aux contraintes nutritionnelles, auxquelles doivent s'adapter les tissus somatiques et germinaux afin de maintenir le couplage de leur développement. L'ovogenèse implique un dialogue endocrine complexe entre le système nerveux central et les ovaires ainsi que nombre de signaux paracrines au sein des ovaires. Nous nous concentrerons sur la voie IIS, qui tient un rôle central, non seulement pour orchestrer les différentes étapes de la croissance des follicules ovariens en fonction des conditions de nutrition, mais également pour pallier aux dommages dus à la carence.

L'ovogenèse chez les mammifères

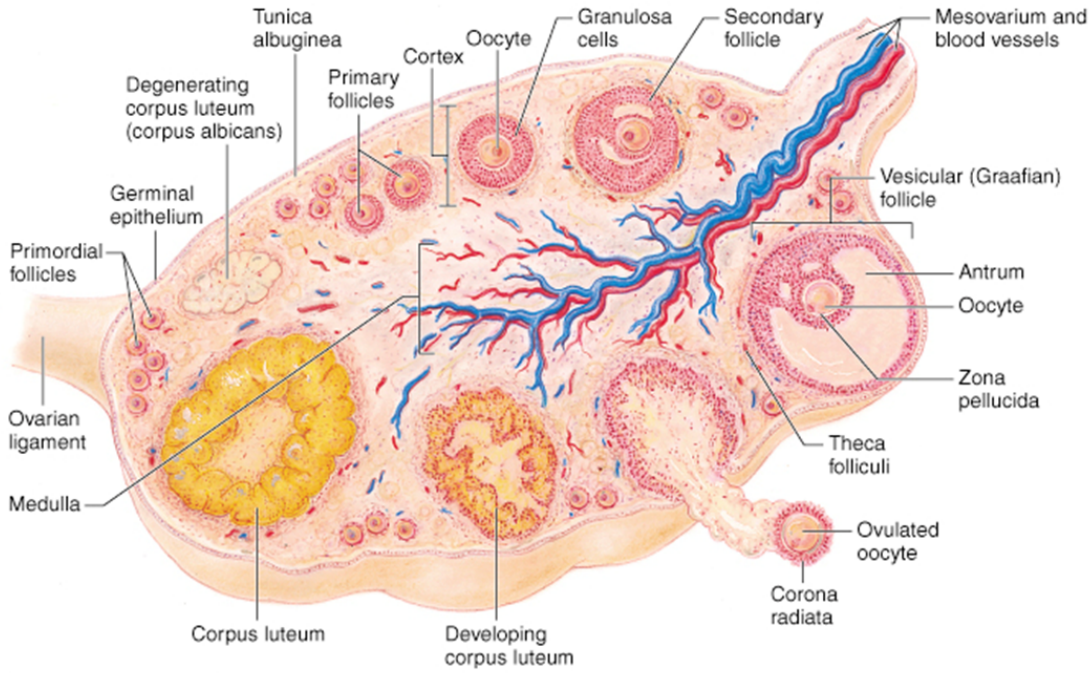
Chez les mammifères, le potentiel reproductif des individus est fixé avant la naissance par un nombre défini de cellules germinales, qui sont recrutées en permanence au

cours de la vie adulte pour se développer en follicules ovariens, jusqu'à épuisement des stocks à la ménopause. L'ovogenèse est cyclique et chaque cycle, dit menstruel, résulte d'un contrôle endocrinien qui conduit à la sélection d'une petite population d'ovocytes. Certains seront engagés dans l'ovulation (ou un seul pour les espèces mono-ovulatoires), tandis que les autres dégénèreront. Je décrirai principalement ce long processus de sélection mis en place au cours de l'ovogenèse, qui dépend largement de la croissance des follicules ovariens.

Stades de développement folliculaire

Chez les mammifères, l'ovogenèse diffère substantiellement selon les espèces mais les principales étapes sont communes. Les prémices de l'ovogenèse débutent durant le développement embryonnaire. Des Cellules Germinales Primordiales (PGCs), issues de l'épiblaste migrent au travers de différents tissus embryonnaires pour coloniser l'ébauche des ovaires, les crêtes génitales. Les PGCs se différencient alors en ovogonies qui prolifèrent par mitose, générant ainsi plusieurs millions de cellules. Lors des dernières divisions de mitose, les ovogonies restent connectées par des ponts cytoplasmiques pour former des cystes germinaux, synchronisant le développement de ces groupes de cellules. Au cours de la vie fœtale, les ovogonies entrent ensuite en prophase de la première division de méiose pour devenir des ovocytes, qui restent bloqués en diplotène. C'est le début de l'ovogenèse.

Les ovocytes néoformés perdent le contact avec l'épithélium ovarien, s'individualisent et s'entourent d'une couche de cellules somatiques, future granulosa, pour former les follicules ovariens (Guigon and Magre, 2006). Ils se différencient par la suite en follicules primordiaux, quiescents, qui restent à la périphérie des ovaires (Figure 10). Ils sont générés avant à la naissance et seront sélectionnés progressivement pour poursuivre leur développement pendant la vie adulte. Les mécanismes de cette sélection sont peu documentés. Cependant, une partie des follicules primordiaux est déjà recrutée chez le fœtus pour poursuivre l'ovogenèse dans le cortex ovarien, au travers des stades folliculaires primaires, secondaires et antraux (Figure 11).



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 10 : Représentation schématique de l'ovaire chez les mammifères

Les follicules primaires entrent en croissance et les cellules de la granulosa adoptent une forme cuboïde. L'ovocyte sécrète une membrane de glycoprotéines formant la zone pellucide, un manteau protecteur autour de l'ovocyte. Elle permet également l'intercommunication des cellules de la granulosa et de l'ovocyte.

Durant les stades secondaires, des cellules dérivées du stroma ovarien sont recrutées pour former la thèque, sous contrôle de la granulosa. Une circulation sanguine se met en place entre thèques interne et externe. La granulosa prolifère, générant plusieurs assises cellulaires et l'ovocyte termine sa croissance.

Les cellules folliculaires sécrètent ensuite un fluide formant une cavité antrale entre les couches de la granulosa, accroissant considérablement la taille des follicules. Ces follicules antraux sont formés à partir d'un stade de développement équivalent à la puberté chez l'Homme, et deviennent largement dépendant des gonadotrophines. La prolifération des cellules de la thèque et de la granulosa se poursuit et la cavité antrale accroit son volume. S'en suit une phase de maturation de l'ovocyte, qui poursuit alors la méiose. Sous l'action de morphogènes sécrétés par l'ovocyte, les cellules de la granulosa sont spécifiées en différents types cellulaires.

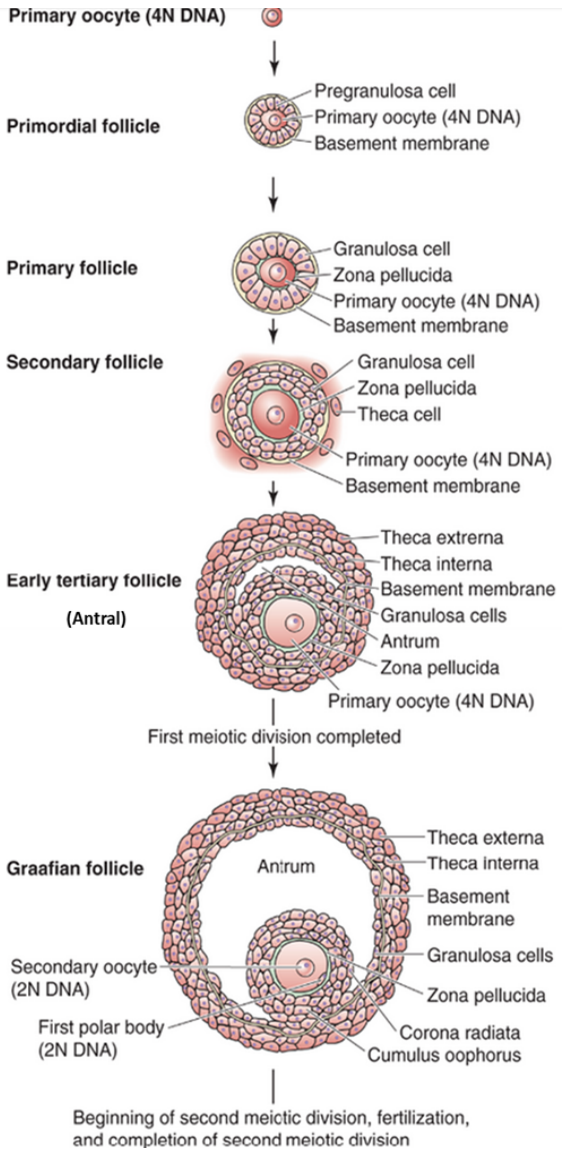


Figure 11 : Stades de développement des follicules ovariens. (D'après Bopp and. Seifer)

Le follicule de Graaf, pré ovulatoire, est ainsi formé. L'ovocyte achève la première division de méiose et la seconde est arrêtée en métaphase. L'ovocyte mature est expulsé dans les trompes de Fallope et la granulosa se transforme en glande endocrine, le corps jaune, préparant l'utérus à l'implantation du zygote. Les ovocytes complètent la deuxième division de méiose au moment de la fécondation.

Atrésie folliculaire, croissance et sélection

Le potentiel reproductif des individus est fixé par une quantité définie de follicules primordiaux. Cependant, la plupart des follicules (99,9% chez la femme) dégénèrera par apoptose. Une sélection drastique, multifactorielle, des ovocytes en développement est ainsi mise en place. Les raisons de cette mort massive et constitutive, également appelée atrésie, restent mal comprises. L'atrésie pourrait servir à l'élimination des cellules dont les génomes nucléaires ou mitochondriaux sont défectifs (Perez et al., 2000; Tilly and Kolesnick, 1999).

Des vagues de mort ont lieu très précocement dans les cystes germinaux ainsi qu'à l'issue du blocage de la première division de méiose (Figure 12). Au sein des follicules primordiaux en dégénérescence, certaines cellules, celles de la pré-granulosa, peuvent survivre et s'associer aux ovocytes survivants (Scaramuzzi et al., 2011). Les ovocytes apoptotiques pourrait également jouer le rôle de cellules nourricières, transférant des organites aux cellules survivantes *via* les ponts cytoplasmiques. Ils participent également à l'individualisation des cellules des cystes germinaux (Pepling and Spradling, 2001).

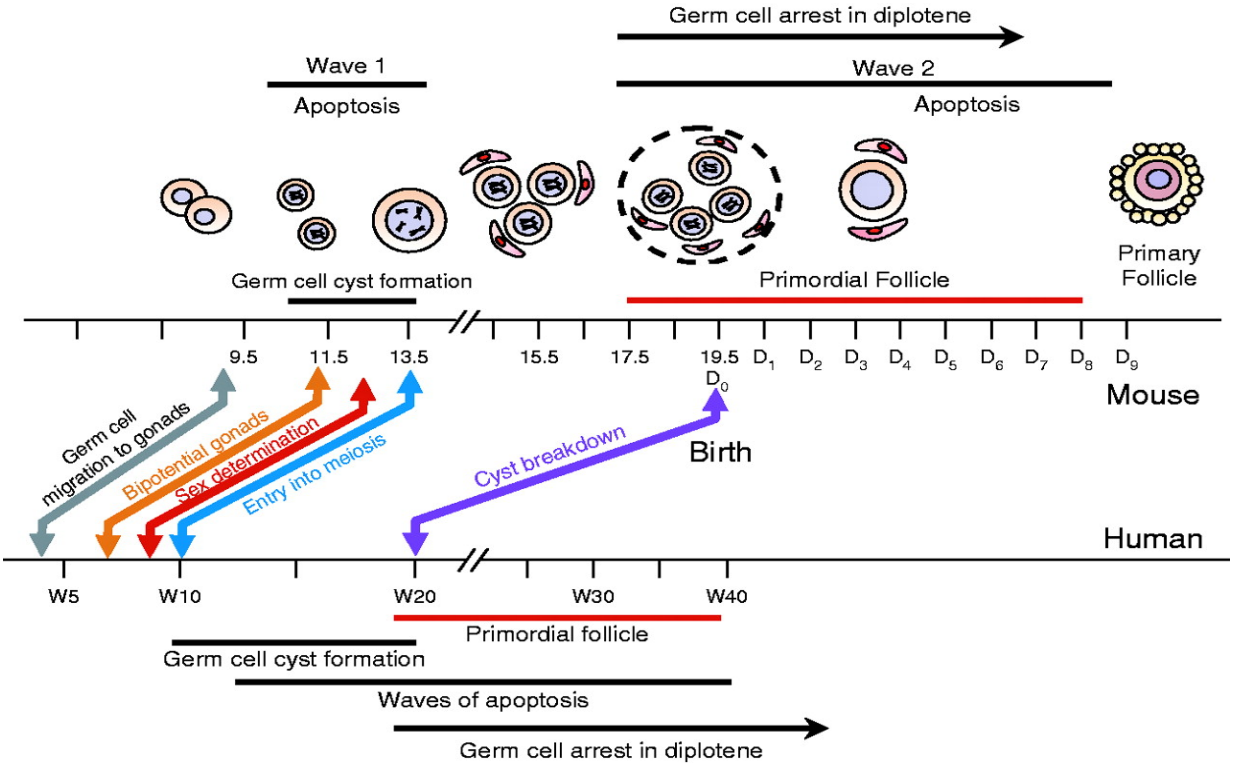


Figure 12: Apoptose précoce des cellules germinales. Schématisation des principales vagues d'apoptose durant les phases précoces resituées par rapport aux différents évènements de l'ovogenèse chez l'homme et la souris. D: nombre de jours post coït chez la souris. D_0: jour de la naissance. W: nombre de semaines post-coït chez la femme. (D'après (Sarraj and Drummond, 2012))

Cependant, la dégénérescence des follicules a principalement lieu durant les stades antraux. La balance entre leur élimination constitutive et leur survie est un processus critique, affectant amplement le succès reproductif des individus. La sélection de ces ovocytes résulte principalement d'un dialogue de signaux endocriniens entre les follicules antraux et l'hypophyse. Par cet intermédiaire, des follicules dits « dominants » promeuvent leur propre croissance au détriment de celle des autres.

Le développement des follicules antraux dépend largement des hormones sécrétées par l'hypophyse, les gonadotrophines FSH et LH (Follicule-Stimulating Hormone et Luteinizing Hormone). Ces hormones participent également au développement des follicules secondaires, mais y ont un effet moindre et indirect, leurs récepteurs y étant faiblement exprimés (Kumar et al., 1997; McGee and Hsueh, 2000). FSH et LH activent respectivement la prolifération des cellules de la granulosa et de la thèque. A chaque cycle menstruel, la sécrétion de gonadotrophine s'accroit. Portant des fonctions de survie et de croissance, la FSH sauve un groupe de follicules antraux de l'atrésie. Parmi ceux-ci, un va croître plus vite, devenant le follicule dominant (Figure 13). Ce dernier sécrète principalement deux types d'hormones en quantité accrue comparé aux autres, l'inhibine et des stéroïdes de la famille des oestrogènes. Ces hormones inhibent la sécrétion hypophysaire de FSH, bloquant ainsi le développement des follicules plus précoces qui entrent en apoptose. En effet, chez la femme, l'ajout exogène d'œstrogène bloque le développement folliculaire (Tsai and Yen, 1971). A l'inverse, un traitement à haute dose de gonadotrophine pendant la phase d'ovulation stimule la croissance simultanée de plusieurs follicules de Graaf (Fauser and Van Heusden, 1997). Une sélection négative des follicules est donc mise en place, résultat du rétrocontrôle des œstrogènes et de l'inhibine sur les gonadotrophines (Figure 14).

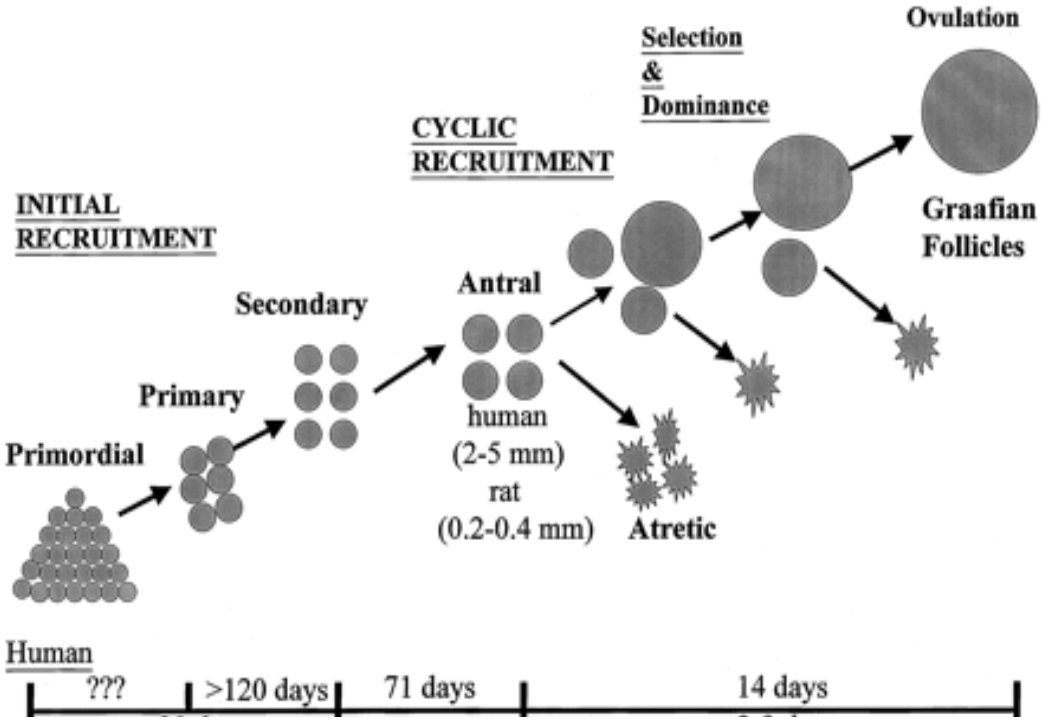


Figure 13: Sélection des follicules ovariens. Une fois sélectionnés (initial recruitment), les follicules primordiaux se développent jusqu'au stade antral. A chaque cycle menstruel, l'accroissement de FSH circulante sauve une population de follicules antraux de l'apoptose (cyclic recruitment). Parmi cette cohorte, un follicule dominant émerge et exprime œstrogènes et inhibine en quantité accrue, inhibant la sécrétion de FSH par l'hypophyse. Une sélection négative du reste de la cohorte est ainsi mise en place, induisant sa dégénérescence par apoptose. (D'après (McGee and Hsueh, 2000))

Par ailleurs des mécanismes de sélection positifs existent également, au travers desquels le follicule dominant potentialise sa propre réponse à la FSH (Figure 14). Par exemple, la LH stimule la biosynthèse d'androgènes par les cellules de la thèque, qui en retour activent l'expression des récepteurs à la FSH au sein de la granulosa (Palermo, 2007). De plus, les androgènes en provenance de la thèque sont convertis en œstrogènes dans les cellules de la granulosa. L'aromatase, une enzyme nécessaire à cette conversion, est une cible transcriptionnelle de la FSH. La FSH régulant elle-même la production d'œstrogène, cette fonction est potentialisée indirectement par la LH (Costrici et al., 1994). Ainsi, en devenant plus sensibles à la FSH, les follicules dominants en nécessitent une moindre quantité. De ce fait, le faible taux de FSH présent après inhibition de sa sécrétion par l'hypophyse suffit à promouvoir leur croissance.

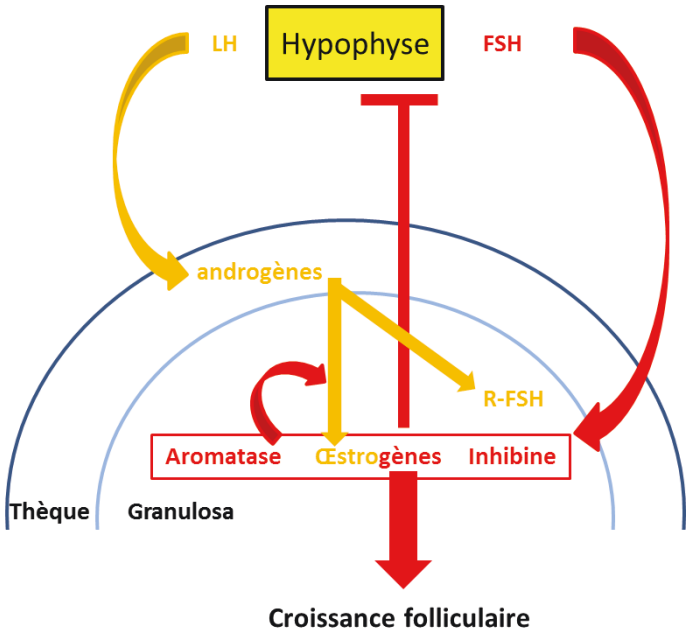


Figure 14 : Sélection positive du follicule dominant. En plus du mécanisme de sélection négatif engendré par l'inhibition des sécrétions hypophysaires, le follicule dominant potentialise sa propre sensibilité à la FSH. L'effet de la FSH et la production d'œstrogènes sont accrus. Il en résulte une croissance amplifiée du follicule antral. Les cellules de la thèque sont représentées en vert foncé et celles de la granulosa en vert clair. Les effets induits par la LH sont schématisés par des flèches oranges et ceux induits par la FSH par des flèches rouges. La synthèse d'œstrogènes

La possibilité d'une communication inter-follicules dans la régulation de la balance croissance/atrésie n'est pas écartée. En effet, quand une paire de follicules pré-antraux murins initialement équivalents est cultivée en contact étroit *in-vitro*, l'un acquiert toujours une dominance par rapport à l'autre (Spears et al., 1996). Cependant, cet aspect reste difficilement démontrable *in-vivo* d'un point de vue technique. Des modélisations informatiques suggèrent un effet suppresseur du follicule dominant, indépendant du relai de l'hypophyse (Gore et al., 1997). Conformément à cette hypothèse, une étude récente sur des follicules en culture décrit la migration d'un groupe de cellules depuis la thèque d'un ovocyte vers la thèque d'un second. Les auteurs proposent que cette cohorte, composée de cellules endothéliales et neuronales, participe à une communication inter-folliculaire dans le contrôle de la sélection (Campbell et al., 2013). L'étude reste cependant purement descriptive.

Conclusion

La croissance des follicules est donc indispensable, régulant la sélection des ovocytes ovulatoires. La croissance même de l'ovocyte permet d'orchestrer le développement des follicules ovariens, contrôlant prolifération et différenciation des cellules de la granulosa. Indirectement, il permet donc d'accroitre la sensibilité des follicules aux gonadotrophines ou le recrutement des cellules de la thèque. En retour, les cellules de la granulosa sont nécessaires au développement de l'ovocyte, contrôlant la balance entre croissance et atrésie (Matzuk et al., 2002). Des expériences d'interversions de cellules germinales et somatiques entres différents stades folliculaires montrent qu'après avoir franchi une taille seuil, l'ovocyte inhibe la capacité de ses cellules somatiques à promouvoir sa croissance. Ces résultats indiquent que l'ovocyte contrôle indirectement sa propre capacité de croître (Eppig et al., 2002). Etant donnée l'importance de ce processus de croissance au cours de l'ovogenèse, largement influencé par les apports nutritionnels, la voie de signalisation IIS y joue un rôle majeur.

Nutrition, IIS et ovogenèse chez les mammifères

La nutrition régule le développement folliculaire sous de nombreux aspects. La carence, l'excès de nutriments ou encore leur composition influence la sélection et l'activation des follicules primordiaux ainsi que le taux d'atrésie. La nutrition est impliquée dans la croissance des ovocytes ou encore dans la prolifération des cellules de la granulosa. Elle modifie à la fois la production de facteurs locaux et systémiques, ainsi que la sensibilité des follicules à ces signaux, dont l'intercommunication contrôle les différentes étapes de l'ovogenèse. IIS joue un rôle clé dans le contrôle de ces paramètres (Hernandez-Medrano et al., 2012; Webb et al., 2007) (Figure 15).

Les composants de la signalisation des IGFs sont exprimés dans la plupart des tissus des follicules ovariens (Sirotkin, 2010). Ils sont régulés par la nutrition, mais également par des hormones comme la GH ou les gonadotrophines. Par exemple, la voie de signalisation de

la PI3K est activée en réponse à la FSH et régule la croissance des cellules de la granulosa (Li et al., 2013). De concert avec les IGFs circulants, les IGFs intra-ovariens contrôlent le développement des follicules. Les changements de niveaux d'expression des composants de la voie IIS coïncident avec différentes étapes de croissance des follicules, bien que leur fonction diffère selon les espèces (Sirotkin, 2010). Cependant, le manque de démonstrations génétiques et la difficulté de ces manipulations *in vivo* ne permet pas encore une description précise du rôle des IGFs et des tissus où ils sont requis, ni de leur spécificité au cours de la maturation des follicules.

Chez l'homme, l'IGF-2 porte les rôles principaux au cours de l'ovogenèse tandis que chez les ruminants ou les rongeurs, c'est l'IGF-1 (Giudice, 2001). L'IGF-1 n'a probablement pas d'effet développemental sur les follicules primordiaux. En revanche, IIS participe à leur recrutement pour la formation de follicules primaires. Chez la souris, FoxO3, nucléaire dans les follicules primordiaux, est séquestré dans le cytoplasme lors de leur activation. Le *KO* homozygote de *foxo3*, au même titre que le *KO* conditionnel de *pten* (qui a pour effet d'inactiver FoxO3) dans l'ovocyte, entraîne l'activation globale des follicules primaires, à l'origine d'une déplétion rapide du pool de follicules primordiaux et donc d'une ménopause précoce (Hosaka et al., 2004; John et al., 2008). A l'inverse, le *knock-In* d'une forme activée de FoxO3a dans les ovocytes supprime leur maturation (Liu et al., 2007).

Plus tardivement, les IGFs stimulent la croissance et la survie des follicules secondaires *in vivo* et *in vitro*. Le KO d'*igf1* chez la souris réduit drastiquement l'expression du récepteur à la FSH dans les follicules pré-antraux. Elle est cependant restaurée après ajout exogène d'IGF1, suggérant que l'IGF1 stimule le développement de ces follicules notamment en potentialisant la réponse de la granulosa à la FSH (Zhou et al., 1997).

Dans les follicules antraux, les IGFs stimulent la prolifération et la différenciation des cellules somatiques (Sirotkin, 2010). Le KO d'IGF1 bloque complètement la formation des follicules antraux et empêche donc l'ovulation (Baker et al., 1996). Les IGFs accroissent la production d'hormones stéroïdes par la granulosa (Demeestere et al., 2004). Ils potentialisent également la capacité de réponse aux gonadotrophines, essentielle à la sélection et à la croissance des ovocytes. En effet, ils activent l'expression des récepteurs LH

et FSH dans la granulosa et la thèque (Sekar and Veldhuis, 2004), ainsi que dans l'ovocyte (Patino et al., 2001).

Enfin, les IGFs régulent l'atrésie folliculaire, notamment en réprimant l'activité pro apoptotique de FoxO1 et FoxO3 dans les cellules de la granulosa. L'expression de FoxO3 est accrue dans la granulosa des follicules atrétiques chez le cochon, et sa surexpression entraîne l'apoptose de ces cellules (Matsuda et al., 2011). Les IGFPBs, IGFBP-4 en particulier, induisent également l'apoptose en antagonisant l'effet des IGFs. Ce sont des marqueurs des follicules atrétiques (Webb and Campbell, 2007). Par ailleurs les follicules de Graaf humains, issus du processus de sélection et de croissance, sur-expriment IGF-2 et réduisent l'expression d'IGFPB4 en comparaison des autres stades folliculaires (Giudice, 2001).

Chez les mammifères, les IGFs sont donc d'important régulateurs, à la fois de la sélection et de la croissance des follicules ovariens (Figure 15). Cependant, la complexité des mécanismes d'action d'IIS dans ces processus entrave la compréhension du détail de ses fonctions. Les études menées chez la drosophile pourraient donc s'avérer utiles afin de mieux cibler les effets d'IIS au cours de l'ovogenèse, potentiellement conservés entre ces espèces.

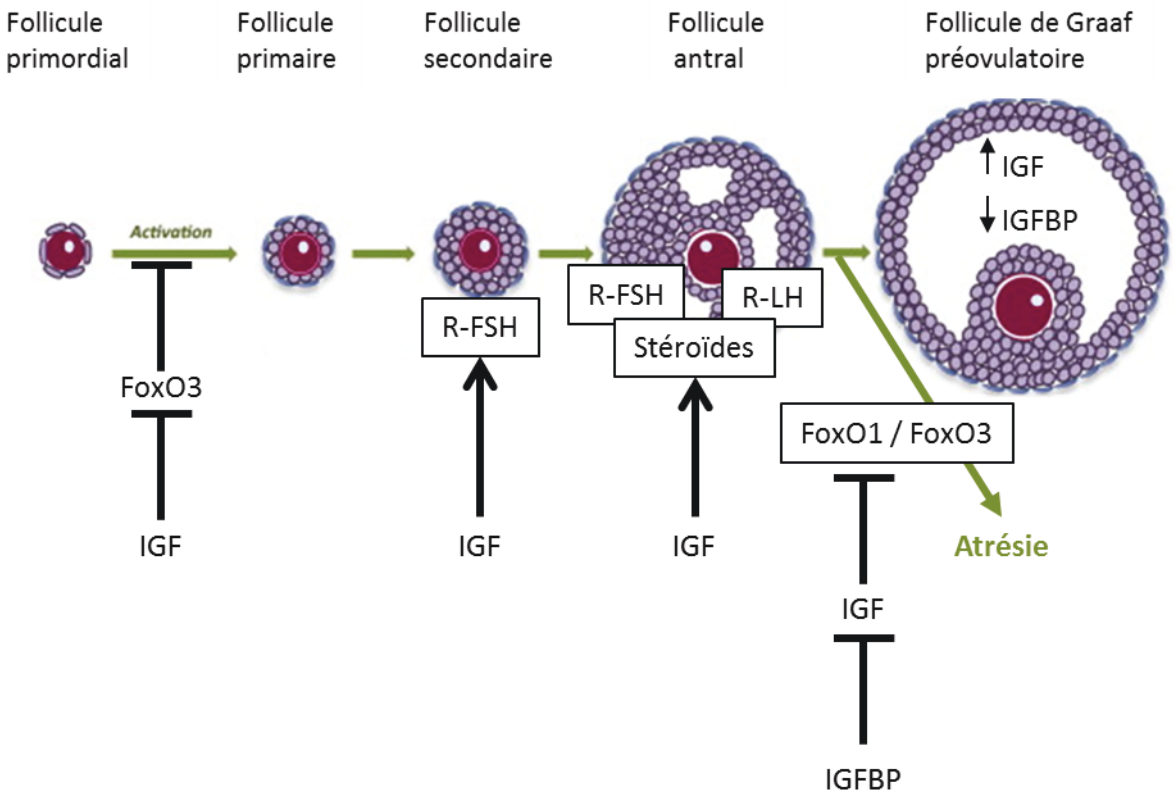


Figure 15 : Résumé schématique des effets d'IIS sur le développement des follicules ovariens. Les IGFs participent au recrutement des follicules antraux. Ils préparent les follicules secondaires à répondre aux gonadotrophines. Ils régulent la croissance des follicules antraux en potentialisant la réponse aux gonadotrophines, ainsi que la production d'hormones stéroïdes. Enfin, ils régulent la balance entre atrésie et formation de follicules pré-ovulatoires. R-FSH et R-LH : respectivement récepteurs de la FSH et de la LH. (D'après (Sanchez and Smitz, 2012))

L'ovogenèse chez la drosophile

A l'instar des mammifères, les prémices de l'ovogenèse chez la drosophile sont concomitantes à la formation des ovaires. Durant le développement embryonnaire, les cellules germinales primordiales (PGCs) issues du blastoderme syncytial migrent au travers de l'embryon pour rejoindre les SGPs (Somatic Gonadal Precursors) qui formeront les futures gonades. Tissus somatiques et germinaux prolifèrent durant les phases larvaires et la morphogenèse de l'ovaire commence à la transition larve/pupe (Spradling, 1993). A ce stade, le devenir des PGCs diffère substantiellement chez la drosophile. Comme chez les mammifères, une partie des PGCs se différencie en cystoblastes, équivalents des ovogonies. Par contre, certaines PGCs se différentient en cellules souches germinales (GSCs Germline Stem Cells), dont les divisions asymétriques génèrent de nouveaux cystoblastes (Figure 16) (Lin and Spradling, 1993). Cette différence est inhérente aux stratégies reproductives propres des espèces. Chez les mammifères, le potentiel reproductif est fixé par la prolifération des PGCs, tandis que la drosophile est capable de générer des cystoblastes *de novo* tout le long de sa vie. Il n'y a donc pas de ménopause, quoique l'âge affecte largement l'ovogenèse.

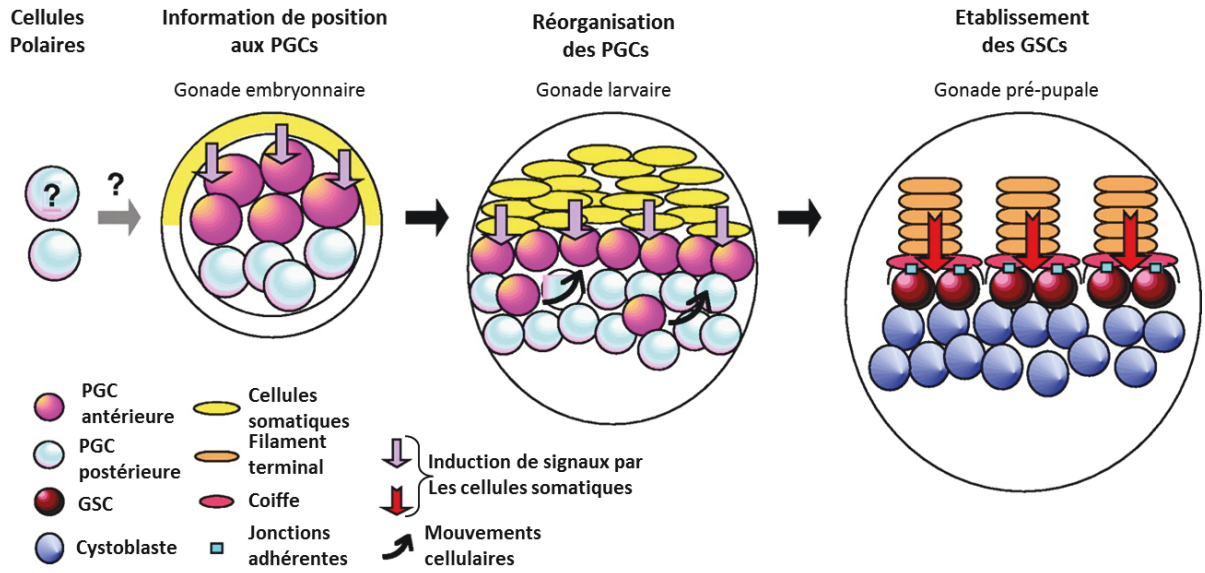


Figure 16 : Formation des Cellules Souches Germinales. Sous l'effet de signaux des précurseurs somatiques de la gonade, les cellules polaires initialement non équivalentes acquièrent une identité selon leur position. Suite à une phase de réarrangement, les PGCs antérieures et postérieures se différencient respectivement en GSCs et cystoblaste, sous contrôle des cellules somatiques, qui se différencient en différents types cellulaires que l'on retrouvera dans le germarium. (D'après (Asaoka and Lin, 2004)).

Les cystoblastes entreprennent 4 cycles de mitose, pour former des cystes germinaux de 16 cellules. Ces divisions sont orientées par une structure membranaire reliée au réseau de microtubules et spécifique des cellules germinales : le fusome. Comme chez les mammifères, des ponts cytoplasmiques, les canaux en anneaux, sont formés par cytokinèse incomplète. Ils connectent les cystocytes ainsi formés et synchronisent leur développement. En revanche, les cystocytes ne s'individualisent pas pour former chacun un futur ovocyte. Chez la drosophile, un seul cystocyte est sélectionné. Ce mécanisme reste encore mal compris. L'ovocyte est spécifié en fonction de son nombre de ponts cytoplasmiques et fait intervenir la ségrégation asymétrique du fusome lors des divisions (de Cuevas and Spradling, 1998). L'ovocyte entre en méiose et les 15 autres cystocytes deviennent des cellules nourricières. Les cystes germinaux sont ensuite encapsulés par une monocouche de cellules folliculaires (CF), formant ainsi la chambre d'œuf.

Le développement continu de chambres d'œuf à partir de cellules germinales néo-générées est rendu possible par la mise en place d'une structure de cellules somatiques, le germarium (Figure 17). Il se forme progressivement à la transition larve/pupe à partir des SGPs. La morphogenèse de cette structure, unité fonctionnelle de production des chambres d'œuf, reste peu documentée. Cependant, elle est indispensable à toutes les étapes de la formation de la chambre d'œuf. Certaines cellules parmi les SGPs sont déjà différenciées et régulent le devenir des PGCs, à savoir leur différenciation en GSCs ou cystoblastes (Asaoka and Lin, 2004).

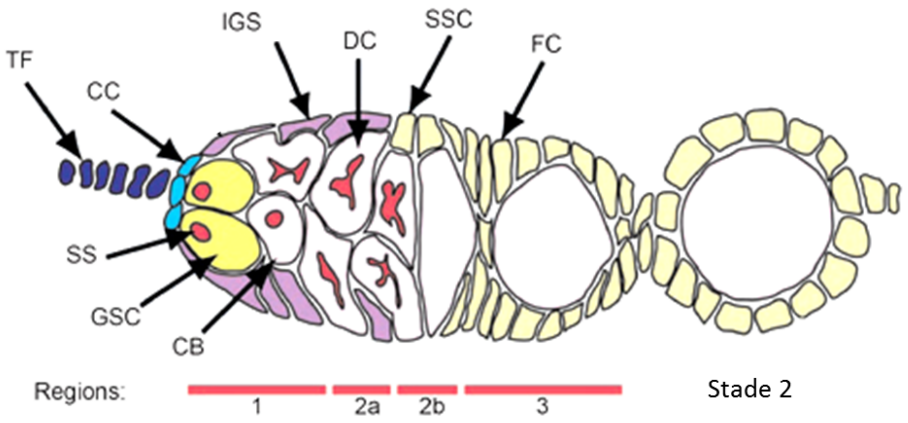


Figure 17: Représentation schématique du germarium. Les cellules du filament terminal (TF) et de la coiffe (CC) maintiennent les cellules souches germinales (GSC) au pôle antérieur. Les GSCs sont reconnaissables à leur spectrosome (SS), qui formera le fusome. Les cystoblastes (CB), générés par division asymétrique des GSCs, migrent en position postérieure et s'entourent des cellules du manteau intérieur (IGS). Le cyste en développement (DC) entre dans la région 2a. Une fois mature, il passe dans la région 2b où il s'entoure des cellules folliculaires (CF) générées par les cellules souches somatiques (SSC). La chambre d'oeuf est formée dans la région 3 (ou stade 1) et sort du germarium au stade 2 pour finir son développement. (D'après (Kirilly and Xie, 2007)).

Une fois formé, le germarium est compartimenté et comprend deux ou trois GSCs. Les divisions des GSCs sont restreintes à la région 1, la plus antérieure. Des cellules somatiques (cellules du Filament Terminal et cellules de la Coiffe) forment la « niche », qui pourvoit un microenvironnement particulier maintenant le caractère « cellule souche » des

GSCs et contrôlant leur auto-renouvèlement et taux de division. Les cystoblastes se divisent d'abord dans la région 1, formant les cystes germinaux qui continuent à se diviser dans la région 2a pour former les 16 cellules germinales. A ce stade, ils perdent le contact avec l'épithélium du germarium formé par les cellules du manteau intérieur. Dans la région 2b, l'ovocyte a été spécifié. Les cystes s'entourent de cellules folliculaires, générées par deux Cellules Souches Folliculaires (FSCs). Les chambres d'œuf sont formées dans la région 3. Elles bourgeonnent alors hors du germarium pour former un œuf mature au travers de 14 stades développementaux, morphologiquement identifiables (Cummings and King, 1970). Les chambres d'œuf formées en continu sont reliées entre elles par des cellules de la tige et progressent en direction du pôle postérieur des ovaires. L'ensemble du germarium et des chambres d'œuf des plus jeunes aux plus âgées forme une ovariole. Chacun des deux ovaires en est composé d'une quinzaine (Figure 18).

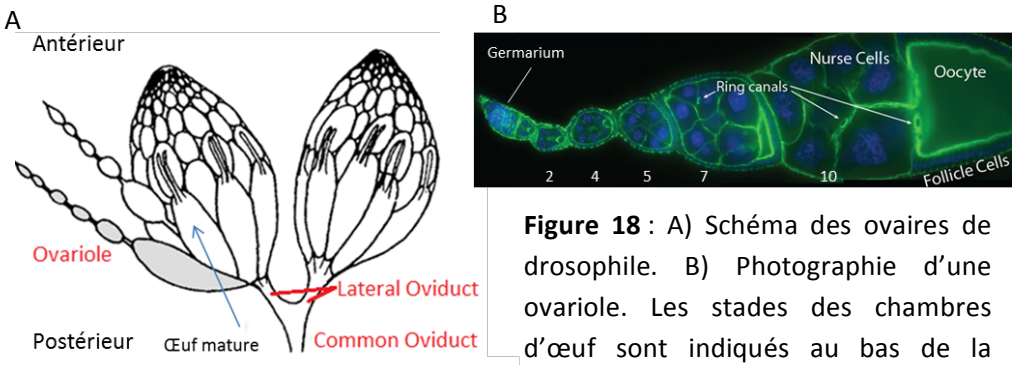


Figure 18 : A) Schéma des ovaires de drosophile. B) Photographie d'une ovariole. Les stades des chambres d'œuf sont indiqués au bas de la figure. (D'après L.Cooley)

Durant les 6 premiers stades de développement, les cellules nourricières entrent en endocycle (réplication de l'ADN sans division cellulaire). L'ovocyte poursuit la prophase de la première division de méiose. Les CF, immatures, prolifèrent par mitose au fur et à mesure que la chambre d'œuf grossit, cette coordination étant assurée par le cytosquelette d'actomyosine des CF et des cellules germinales (Wang and Riechmann, 2007). A l'inverse des mammifères, ces cellules restent sous forme épithéliale, présentant une unique assise cellulaire. Entre les stades 6 et 7, les CF changent leur programme cellulaire pour également entrer en endocycle. Je reviendrai en détail sur ce processus clé dans la maturation des chambres d'œuf.

Au stade 8, l'ovocyte est bloqué en prophase de première division de méiose (King, 1970), dans un stade « post-pachytène » encore mal déterminé. La chambre d'œuf entre alors dans une phase de forte croissance, c'est la vitellogenèse. Ce processus, qui commence après l'éclosion des adultes, est comparable à la formation de la cavité antrale chez les mammifères. Les cellules nourricières, les CF et l'ovocyte accumulent le vitellus, composé de particules riches en protéines spécifiques (les protéines du yolk) ou en glycogène, ainsi que de gouttelettes lipidiques. Il fournira l'énergie nécessaire au développement du futur embryon (Spradling, 1993).

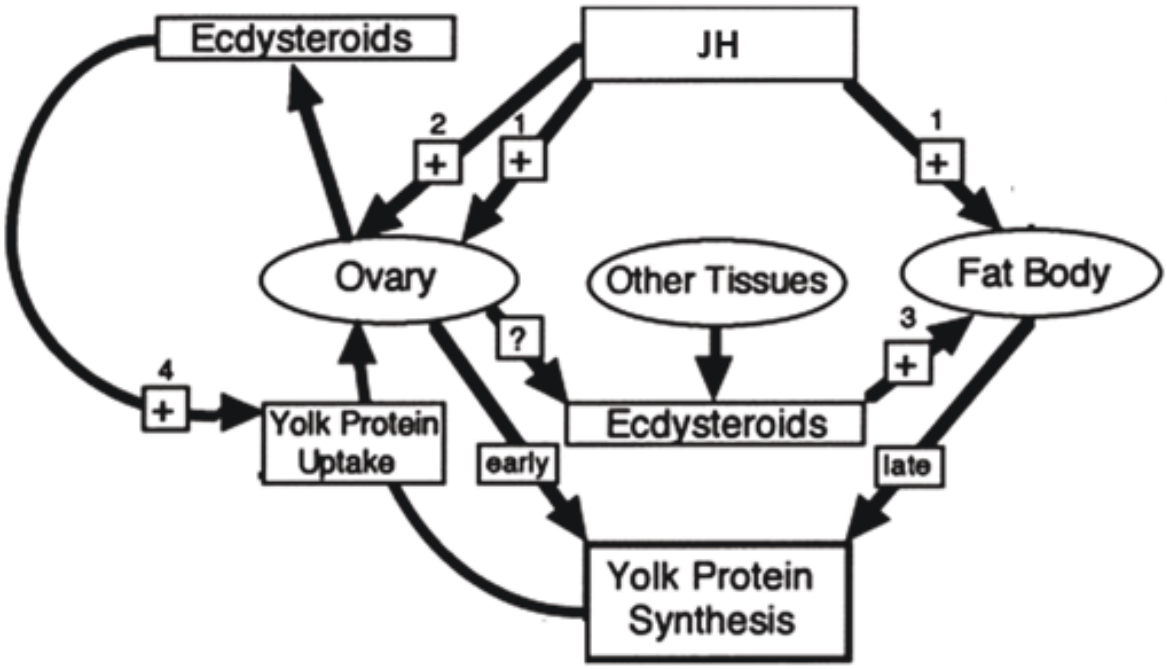


Figure 19: Régulation hormonale de la vitellogenèse. L'Hormone Juvénile (JH) stimule (1) la synthèse des protéines du Yolk par les ovaires et le corps gras, ainsi que la synthèse d'ecdysone par les ovaires (2). L'ecdysone secrétée par la glande en anneau (other tissues sur la figure), et probablement l'ecdysone ovarienne, potentialisent la synthèse de protéines du yolk par le corps gras (3). Enfin, l'ecdysone ovarienne induit l'import des protéines du yolk par la chambre ovarienne (4). (D'après (Gilbert et al., 1998))

Le vitellus est sécrété par le corps gras dans l'hémolymphe (la circulation sanguine ouverte primitive de la drosophile), ainsi que par les CF. L'hormone juvénile (JH) et l'hormone stéroïde Ecdysone, respectivement sécrétées par la *corpora allata* et le cerveau, portent des fonctions gonadotropes majeures durant cette période (Figure 19). Elles induisent la synthèse des protéines du vitellus ainsi que leur import dans les chambres d'œuf. Les rôles respectifs de ces hormones dans la synthèse et l'endocytose des protéines du vitellus sont controversés. On a d'abord cru la JH responsable de la synthèse des protéines du yolk dans les ovaires et de leur accumulation dans l'ovocyte ; tandis que l'ecdysone régulerait la synthèse de yolk par le corps gras (Riddiford, 1993). Cependant, l'ecdysone est également sécrétée par la chambre d'œuf, et Il semblerait que l'effet de la JH soit partiellement indirect, induisant la synthèse d'ecdysone par les ovaires (Bownes, 1989; Gilbert et al., 1998; Richard et al., 2001). De ce fait, une analogie avec les circuits endocriniens des mammifères peut être notée, chez lesquels gonadotrophines et androgènes inter-communiquent également dans le contrôle de la croissance folliculaire.

Durant cette période, les CF se différencient. Au stade 9, un flux migratoire de CF vers le pôle postérieur se met en place. Ces cellules sécrètent alors la membrane vitelline, qui imperméabilisera l'ovocyte. Un groupe de cellules spécifiées, les Cellules de la Bordure (CB), migre au travers des cellules nourricières (Figure 20A). Ce processus, nécessaire à la fécondation de l'œuf et dépendant des ecdystéroïdes, sera également décrit en détail par la suite. Au stade 10, la plupart des CFs entoure l'ovocyte, elles adoptent alors une forme colonnaire. Sous contrôle de l'ecdysone, elles changent une fois de plus leur programme cellulaire et entrent en amplification génique, où seuls les gènes codant pour les protéines du chorion sont répliqués en continu (Calvi et al., 1998; Kim et al., 2011; Sun et al., 2008). Le chorion, formant la coquille de l'œuf, peut alors être sécrété en quantité importante. Aux stades 11 et 12, les cellules nourricières déversent leur vitellus dans l'ovocyte au travers des ponts cytoplasmiques, provoquant une croissance massive de ce dernier. Le micropyle, canal d'entrée des spermatozoïdes, est percé par les CB. D'autres structures externes, les appendices dorsaux, l'aéropyle et l'opercule sont formées par d'autres CF spécifiées. Au stade 13, la croissance de l'ovocyte s'est suffisamment accrue, il reprend alors la méiose. Les œufs sont matures au stade 14, après que les appendices dorsaux sont totalement formés

(Figure 20B). Cellules nourricières et CF dégénèrent, l'ovocyte reste bloqué en métaphase I jusqu'à l'activation de l'œuf par fécondation, qui lui permet de terminer la méiose.

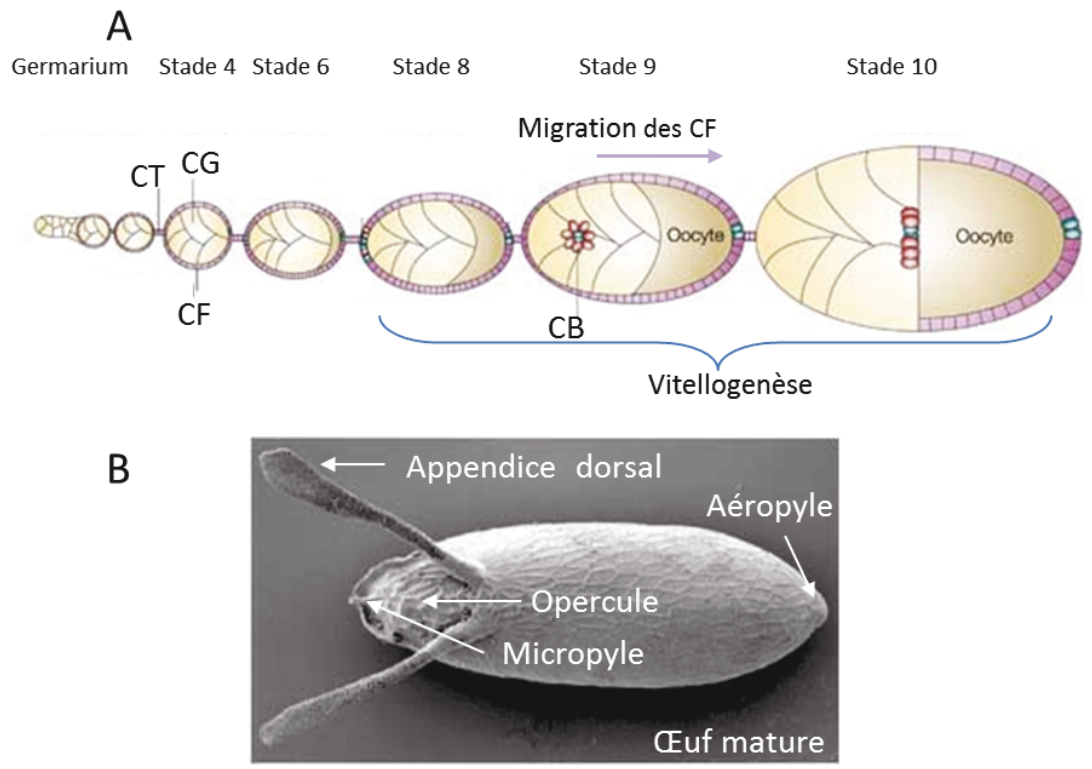


Figure 20 : Développement des chambres d'œuf jusqu'à génération d'un œuf mature. A) Schéma des stades de développement des chambres d'œuf d'une ovariole. B) Œuf mature (microscopie électronique). CT : Cellules de la Tige. CG : Cellules Germinales. CF : Cellules Folliculaires. CB : Cellules de la Bordure. (D'après (Montell, 2003))

Bien que de nombreuses différences existent entre l'ovogenèse chez les mammifères et chez la drosophile, la plupart des processus majeurs sont conservés (Figure 21). Ceux-ci incluent le développement concomitant de tissus somatiques et germinaux, un blocage de l'ovocyte en prophase I de première division de méiose et une phase de croissance contrôlée par des hormones permettant la maturation des follicules et la reprise de la méiose. L'ovogenèse chez la drosophile constitue donc un modèle de choix pour comprendre précisément comment un large panel de signaux agissant au sein de différents tissus permet la mise en place d'un œuf mature, prêt à être fécondé. Cependant, une différence majeure

avec les mammifères est qu'il n'existe pas de phénomène d'atrésie chez la drosophile. Les chambres d'œuf sont néo-générées en continu sans passer au travers d'un long processus de sélection. Toutefois, les conditions environnementales, notamment la nutrition, perturbent largement l'ovogenèse. La carence nutritionnelle est particulièrement délétère durant les phases de croissance, et la voie IIS est requise une fois encore dans l'intégration des paramètres de nutrition pendant le développement des chambres d'œuf.

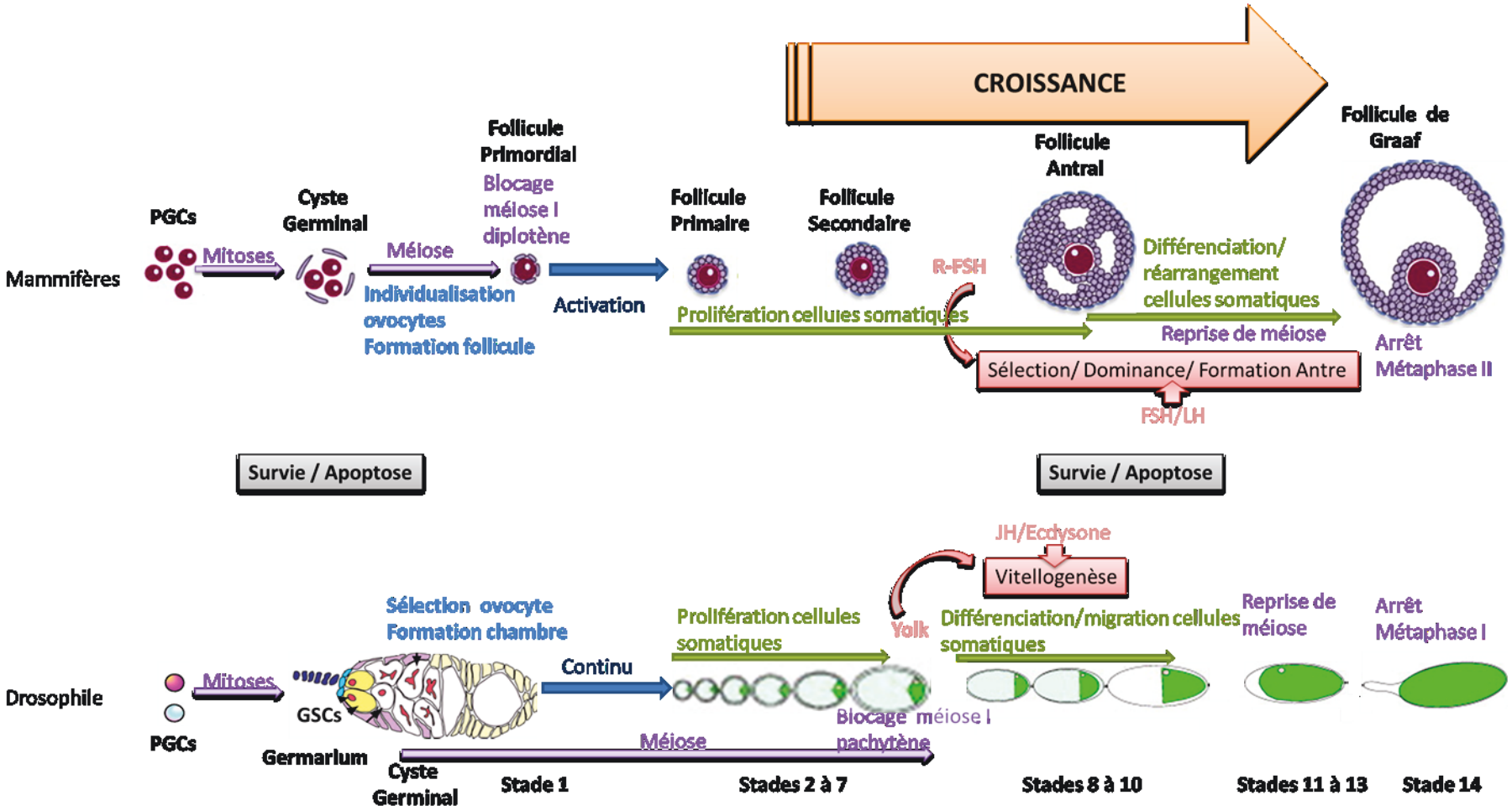


Figure 21 : Schéma comparatif des principales étapes de l'ovogénèse chez la drosophile et chez les mammifères. (Voir texte pour la description). Les vagues d'apoptose constitutives dans les phases initiales et les phases de croissance de l'ovogenèse sont spécifiques des mammifères. Cependant, le stress nutritionnel chez la drosophile entraine également la dégénérescence des chambres d'œuf durant des stades de développement équivalents.

Nutrition, IIS et ovogenèse chez la drosophile

L'ovogenèse chez la drosophile est dépendante de la disponibilité en nutriments, notamment en protéines (King, 1970). La carence protéique entraîne rapidement une diminution drastique de la ponte, qui est réversible après retour à une alimentation riche (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001). Ce phénotype est dû au fait que la quantité de nutriments influence la majorité des étapes de l'ovogenèse (Gancz and Gilboa, 2013). En effet, l'état nutritionnel régule les taux de division et la croissance des tissus somatiques et germinaux. La nutrition contrôle ainsi le taux de génération et la vitesse de développement des chambres d'œuf. Lors d'une période de carence, ces dernières n'entrent pas en vitellogenèse, et celles qui ont déjà entamé ce processus y restent bloquées. Deux points de contrôle de l'état nutritionnel sont également mis en place au cours de l'ovogenèse. Ils induisent la dégénérescence des cystes germinaux ou des chambres d'œuf par apoptose en cas de carence en protéines. Le premier a lieu précocement dans les régions 2a et 2b du germarium, le second plus tardivement pendant la vitellogenèse, principalement entre les stades 8 et 9 (Figure 21) (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001).

Quelles que soient les conditions nutritionnelles et donc leur vitesse de maturation, les chambres d'œuf maintiennent une coordination du développement des tissus qui les composent. Cette observation indique que des signaux couplent le développement des chambres d'œuf aux apports nutritionnels, suggérant un rôle de la voie IIS. En effet, certaines mutations homozygotes viables pour les composants de cette voie de signalisation miment les effets de la carence. Par exemple, la mutation de *chico* entraîne la stérilité des femelles, affectant la prolifération des CFs, l'entrée en vitellogenèse et induisant la dégénérescence des chambres d'œuf (Bohni et al., 1999; Drummond-Barbosa and Spradling, 2001).

L'effet d'IIS sur l'ovogenèse, notamment sur la vitellogenèse, a d'abord été considéré comme indirect, relié par le rôle systémique de la JH (Figure 22). En effet, des combinaisons hétéro-alléliques de *dinr* entraînent une réduction de la synthèse de JH, et donc de la

sécrétion d'ecdysone par les ovaires (Tatar et al., 2001; Tu et al., 2002). De plus, l'exposition de ces mutants à des analogues de la JH restaure la vitellogenèse (Tatar et al., 2001).

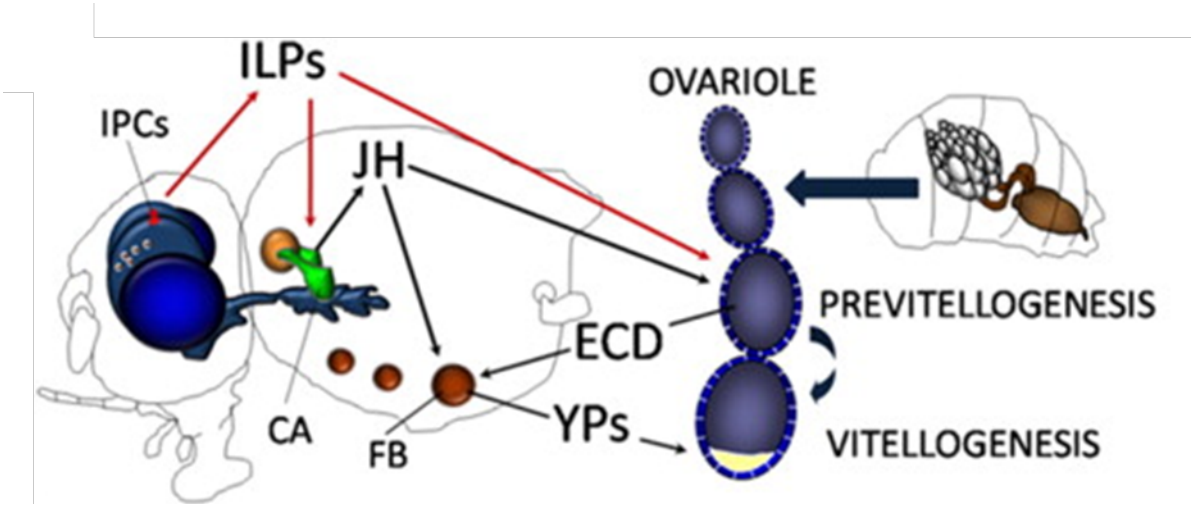


Figure 22: Régulation de la vitellogenèse par IIS: effets directs et indirects. Les ILPs induisent la sécrétion de JH par la *corpora allata,* et induisent la vitellogenèse dans les chambres d'oeuf. Durant la phase précoce de la vitellogenèse, la JH induit la synthèse des protéines du yolk dans le corps gras (FB) et les cellules folliculaires. En parallèle, la JH stimule la production d'ecdysone (ECD) par les ovaires qui en retour induit l'assimilation des protéines du yolk par les chambres dans les phases tardives de la vitellogenèse. (D'après (Schiesari et al., 2011)).

Cependant, la réduction de la synthèse de JH ne semble pas dépendre de *chico*, suggérant un rôle autonome d'IIS dans le contrôle de l'ovogenèse (Richard et al., 2005). L'ablation génétique des IPC, source systémique des DILPs 1, 2, 3 et 5, entraine un blocage des chambre d'œuf en vitellogenèse et une réduction de l'ovogenèse (Ikeya et al., 2002). Les mutations homozygotes des *dilps 2, 3, 5* et particulièrement *dilp6*, individuellement, entraînent également une réduction significative de la fertilité. En combinant ces mutants, l'effet est exacerbé, révélant une redondance génique des DILPs dans la régulation de ce processus (Gronke et al., 2010). Ces expériences montrent un rôle systémique des DILPs dans le contrôle de l'ovogenèse (Figure 22).

D'autre part, *dilp5* est exprimé dans les ovaires, suggérant également un rôle auto ou paracrine de ces hormones (Ikeya et al., 2002). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la protéine Dendos, une protéine homologue de l'α-endosulfine des mammifères impliquée dans la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, soit également exprimée de manière ubiquitaire dans les ovaires. Sa mutation dans les chambres d'œuf induit des effets indirects sur leur développement, potentiellement au travers de la sécrétion de DILPs (Drummond-Barbosa and Spradling, 2004). Un effet physiologique autocrine des DILPs dans les chambres n'a jamais été démontré. Cependant, la surexpression locale de Dilp2 dans les ovaires sauve certains effets de la carence, démontrant que les chambres d'œuf sont capables de répondre à d'autres DILPs que ceux en provenance des IPCs (Hsu and Drummond-Barbosa, 2009).

La première démonstration d'un rôle direct d'IIS provient de l'étude des effets de la mutation d'*inr* sur la progression les chambres d'œuf (LaFever and Drummond-Barbosa, 2005). La génération de cystes germinaux mosaïques pour un allèle nul d'*inr* entraîne un retard du développement des cellules mutantes. De plus la mutation d'*inr* dans toutes les cellules germinales entraîne le blocage de l'entrée des chambres d'œuf en vitellogenèse, récapitulant l'effet de l'ablation des IPCs. Les auteurs montrent qu'IIS est déjà requise de manière autonome dans les GSCs pour contrôler leur taux de division, puis dans les cellules germinales pour réguler la croissance du cyste et son entrée en vitellogenèse (Figure 23). Par ailleurs, IIS dans les cellules germinales contrôle indirectement la prolifération des CFs (LaFever and Drummond-Barbosa, 2005).

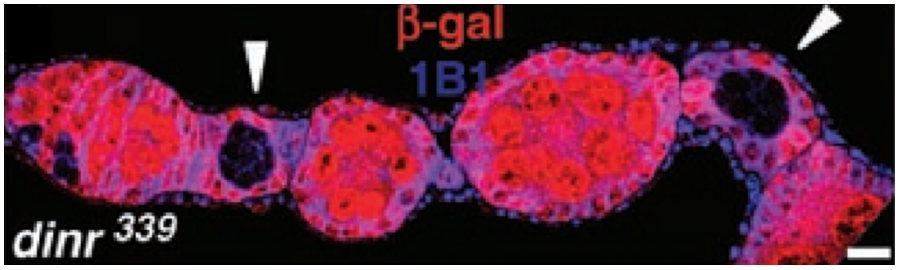


Figure 23 : La mutation d'*inr* dans les cellules germinales retarde le développement des chambres d'œuf. La mutation homozygote *d'inr* (*inr*^{339}) est induite dans les cellules souches germinales à partir d'un tissu hétérozygote pour cet allèle (système FLP/FRT ; (Xu and Rubin., 1993)). Les cystes germinaux mutants (indiqués par des flèches) ainsi générés montrent un retard de développement comparé aux chambres d'oeuf contrôles de l'ovariole. La β-Gal marque les tissus contrôles hétérozygotes. L'anticorps 1B1 marque les membranes cellulaires. (LaFever and Drummond-Barbosa, 2005)

IIS agit également dans les cellules somatiques où elle contrôle la prolifération des CFs de manière autonome cellulaire. Cependant, la mutation de *dfoxo* ne sauve pas le ralentissement de la prolifération induit par la perte de fonction d'*inr*, montrant qu'IIS agit indépendamment de dFoxO dans ce processus (LaFever et al., 2010). IIS agit également dans les cellules de la niche, dont le rôle est de maintenir les GSCs. En effet, la perte de fonction de la voie IIS ou encore l'activation de FoxO dans les cellules de la coiffe induit une réduction de leur nombre, conduisant à la perte des GSCs. (Hsu and Drummond-Barbosa, 2009; Yang et al., 2013).

Enfin, IIS est impliquée dans la dégénérescence des chambres d'œuf, uniquement durant les stades vitellogéniques. En conditions de carence, IIS interagit avec la voie de signalisation TOR, notamment dans les cellules germinales, et induit l'apoptose de ces cellules. Par la suite, les CF deviennent également apoptotiques et les chambres dégénèrent (Pritchett and McCall, 2012; Pritchett et al., 2009).

La voie de signalisation IIS, chez les mammifères comme chez la drosophile, coordonne donc le développement des follicules ovariens en fonction des apports nutritionnels (Figure 24). L'ensemble des régulations systémiques, auto ou paracrine ainsi que les effets indirects ou autonomes cellulaires d'IIS couplent le développement des CFs et des cellules germinales qu'elles entourent. Cependant, ces régulations sont complexes et restent peu documentées. En particulier, le rôle des CFs dans ces mécanismes adaptatifs est encore mal compris. Chez la drosophile, la réduction des signaux d'IIS entraîne un développement ralenti des chambres d'œuf jusqu'au stade 8. Elles sont alors bloquées ou encore dégénèrent durant ces phases de croissance et de maturation, un phénotype comparable au comportement atrétique des follicules ovariens des mammifères. De manière intéressante, les CFs changent leur programme génétique juste avant ce stade, passant de mitotiques à endoréplicatives. Je décrirai maintenant ce processus clé de la maturation des chambres d'œuf, qui fera l'objet de la première partie de mon étude.

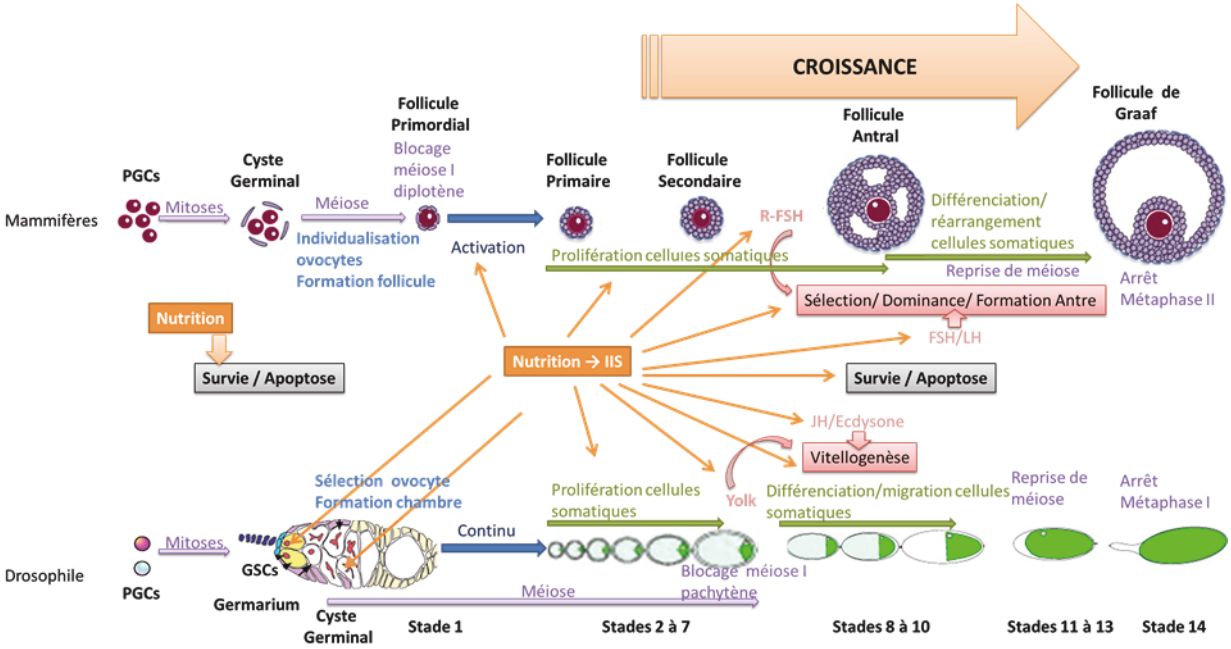


Figure 24 : Schéma récapitulatif des effets de la nutrition et de la signalisation IIS chez les mammifères et chez la drosophile. Chez les deux organismes, IIS contrôle la plupart des étapes de développement des follicules ovariens. On remarquera qu'un mécanisme apoptotique comparable à l'atrésie se met en place chez la drosophile en condition de carence. Il est à noter que chez ces organismes, la carence induit la dégénérescence des stades les plus précoces, mais qu'IIS n'est pas impliquée dans ce mécanisme.

Transition mitose/endocycle des cellules folliculaires

Endocycle

Le passage du cycle mitotique au cycle endoréplicatif des cellules folliculaires (CF) est une étape cruciale dans la maturation des chambres d'œuf. Elle va permettre non seulement la différenciation des CF, mais également leur croissance (Sun and Deng, 2005). En effet, l'accroissement du contenu en ADN des cellules est une stratégie commune permettant la différenciation des tissus (Royzman and Orr-Weaver, 1998). Pour ce faire, le cycle cellulaire est modifié, éliminant la division cellulaire tout en continuant de répliquer l'ADN: c'est l'endocycle (également appelé endoréplication ou endoréduplication). Cet accroissement du contenu génomique, la polyploïdie, entraîne une augmentation du potentiel transcriptionnel des cellules, qui portent de nombreuses copies de leurs gènes. L'endoréplication est donc également en relation étroite avec la croissance des cellules. En effet, la perte de fonction des gènes qui contrôlent l'endocycle, notamment ceux impliqués dans la réplication de l'ADN, entraîne une diminution de la croissance cellulaire et des organismes. Inversement, la perte de fonction des gènes contrôlant la croissance bloque l'endocycle (Edgar and Orr-Weaver, 2001). Des études montrent que pertes et gains de fonction de la voie IIS inhibent ou activent l'endoréplication des CFs, respectivement (Cavaliere et al., 2005; Tamori and Deng, 2013). La quantité d'ADN générée par les endocycles est variable selon les types cellulaires, pouvant atteindre jusqu'à 2048 copies du génome. Les CFs entreprennent 3 cycles d'endoréplication entre les stades 7 et 10, générant ainsi 16 copies d'ADN génomique (Lopez-Schier and St Johnston, 2001).

Le cycle cellulaire est largement dépendant de l'activité des complexes protéiques Cyclines/ Cdk (Cyclin dependent kinase). Ces complexes régulent la transcription des gènes nécessaires à la progression de chaque phase G1, S, G2 et M du cycle cellulaire, ainsi que l'expression de Cyclines/ Cdk spécifiquement requises lors de la transition aux phases suivantes (Figure 25). De nombreux régulateurs protéiques contrôlent l'activité de ces complexes.

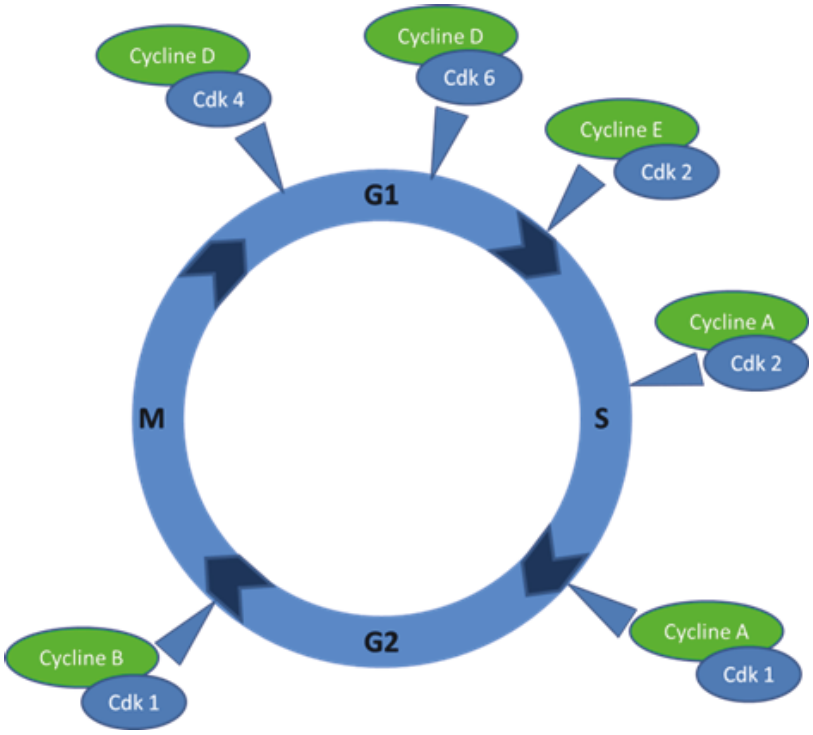


Figure 25 : Différentes cyclines et Cdk régulent la progression du cycle cellulaire. Ces étapes séquentielles dépendent chacune de l'achèvement de la précédente.

L'établissement de l'endocycle requiert l'inhibition du complexe Cycline B/ Cdk1 nécessaire à la transition G2/ M, ainsi que l'activation du complexe Cycline E/ Cdk 2 impliqué dans la transition G1/ S. De cette manière, le cycle cellulaire ne comprend plus que les phases G et S, répliquant l'ADN sans entrer en mitose. Différents types d'endocycle existent en fonction de la manière dont les cellules entrent et sortent des phases de croissance en évitant la mitose (Edgar and Orr-Weaver, 2001). Les CFs sortent en G2 et entrent directement en G1 (Shcherbata et al., 2004). Pour ce faire, elles induisent la protéolyse de la Cycline B, régulatrice de la mitose, ainsi que celle de la Cycline A, régulatrice des phases S et G2 (Figure 26).

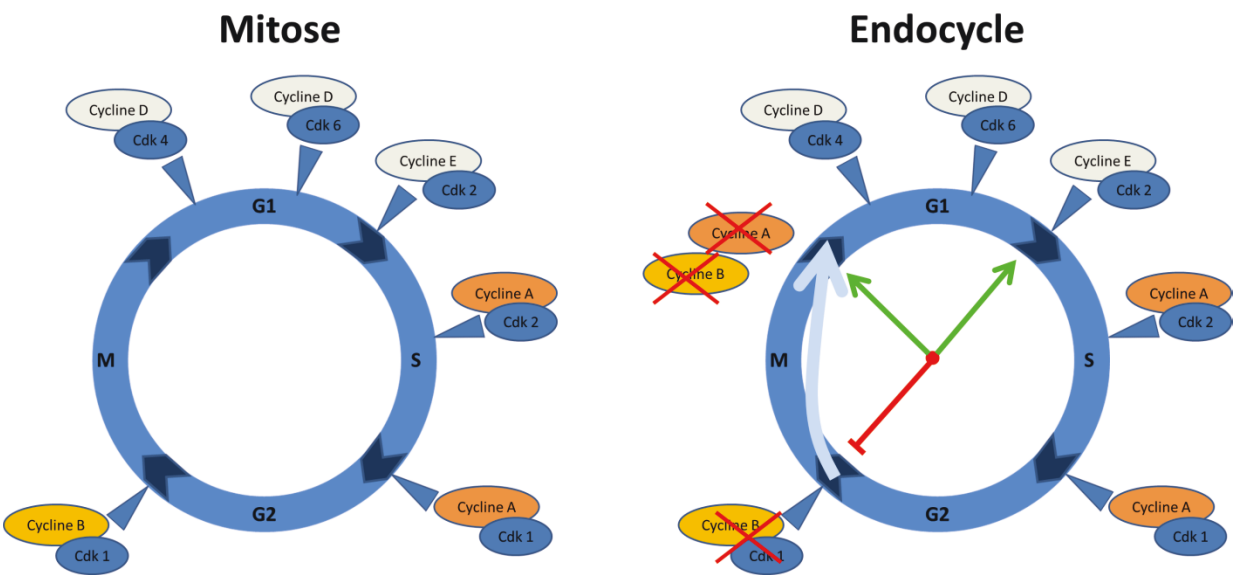


Figure 26 : Passage du cycle mitotique au cycle endoréplicatif. Les cellules activent le complexe Cycline E/Cdk 2 pour forcer la transition G1/S. Le complexe Cycline B/Cdk1 est inhibé de manière à éviter la mitose. Les Cyclines A et B sont ensuite dégradées de manière à osciller entre une phase G et une phase S. Les flèches rouges et vertes au centre du cycle indiquent les transitions de phases affectées lors du passage à l'endocycle. La flèche bleu clair indique que les cellules évitent la phase M.

Durant les stades 1 à 6, les CFs entreprennent 8 ou 9 cycles de mitose, de manière à générer un épithélium composé de 650 cellules environ. Différentes voies de signalisation contrôlent la prolifération des CFs, notamment celles de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et Hh (Hedgehog) (Jordan et al., 2006; Sun and Deng, 2007; Zhang and Kalderon, 2000). La transition mitose/ endocycle, qui prend place entre les stades 6 et 7, est contrôlée par la voie de signalisation Notch. Elle agit à la fois en amont de Hh et en parallèle de JNK, pour inhiber leur effet prolifératif. Elle régule également les composants du cycle cellulaire nécessaires à l'établissement de l'endocycle.

La voie de signalisation Notch

La protéine Notch a d'abord été mise en évidence chez la drosophile, sa mutation entraînant des encoches irrégulières à la marge des ailes (Mohr, 1919; Morgan, 1910). Les membres de sa voie de signalisation ont par la suite été décrits, leur perte de fonction engendrant des phénotypes « neurogènes », c'est-à-dire la production de tissus neuronaux au détriment des tissus épidermiques (Vassin et al., 1985). Outre son rôle dans la formation du système nerveux, la voie de signalisation Notch est maintenant connue pour son rôle pléiotrope. Conservée au cours de l'évolution, elle détermine notamment les patrons d'expression en contrôlant la différenciation des cellules. Elle maintient également les cellules souches et régule leurs divisions asymétriques (Perdigoto and Bardin, 2013). Au cours de l'ovogenèse chez la drosophile, la voie Notch maintient les GSCs, spécifie différents types cellulaires et régule la migration des cellules folliculaires et des cellules de la bordure. Elle participe également à l'établissement de l'axe antéro-postérieur des chambres d'œuf ou encore à la formation des appendices dorsaux (Xu and Gridley, 2012).

Notch est un récepteur transmembranaire codé par un gène unique chez la drosophile, contre 4 chez les mammifères. Il est activé par des ligands, transmembranaires également, de la famille DSL (Delta et Serrate chez la drosophile, Lag-2 chez *C. elegans ;* Delta-like1,3,4 et Jagged 1,2 chez les mammifères) présents à la surface des cellules adjacentes. L'interaction ligand/récepteur induit une série de clivages protéolytiques. Un complexe de métallo protéases (Kuzbanian/ ADAM10 et TACE/ ADAM17) clive Notch dans sa partie extracellulaire, formant un fragment transmembranaire et intracellulaire, N^{ext}. Le fragment transmembranaire de N^{ext} est alors le substrat d'un complexe -sécrétase, comprenant Presenilin (Psn), Nicastrin (Nct), Presenilin enhancer 1 et 2 (Aph-1 et Pen-2). Le clivage de la -sécrétase peut s'effectuer à la membrane ou encore au cours de l'endocytose du récepteur ainsi internalisé, générant le fragment actif N^{intra}. Ce dernier transloque au noyau, où il induit un switch transcriptionnel. Il forme un complexe avec le facteur de transcription Supressor of Hairless (Su(H) ; CBF/RBPJ chez les mammifères), inhibant l'interaction de ce dernier avec des répresseurs transcriptionnels ubiquitaires comme NCoR (Nuclear receptor corepressor), et les HDAc (histon deacétylase). En retour, le complexe

N^{intra} / Su(H) recrute des co-activateurs, notamment MAM (Mastermind) et des protéines à activité histone acétyl transférase (HAc) comme CBP/P300 (Creb Binding Protein), activant ainsi la transcription de ses gènes cibles (Figure 27).

La voie de signalisation Notch est extrêmement complexe. De nombreuses protéines régulent sa biosynthèse et modifient l'activité du récepteur ou son affinité pour ses ligands, impliquant différentes modifications post-traductionnelles autres que les clivages. L'endocytose du récepteur et de ses ligands, ainsi que leur dégradation, jouent également un rôle majeur dans cette voie de signalisation. Par ailleurs, l'effet des ligands sur les récepteurs est variable et dépend des niveaux d'expression de chacun au sein des cellules (Sprinzak et al., 2010). Par exemple, Delta active Notch en trans- mais l'inhibe en cis-. Nombre d'autres régulations ligands/récepteurs en cis ou en trans ont été décrites, bien que leur implication physiologique reste encore mal comprise (del Alamo et al., 2011).

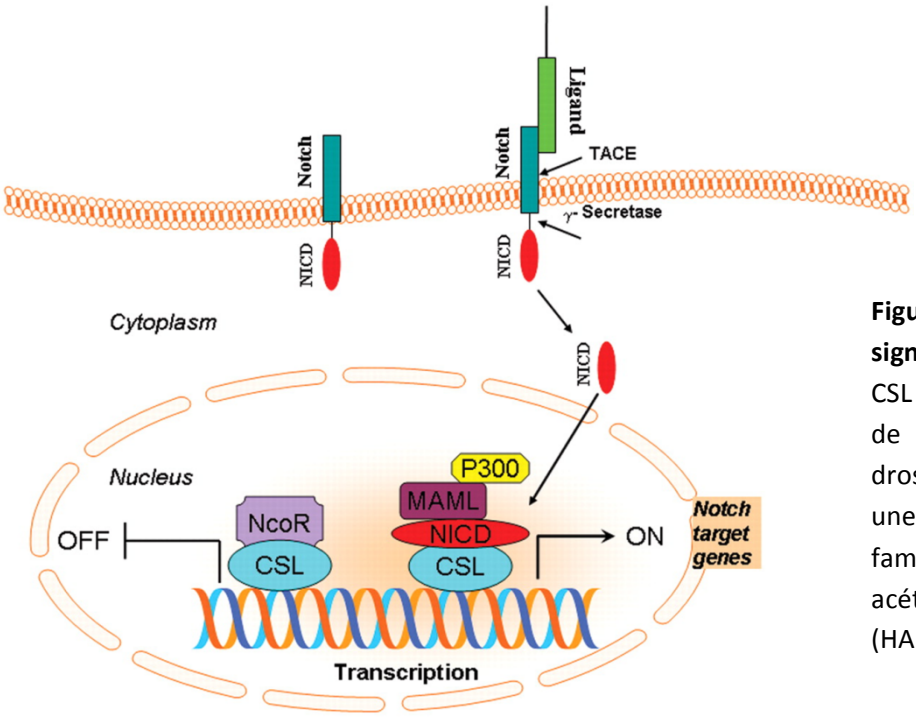


Figure 27 : La voie de signalisation Notch. CSL est l'homologue de Su(H) chez la drosophile. P300 est une protéine de la famille des histones acétyl transférase (HAc).

Signalisation Notch et transition mitose/ endocycle

Notch et Su(H)/CSL sont exprimés dans les CF dès les premiers stades de développement des chambres d'œuf (Sun and Deng, 2005). Cependant, cette voie de signalisation est activée précisément du stade 6/7 jusqu'au stade 8. Par la suite, l'activité de Notch diminue progressivement jusqu'au stade 10, où son inhibition est requise pour l'amplification génique (Sun et al., 2008). Cette activation dynamique de Notch est rendue possible par l'expression de son ligand Delta, qui agit à la fois dans les CF et les cellules germinales. Delta est exprimé dans les deux types cellulaires à partir du stade 5, son expression étant maximale au stade 6/7. La perte de fonction de Notch dans les CF mime la perte de fonction de Delta dans les cellules germinales, à savoir le blocage de l'entrée en endocyle des CF (Deng et al., 2001; Lopez-Schier and St Johnston, 2001). Inversement, l'expression ectopique de Delta dans les cellules germinales des chambres d'œuf précoces génère une entrée anticipée des CF en endocycle (Jordan et al., 2006). Notch est donc activé en trans- dans les CF par Delta en provenance des cellules germinales.

Par ailleurs, la perte de fonction de Delta dans les CF induit d'une part une activation précoce de Notch, associée à une entrée anticipée des CF dans l'endocycle, et d'autre part une extension de l'activité de Notch durant des stades plus tardifs. Delta a donc également un rôle cis-inhibiteur de Notch dans les CF, restreignant son activation aux stades 6-8 et participant à son inhibition dans les stades tardifs (Poulton et al., 2011) (Figure 28).

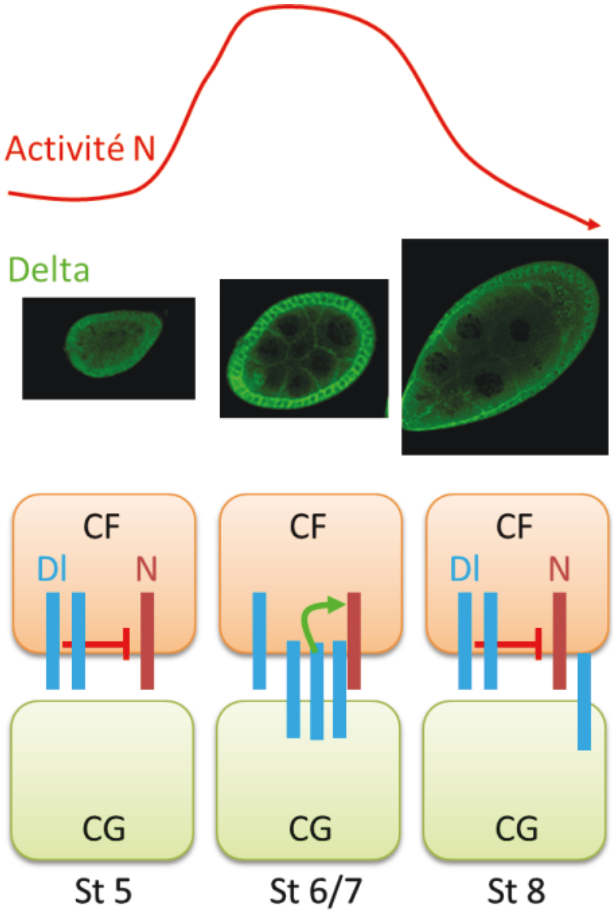


Figure 28 : Activation de Notch (N) entre les stades 6/7 et 8. Elle résulte des effets inhibiteurs et activateurs de Delta (Dl), respectivement en provenance des cellules folliculaires(CF) et des cellules germinales (CG)

Au stade 6/7, Notch induit l'expression d'un facteur transcription à doigt de Zinc codé par *hindsignt (hnt)* dans les CFs. Perte de fonction ou expression ectopique précoce de Hnt respectivement bloquent ou anticipent l'entrée des CFs en endocycle, attestant de son importance lors de la transition mitose/endocycle. Hnt supprime l'effet pro-mitotique de Hh en inhibant la transcription de *cubitus interruptus (ci)*, un facteur de transcription canonique en aval de cette voie de signalisation.

En parallèle, Hnt inhibe cdc25/string (stg) (Sun and Deng, 2007), un régulateur positif du complexe cycline B/ Cdk1 requis pour l'entrée en mitose (Edgar and O'Farrell, 1990), qui n'est alors plus possible (Figure 29). La surexpression de stg n'est cependant pas suffisante

pour maintenir les CF en division en présence de Hnt (Schaeffer et al., 2004), suggérant que d'autres régulateurs du cycle cellulaire sont contrôlés par Hnt. En effet, Hnt inhibe également le facteur de transcription homéotique Cut, processus clé lors de la transition mitose/ endocycle (Sun and Deng, 2007) (Figure 25).

La perte de fonction de Cut entraîne l'entrée précoce des CF en endocycle, tandis que sa persistance empêche l'endoréplication. La co-expression ectopique de Cut et Stg induit un cycle de mitose supplémentaire. Cut inhibe l'expression d'une protéine à domaine WD codée par *fizzy-related* (*fzr*), requise pendant la phase G1 (Sun and Deng, 2005). Fzr/cdh1 est un adaptateur de l'Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), un complexe à activité ubiquitine E3 ligase, qui induit ainsi la protéolyse des régulateurs de la mitose tels les Cyclines A ou B (Schaeffer et al., 2004; Sigrist and Lehner, 1997). L'inhibition de Cut, qui permet l'expression de Fzr, induit donc la transition M/G1 (Figure 29).

Les rôles respectifs de Hnt et Cut dans la régulation de Stg et Fzr sont clairement montrés. La co-expression de Hnt et Cut ne permet pas l'activation de Fzr, comme c'est le cas de la surexpression de Hnt seul. Ces résultats indiquent donc une relation épistatique de ces gènes, où Hnt régule Fzr au travers de l'inhibition de Cut. Concernant *stg*, son expression reste inchangée après surexpression de Cut tandis qu'elle est inhibée par Hnt, suggérant une relation directe entre Hnt et string (Sun and Deng, 2005, 2007).

Cependant, Fzr est également impliqué dans la protéolyse de Stg dans l'épiderme embryonnaire (Reber et al., 2006). La transition mitose/ endocycle pourrait donc être assurée strictement par la répression de Cut, induisant l'expression de Fzr et la dégradation de Stg. En concordance avec cette hypothèse, l'inhibition de Cut est nécessaire et suffisante pour la transition mitose/ endocycle.

Enfin, la voie de signalisation Notch promeut la réplication de l'ADN en inhibant Dacapo (Dap)/ P21, un répresseur du complexe Cycline E/ Cdk2 (Shcherbata et al., 2004). Ce dernier est nécessaire à la transition G1/S (Figure 29). Cette régulation semble cependant indépendante de Hnt/ Cut. Ainsi, l'activation de la voie Notch au stade 6/7 induit, d'une part la répression de Stg et par conséquent le blocage de la transition G2/M, d'autre part

l'activation de Fzr qui promeut le passage M/G1, et enfin l'inhibition de Dap, ce qui engendre la transition G1/S. Les CFs entrent donc dans un cycle G/S, c'est l'endocycle.

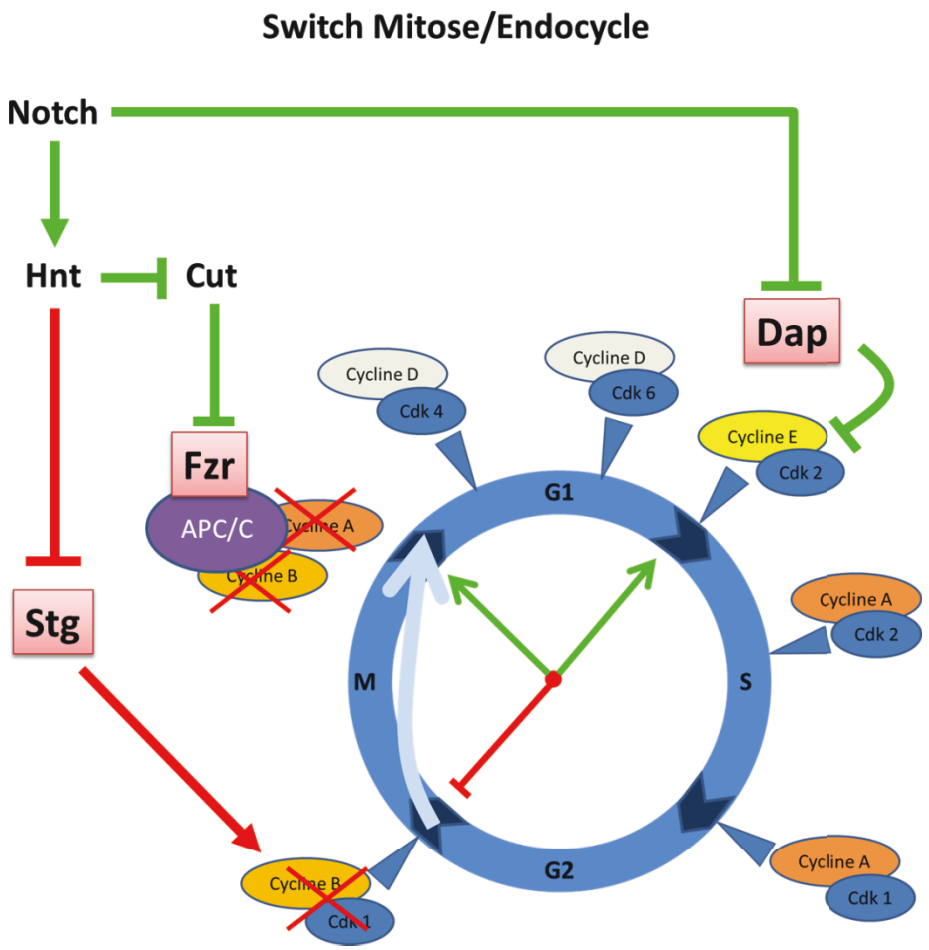


Figure 29 : Signalisation Notch et transition mitose/endocycle. Notch induit la transition G1/S en inhibant Dacapo (Dap). La mitose est évitée au travers de l'inhibition de String (Stg) par Hindsight (Hnt). Le cycle G/S est induit par la dégradation des cyclines A et B au travers de l'activation de Fizzy-related (Fzr). Les circuits de flèches vertes et rouges indiquent les signaux aboutissant aux modifications des transitions entre les phases indiquées au centre du cycle.

Cette régulation complexe de la transition mitose/ endocycle permet donc de déterminer la « fenêtre temporelle » dans laquelle cette phase cruciale de maturation doit être mise en place. Cependant, la vitesse de développement des chambres d'œuf est largement dépendante de la voie de signalisation IIS. Il est donc envisageable que le processus de transition mitose/ endocycle intègre ces signaux métaboliques, toujours dans le but de coordonner nutrition, croissance et développement des chambres d'œuf, ce qui fera l'objet de notre étude.

La migration des Cellules de la Bordure

Introduction

Passée cette transition mitose/ endocycle discutée ci-dessus, les Cellules folliculaires (CF) entrent dans une phase de croissance et de maturation (Sun and Deng, 2005). En seconde partie de notre étude, nous nous intéresserons en particulier à un groupe de CF spécifiées, les Cellules de la Bordure (CB). Après une étape de migration, elles participent avec d'autres types cellulaires à la morphogenèse du micropyle, par lequel passent les spermatozoïdes, assurant ainsi la fécondabilité de l'œuf (Bishop and King, 1984). Le « timing » de la migration des CB est bien contrôlé génétiquement, de manière à intervenir spécifiquement au stade 9 (Figure 30) (Montell et al., 1992).

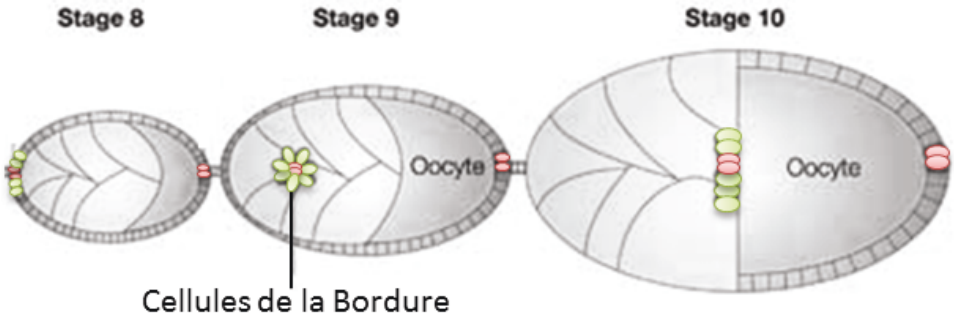


Figure 30 : Migration des cellules de la Bordure. Les Cellules de la Bordure se forment au stade 8. Elles migrent au travers des cellules nourricières au stade 9 pour atteindre le pôle antérieur de l'ovocyte au stade 10 où elles perceront le canal du micropyle. (D'après (Montell, 2003)).

Cependant, aucune donnée n'est connue sur l'intégration des paramètres nutritionnels ou des signaux de la voie IIS lors du déclenchement de cette migration. Durant une période de carence, les stades vitellogéniques sont bloqués, un nombre significatif de

chambres d'œuf dégénère, et la ponte est pratiquement stoppée. Pourtant, il n'a jamais été reporté que les rares œufs pondus dans ces conditions soient stériles. De plus, un retour à un régime riche induit la reprise de l'ovogenèse (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001), et une fois encore, une stérilité de tels œufs ayant subi la carence n'a jamais été notée. Ceci suggère donc que les paramètres nutritionnels sont pris en compte dans le couplage de la migration des CB avec le développement de la chambre d'œuf, hypothèse qui fait l'objet de la seconde partie de notre étude.

Spécification des Cellules de la Bordure

La formation du groupe des CB résulte d'un processus morphogénétique régulé par les Cellules Polaires (CPs). Les CPs sont spécifiées aux pôles antérieurs et postérieurs des chambres d'œuf dès les premiers stades de développement, jouant le rôle de centre organisateur de cette structure (Grammont and Irvine, 2002). Deux d'entre elles sont sélectionnées à chaque pôle suivant un processus apoptotique régulé par la voie Notch (Grammont and Irvine, 2001; Vachias et al., 2010).

Au stade 8, les CP antérieures sécrètent la cytokine Unpaired (Upd), dont le gradient active différenciellement la voie de signalisation JAK/STAT (Janus kinase/Signal Transduction and Activator of Transcription) dans les CF. L'activation de JAK/STAT, maximale dans les CF adjacentes aux CPs, induit leur différenciation en Cellules de la Bordure externe (CBe) (Silver and Montell, 2001). L'ensemble des CPs et des CBe forme le groupe des CB (Figure 31). Les deux paires de CPs antérieures et postérieures sécrètent Upd, mais les CB ne sont spécifiées qu'au pôle antérieur. En effet, au pôle postérieur, l'ovocyte sécrète le ligand Gurken, homologue des TGF-alpha, activant la signalisation du récepteur EGF (EGFR) dans les CF qui se différencient en cellules postérieures, au détriment de la formation de CBs (Gonzalez-Reyes et al., 1995).

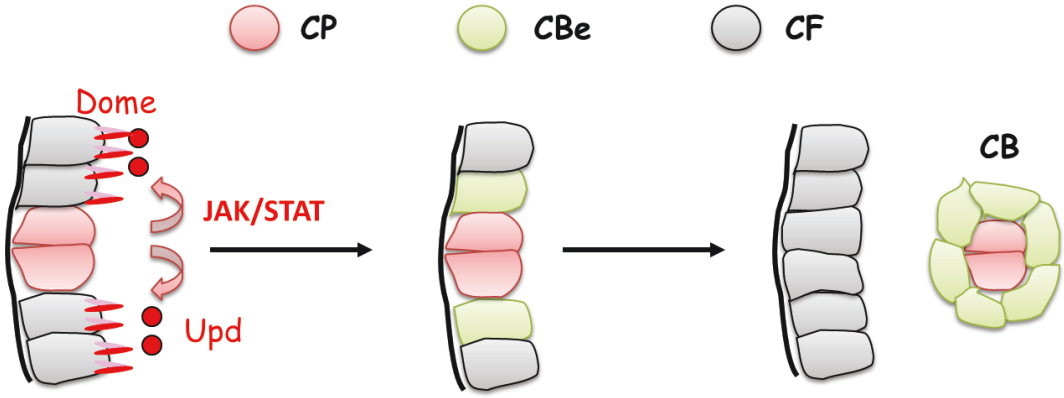


Figure 31 : Spécification des Cellules de la Bordure (CB). Au stade 8, la sécrétion d'Unpaired (Upd) par les Cellules Polaires (CP) induit la spécification des Cellules Folliculaires (CF) en Cellules de la Bordure externe (CBe). Le groupe des Cellules de la Bordure (CB) est formé par l'ensemble des CB et des CP. Les CB délaminent au stade 9. Dome est le récepteur de la voie JAK/STAT.

La voie de signalisation JAK/STAT est conservée au cours de l'évolution et contrôle prolifération, survie et différenciation cellulaire (Figure 32). Upd se fixe sur son récepteur Domeless (Dome), activant ainsi Hopscotch (Hop), orthologue de JAK, qui phosphoryle le facteur de transcription Stat92E (Ghiglione et al., 2002). Ce dernier transloque au noyau et induit l'expression de ses gènes cibles. Lors de la différenciation des CBe, Stat92 active en particulier *slow border cells* (*slbo*), qui code pour un facteur de transcription homologue des C/EBPs des mammifères. Slbo est essentiel au comportement invasif des CB (Montell et al., 1992).

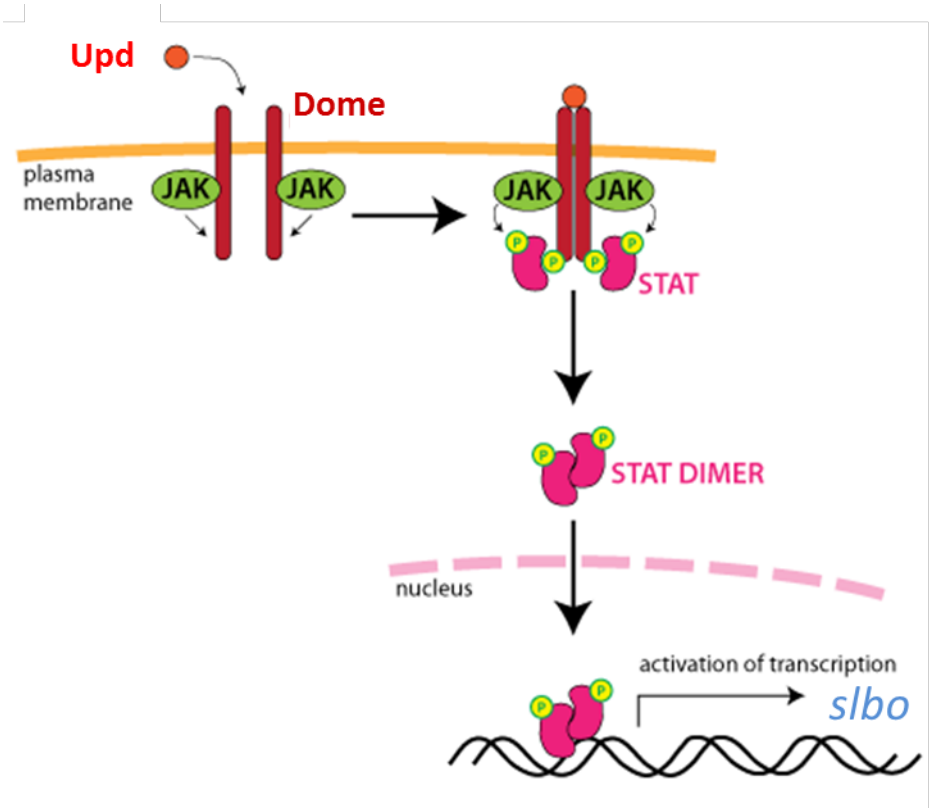


Figure 32 : La voie de signalisation JAK/STAT dans les chambres d'oeuf. (Voir texte ci-dessus pour la description)

Les CPs spécifient entre 6 et 8 CBe. Excès ou déficit de recrutement de ces cellules induit des défauts de migration des CB, entraînant la stérilité (Silver et al., 2005). La perte de fonction de la voie de signalisation JAK/STAT bloque la différenciation des CBe et sa surexpression induit le recrutement et la migration de CBe ectopiques (Silver and Montell, 2001). Le gradient d'Upd, ainsi que l'activité JAK/STAT, sont donc finement contrôlés dans l'espace de manière à définir un nombre approprié de CBe (Figure 33). Dans cette optique, une boucle de régulation mettant en jeu le facteur de transcription Apontic (Apt) et le micro ARN miR-279, réduit l'activation de JAK/STAT dans les CF distales du gradient d'Upd (Starz-Gaiano et al., 2008; Yoon et al., 2011). En parallèle, l'activité JAK/STAT est potentialisée dans les CF proximales, futures CBe. Pour ce faire, la sécrétion apicale d'Upd est optimisée par des mécanismes post-transcriptionnels de localisation des ARNm *upd* (Van de Bor et al., 2011).

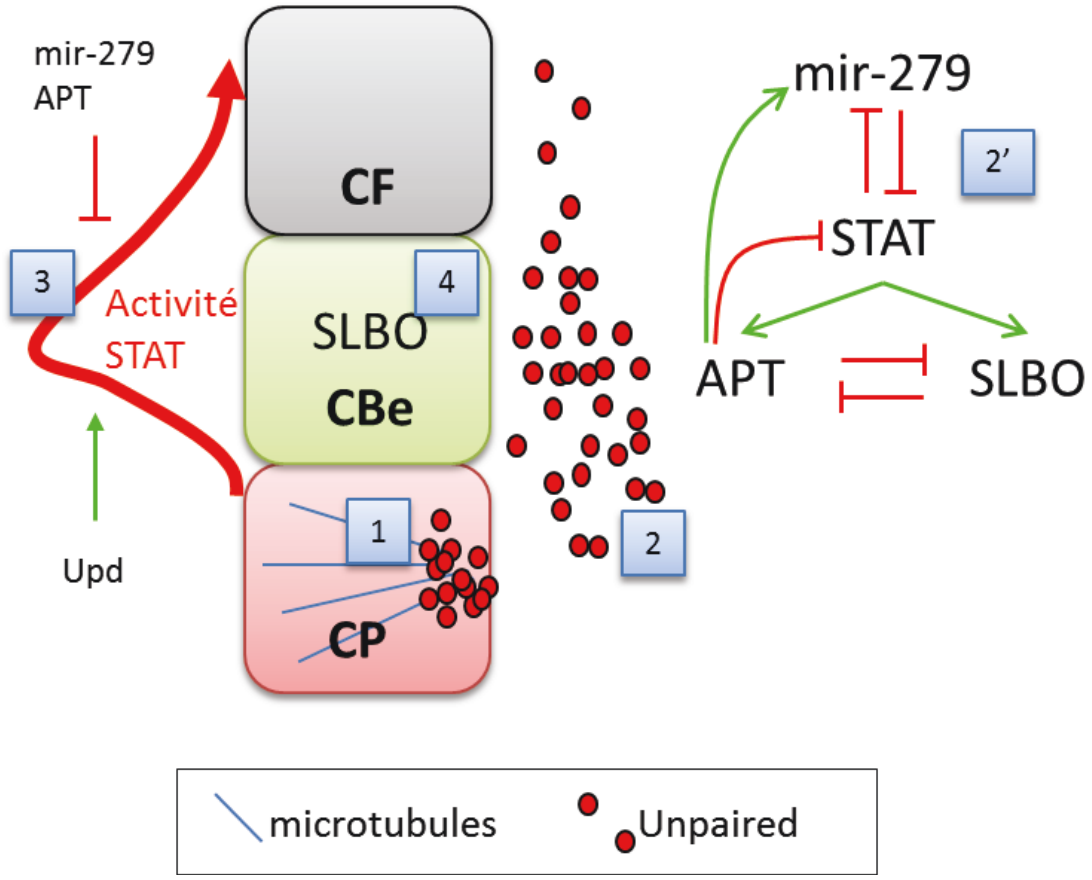


Figure 33 : Régulation du gradient d'activité de JAK/STAT. La localisation apicale des ARNm *unpaired* (*upd*) *via* leur transport par les microtubules (1) permet la sécrétion massive de la cytokine (2). Le gradient d'Upd est donc plus concentré dans les cellules folliculaires (CF) adjacentes aux cellules polaires. En parallèle, une boucle de régulation génique (2') limite l'activité de STAT dans les cellules distales. Il en résulte une activité de STAT maximale dans les cellules adjacentes aux CP (3). Ces dernières maintiennent l'expression de *slbo* et se différencient en CBe (4).

Migration des Cellules de la Bordure

Une fois formées, les CB délaminent au stade 9 suivant une transition de type « épithélium/mésenchyme ». Elles migrent en cohorte au travers des cellules nourricières pour atteindre le pôle antérieur de l'ovocyte au stade 10. Au cours de la migration des CB, les CP gardent une position centrale, tandis que les CBe changent de position au sein du cluster, créant ainsi un mouvement de rotation autour des CP (Prasad and Montell, 2007). Contrairement à l'invasion d'un tissu par des cellules isolées, les CB conservent une forme de polarité, inhérente et nécessaire à leur migration collective. En résumé, deux complexes protéiques majeurs, Bazooka/Par-6/aPKC et Scrib/Discs-large/Lethal Giant Larvae, maintiennent des jonctions cellulaires (jonctions adhérentes/*zonula adherens*) qui définissent respectivement les pôles apicaux et baso-latéraux des cellules folliculaires (Figure 34) (Bilder and Perrimon, 2000; Tanentzapf and Tepass, 2003). Le pôle apical fait face aux cellules germinales, tandis que le pôle baso-latéral fait face à la membrane basale, extérieure à la chambre d'œuf.

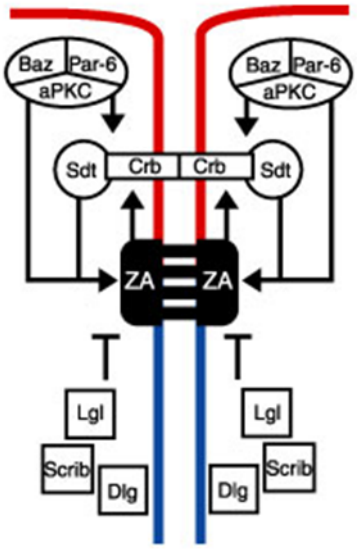


Figure 34 : Polarité des Cellules Folliculaires. Les complexes Bazooka/Par-6/aPKC et Scrib/Discs-large/Lethal Giant Larvae définissent les jonctions adhérentes (ZA). Crumbs (Crb) et stardust (sdt) sont des déterminants apicaux. (Tanentzapf and Tepass, 2003)

Une réorganisation fine des molécules du complexe Bazooka/Par-6/aPKC et une diminution de l'expression des composants Scrib/Discs-large/Lethal Giant Larvae permet la restructuration de la membrane basolatérale, nécessaire pour la localisation appropriée des protéines membranaires contrôlant la migration des CB (Szafranski and Goode, 2007). De ce fait, la perte de fonction des protéines formant le complexe Bazooka/Par-6/aPKC perturbe largement la migration (Pinheiro and Montell, 2004). A l'inverse, la perte de fonction du complexe Scrib/Discs-large/Lethal Giant Larvae induit des mouvements cellulaires ectopiques au sein des CF et des CB, et la désorganisation de l'épithélium folliculaire (Bilder et al., 2000; Goode and Perrimon, 1997).

La conservation de cette polarité permet le maintien et l'organisation des protéines d'adhésion (dont celles formant les jonctions cellulaires), mécanisme crucial de la migration. Ainsi, l'horthologue de la E-Cadhérine chez la drosophile (DE-Cad), Crumbs, α-caténine et Armadillo (β-Caténine), maintiennent la cohésion des CB et participent à leur caractère invasif. Par exemple, la DE-Cadhérine (qui forme les jonctions adhérentes), cible majeure de Slbo, est une protéine d'adhésion homophilique, exprimée à la fois par les CB et les cellules nourricières. De cette interaction, entre DE-Cad des deux types cellulaires, naît des forces de traction, permettant aux CB de progresser au travers des cellules nourricières. La perte de fonction de DE-Cad, dans l'un ou l'autre de ces tissus, bloque la migration (Niewiadomska et al., 1999).

Un autre processus essentiel à la migration des CB est la réorganisation du cytosquelette d'actine (Figure 35). La CBe la plus postérieure étend une projection cytoplasmique riche en actine, au travers des cellules nourricières et en direction de l'ovocyte. Ces « Long Cellular Extension » (LCE), participent largement au caractère invasif des CB (Fulga and Rorth, 2002).

Le cytosquelette d'actine est composé de monomères d'actine-G couplés à l'ADP, dont l'assemblage forme l'actine filamenteuse (actine-F) couplée à l'ATP. L'actine-F est polymérisée à l'extrémité qui fait face à la membrane plasmique, tandis que l'hydrolyse de l'ATP à son extrémité cytosolique induit sa dépolymérisation. Le dynamisme de cette structure est régulé par des signaux extracellulaires, qui contrôlent l'activité des molécules régulant polymérisation et dépolymérisation de l'actine. En fonction de ces signaux, le

complexe WASp/Scar/Arp2-3 induit la nucléation des monomères d'actine. A l'inverse, la Cofiline, codée par *enable*, régule sa dépolymérisation (Kiehart and Franke, 2002). La Profiline, codée par *chickadee*, est une protéine cruciale, qui fait le pont entre ces deux mécanismes. Elle prend en charge l'actine-G-ADP formé par la Cofiline, et catalyse l'échange nucléotidique pour générer l'actine-G-ATP, qui servira en retour de substrat au complexe Arp2/3. De ce fait, la mutation de *chickadee* dans les CB bloque leur migration (Verheyen and Cooley, 1994), en inhibant la polymérisation de l'actine. Les myosines et la petite GTPase Rac sont respectivement impliquées dans la contractilité et la réorganisation du cytosquelette d'actine, régulant ainsi le dynamisme des LCE. Sous contrôle de stimuli extracellulaires, Rac agit notamment au travers du complexe WASP/Scar. Ce dynamisme est essentiel, permettant autant de tracter les CB que de les orienter au sein des cellules nourricières.

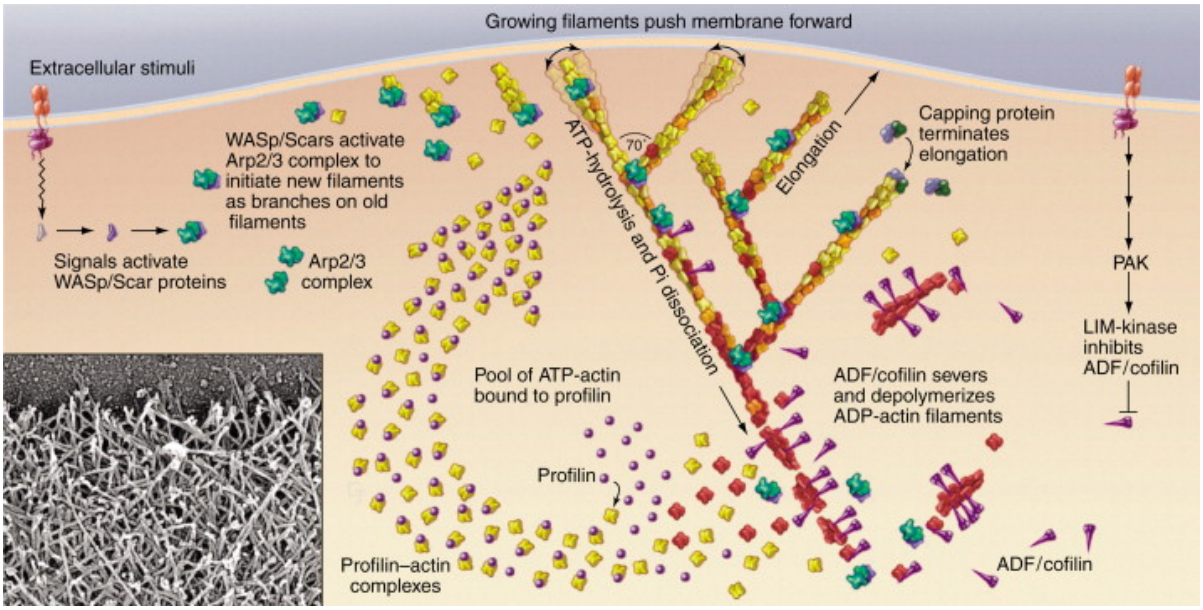


Figure 35: Polymérisation de l'actine. Au front de migration, les complexes profiline/monomères d'actine (G-Actine) sont polymérisés par Arp2/3 pour former les filaments d'actine (ATP-F-Actine), qui poussent la membrane. Arp2/3 est régulé par des protéines WASp, qui sont sensibles aux signaux extracellulaires. Des protéines de la coiffe contrôlent l'arrêt de l'élongation (capping protein). L'actine polymérisée hydrolyse l'ATP. L'ADP-F-Actine est le substrat de la cofiline, qui dépolymérise les filaments. La cofiline est sensible aux mêmes signaux extracellulaires qu'Arp2/3. Ils induisent sa phosphorylation et son inhibition, maintenant ainsi l'élongation des filaments d'actine. Les monomères ADP–G-Actine se lient à la Profiline, qui induit leur conversion en ATP-D-Actine. Ces derniers sont réutilisés au front de migration. La photographie de microscopie électronique montre un réseau d'actine polymérisée au front de migration d'une cellule. (D'après (Kiehart and Franke, 2002)).

L'ensemble de ces acteurs principaux de la migration des CBs est contrôlé par un large panel de voies de signalisation, souvent redondantes dans le contrôle de leurs gènes cibles, ce qui assure la robustesse du mécanisme. Par ailleurs, polarité, adhésion et dynamisme du cytosquelette d'actine sont des processus interdépendants. Par exemple, la perte de fonction de la voie de signalisation JAK/STAT dans les CB délocalise Bazooka et Par-6, entraînant une distribution anormale de la DE-Cadhérine, ce qui inhibe la formation des LCE (Fulga and Rorth, 2002; Pinheiro and Montell, 2004).

La migration des CB est orientée. Elles empruntent systématiquement une trajectoire directe au travers les cellules nourricières. Ce comportement est rendu possible par un gradient de molécules de guidage sécrétées par l'ovocyte : PVF1, Keren et Spitz (Duchek and Rorth, 2001; Duchek et al., 2001; McDonald et al., 2006). PVF1 active le récepteur PVR (platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor receptor, homologue des récepteurs PDGF et VEGF) dans les CB, tandis que Keren et Spitz y activent EGFR. Ces récepteurs tyrosine kinase fonctionnent de manière redondante dans le guidage des CB. Une source ectopique de leurs ligands déroute les CB, tandis que l'expression de formes dominantes négatives de leurs récepteurs dans les CB induit la formation anarchique de LCE, ralentissant sérieusement leur migration (McDonald et al., 2006; Prasad and Montell, 2007). L'activation élevée de PVR et EGFR au front de migration, au plus proche de la source du gradient, induit l'activation maximale de Rac dans la CBe la plus en avant. Cette activité asymétrique donne la direction à suivre. Rac réorganise le LCE en fonction de l'information directionnelle, tandis qu'elle est relayée au sein du cluster par la voie de signalisation JNK (Wang et al., 2010).

Stéroïdes et déclenchement de la migration

Un aspect essentiel de la migration des CB est qu'elle doit être coordonnée au développement de la chambre d'œuf. Le déclenchement de leur délamination est donc finement contrôlé dans le temps, notamment par l'ecdysone (Bai et al., 2000). Chez la

drosophile, la signalisation ecdysone est contrôlée par un récepteur nucléaire hétéromérique, codé par *ecdysone receptor* (*EcR*) et *ultraspiracle* (*usp*), homologue des récepteurs RXR chez les mammifères (Thomas et al., 1993). Taiman (Tai), homologue d'AIB1, agit en tant que co-activateur de ce complexe transcriptionnel (Bai et al., 2000), dont les gènes cibles sont largement inconnus dans les ovaires. La mutation de TAI et USP dans les CB bloque leur migration, et l'utilisation d'un allèle thermosensible de l'ecdysone à température restrictive la retarde ; notamment à cause d'une accumulation anormale de DE-Cadhérine.

L'ecdysone semble être sécrétée par les ovaires entre les stades 9 et 10, quoique la spécificité des tissus exprimant cette hormone et les mécanismes permettant son expression temporelle spécifique soient mal compris. La signalisation ecdysone est cependant maximale dans les CF antérieures de la chambre d'œuf au stade 9, correspondant au déclenchement de la migration (Jang et al., 2009). Une boucle de régulation mettant en jeu le facteur de transcription BTB Abrupt (Abt), permet alors de coupler les informations spatiales de la voie de signalisation JAK/STAT et temporelles de l'ecdysone (Figure 36). Abt, ubiquitaire dans les chambres d'œufs, inhibe la signalisation ecdysone au travers de TAI, et indépendamment la migration des CB. En retour, il est réprimé à la fois par les signalisations JAK/STAT et ecdysone. Au stade 9, leur activité est maximale et relève le blocage d'ABT spécifiquement dans les CB, assurant la migration d'un nombre approprié de cellules, dans un « timing » correct (Jang et al., 2009).

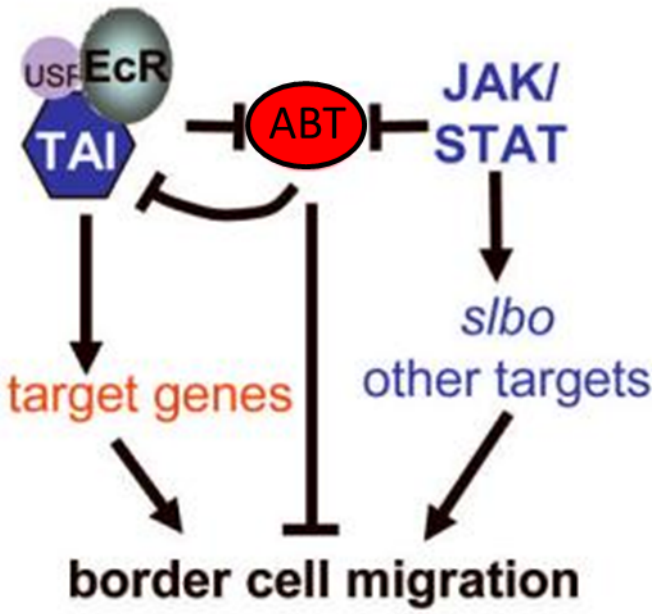


Figure 36 : Coordination spatio-temporelle de la migration des cellules de la Bordure.

Voir description dans le texte ci-dessus. **(**D'après (Jang et al., 2009)).

La migration des CB est un processus robuste et finement régulé par différentes voies de signalisations qui interagissent. Celle de l'ecdysone y joue un rôle particulier, permettant le contrôle précis du temps de déclenchement de la migration. Les mécanismes conduisant à l'activation spécifique de la signalisation ecdysone durant les stades vitellogéniques restent cependant mal compris. L'ecdysone est sécrétée d'une part de manière systémique par la glande en anneau, et d'autre part de manière localisée dans les ovaires, sous l'effet de l'hormone juvénile (JH) et durant les stades où elle est requise. L'activation de la voie à des stades spécifiques, parmi une population hétéroclite de chambres en développement, suggère donc l'existence d'un contrôle intra-ovarien, grâce auquel seules les chambres d'œuf aux stades requis sont sensibles à la JH, induisent la synthèse d'ecdysone et y répondent.

Par ailleurs, les facteurs environnementaux, et notamment la nutrition, affectent largement la production d'ecdysone. Chez l'adulte, sa sécrétion par les ovaires est potentialisée par les nutriments (Schwartz et al., 1985). A l'inverse, la perte de fonction d'IIS réduit la sécrétion d'ecdysone par les chambres d'œuf (Tatar et al., 2001; Tu et al., 2002).

L'effet local d'IIS sur la signalisation de l'ecdysone dans les ovaires reste mal compris (Richard et al., 2005), mais il est cependant envisageable que ces hormones coopèrent pour coupler la migration des CB à la croissance des chambres d'œuf.

La voie IIS a déjà été reliée à différents processus d'invasion cellulaire, mettant en jeu des mécanismes indépendants de la production de stéroïdes. En effet, chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, l'activité PI3K est élevée au front de migration des cellules motiles. Le PIP3 ainsi généré localement permet le recrutement de molécules régulant l'actine, incluant notamment Rac ou les complexes WASp/Scar (Sasaki and Firtel, 2006). Outre ce rôle de la PI3K sur la chémotaxie (Firtel and Chung, 2000; Funamoto et al., 2002), les IGFs ont également été reliés à divers processus migratoires. Bien que ces résultats soient corrélatifs, l'IGF-1 pourrait participer à la migration des kératinocytes pendant la cicatrisation, ou encore des cellules endothéliales pendant l'angiogenèse chez l'Homme (Guvakova, 2007). Chez la drosophile, dInR est impliqué dans le guidage des axones, depuis les photorécepteurs jusqu'au cerveau, lors de la mise en place du système visuel (Song et al., 2003).

IIS pourrait ainsi participer à la fois au couplage de la migration des CB avec le développement de la chambre d'œuf, et à la migration des CB proprement dite. Nous avons donc entrepris la caractérisation de son rôle en seconde partie de cette étude.

Résultats

Rôle de la signalisation Insuline lors de la transition mitose/ endocycle

Introduction

La nutrition affecte le développement des follicules ovariens chez les mammifères, et des chambres d'œuf chez la drosophile. Les principales étapes de l'ovogenèse sont comparables entre ces espèces, et reposent sur le développement concomitant de tissus somatiques et germinaux. La maturation des ovocytes nécessite une phase de croissance spectaculaire des follicules, pendant les stades antraux chez les mammifères ou les stades vitellogéniques chez la drosophile, qui reste largement dépendante des conditions de nutrition.

Chez les mammifères, l'atrésie est mise en place afin de conserver uniquement les ovocytes les plus compétents pour l'ovulation. L'état énergétique des individus rend d'autant plus drastique cette sélection. Chez la drosophile, un tel processus sélectif constitutif n'existe pas, mais un mécanisme similaire se met en place en condition de carence nutritive. Chez ces espèces, la voie de signalisation IIS joue un rôle majeur pour relayer les informations nutritionnelles, et son activation est nécessaire au développement des follicules ovariens. En condition de carence, la diminution de son activité affecte largement la balance entre survie et dégénérescence des follicules. La drosophile constitue donc un modèle de choix afin de mieux comprendre comment la voie IIS maintient l'homéostasie au cours de l'ovogenèse, malgré les variations nutritionnelles.

Chez la drosophile, le rôle de la voie de signalisation IIS au cours de l'ovogenèse a principalement été étudié dans la lignée germinale. Très peu de données sont connues sur ses effets dans les cellules somatiques. En condition de carence, les chambres d'œuf progressent à un rythme ralentit jusqu'aux stades vitellogéniques. Durant ces derniers, leur maturation cesse et une grande partie dégénère. De manière intéressante, la transition mitose/ endocycle des cellules folliculaires intervient juste avant ces stades et pourrait donc être impliquée dans le changement de comportement des chambres d'œuf vis-à-vis de la

carence. Cependant, aucun lien n'a encore été montré entre cette transition et la progression de l'ovogenèse dans de telles conditions. Par ailleurs, l'effet d'IIS lors de ce mécanisme n'a jamais été décrit, et son étude pourrait donc permettre d'enrichir nos connaissances sur la contribution des cellules somatiques dans le maintien de l'homéostasie des chambres d'œuf.

Mes travaux ont permis de montrer que la voie de signalisation IIS joue un rôle majeur dans les cellules folliculaires lors de la transition mitose/ endocycle (M/E). La diminution de son activité en conditions de carence permet en effet de bloquer ce processus, arrêtant ainsi le développement des chambres d'œuf. De plus, j'ai pu montrer que ce blocage est rapidement réversible après retour à une alimentation normale. Le facteur de transcription FoxO joue un rôle particulier dans ce mécanisme. Activé suite à la baisse de la signalisation d'IIS, il permet de maintenir d'une part l'expression du facteur de transcription Cut, inhibant ainsi le passage à l'endocycle, et d'autre part l'activation de Notch, ce qui a l'effet inverse. En maintenant ces signaux aux effets antagonistes, FoxO permet l'établissement de ce que nous appelons une « pause de la transition M/E » (PMES : Paused Mitotic to Endocycle Switch). Après retour à une alimentation normale, FoxO est inactivé, l'activité de Notch inhibe celle de Cut et les cellules entrent en endocycle.

Ainsi, arrivées à ce stade de transition M/E, les chambres d'œuf poursuivent leur maturation si les conditions nutritionnelles sont favorables. Dans le cas contraire, elles sont maintenues en vie dans cette « transition en pause », en attente d'un retour des nutriments. Les chambres d'œuf n'entrent pas en vitellogenèse, où elles seraient susceptibles de dégénérer. La transition M/E, sous contrôle de l'activité d'IIS, joue ainsi le rôle d'un point de contrôle nutritionnel. Cette étude met donc en évidence une fonction jusqu'alors inconnue des cellules folliculaires, qui permet de pallier les dommages liés à la carence.

Article 1

A Mitotic-to-Endocycle nutrient checkpoint regulates Drosophila oogenesis

A Mitotic-to-Endocycle nutrient checkpoint regulates Drosophila oogenesis

Patrick Jouandin[1,2,3], Christian Ghiglione[1,2,3] and Stéphane Noselli[1,2,3]

1. Univ. Nice Sophia Antipolis, institut de Biologie Valrose, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France

2. CNRS, institut de Biologie Valrose, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France

3. INSERM, institut de Biologie Valrose, iBV, U1091, 06100 Nice, France

Contact:

Stéphane Noselli

Tel: +33 492 076 433

Fax: +33 492 076 403

Email : noselli@unice.fr

Running title:

The M/E switch as a nutrient checkpoint

SUMMARY

How oogenesis is controlled to balance reproduction and adult fitness has been a longstanding question. We used Drosophila oogenesis as a model to understand the effect of starvation on the Mitotic-to-Endocycle (M/E) transition, a critical step during Drosophila oogenesis allowing the entry of egg chambers into the high energy consuming process of vitellogenesis. We show that upon starvation the Insulin pathway induces the M/E switch to stall, blocking the entry of egg chambers into vitellogenesis and therefore protecting adults from energy loss. Pausing of the M/E switch involves a previously unknown crosstalk between dFoxO, Cut and Notch which ensures full reversion of the process and rapid resuming of oogenesis upon re-feeding. This work reveals the M/E switch as a dFoxO-dependent nutrient checkpoint integrating metabolic cues with development, growth and reproduction.

INTRODUCTION

Nutrient sensing is essential to coordinate growth and development during organogenesis. The conserved Insulin/Insulin-like growth factor (IIS) and TOR (Target Of Rapamycin) signaling pathways play a central role in coupling growth with nutrition in *Drosophila* (Andersen et al., 2013; Edgar, 2006). The TOR pathway controls cell autonomous growth downstream of amino acids (Wang and Proud, 2009) while the IIS pathway acts as a systemic regulator. In conditions of protein-rich diets, *Drosophila* insulin-like peptides (Dilps) secreted from the brain directly activate the *Drosophila* Insulin Receptor homologue (dInR) in peripheral tissues to control metabolism, stress response, lifespan and reproduction (Brogiolo et al., 2001; Ikeya et al., 2002). Signaling downstream of dInR involves PI3K and AKT, leading to the phosphorylation and subsequent cytoplasmic retention of the Forkhead transcription factor dFoxO (Puig et al., 2003). On a poor protein diet, Dilps secretion is blocked (Geminard et al., 2009; Gronke et al., 2010) which leads to reduced dInR signaling and subsequent translocation of dFoxO into the nucleus of target tissues where it acts as a growth inhibitor.

During long nutritional stress, the IIS and TOR pathways interplay to adjust development and growth rates according to nutrient availability, allowing proper organ development (Colombani et al., 2003). However, the effects of transient diet change on organ development remain poorly understood. To study this question, we used oogenesis as a model to understand how the high energy consuming egg chambers cope with nutrient variations, which animals are submitted to in the wild.

Egg chambers are composed of a cyst of 16 germline cells (1 oocyte and 15 nurse cells) surrounded by a single layer of somatic follicle cells (Figure 1A). These two cell lineages originate respectively from germline and follicle stem cells, both present in the germarium. When flies are grown on a protein-rich medium, egg chambers are produced unceasingly leading to the formation of regular strings of eggs of all developing stages (1 to 14) assembled into ovarioles. Two main phases of egg chamber development are distinguishable based on the follicle cell nuclear cycle: i) a mitotic (M) phase from stages 1 to 6, and ii) an endocycle (E) phase (genomic DNA replication without cell division) from stages 7 to 10. During the M phase, follicle cells are immature and express the homeobox transcription factor Cut (Figure 1A-B, E) (Sun and Deng, 2005). Then, at stage 6/7, follicle cells switch their cell cycle program, exiting the mitotic cycle and entering the endocycle (Deng et al., 2001; Lopez-Schier and St Johnston, 2001; Tamori and Deng, 2013). This transition is known as the “Mitotic-to-Endocycle (M/E) switch”. This switch is under the control of the evolutionary conserved Notch (N) signaling pathway (Deng et al., 2001; Lopez-Schier and St Johnston, 2001; Schaeffer et al., 2004; Shcherbata et al., 2004). N activation induces the expression of the zinc-finger transcription factor Hindsight (Hnt), which in turn inhibits *cut* expression (Figure 1A-E) (Sun and Deng, 2007). Cut downregulation is necessary and sufficient to promote the entry into the endocycle, allowing follicle cell differentiation and maturation (Sun and Deng, 2005). At stage 8, N activity eventually returns to basal levels (Figure 1B, C)(Sun et al., 2008).

The mitotic and endocycle phases roughly correspond to the early and vitellogenic phases of egg chamber development, respectively. These two phases have previously been shown to behave differentially upon starvation (Drummond-

Barbosa and Spradling, 2001). During the early mitotic phase, starvation causes germline and follicle cell division rates and growth to slow down leading to a developmental delay (LaFever and Drummond-Barbosa, 2005), as well as triggering the loss of germline stem cells in the germarium (Hsu and Drummond-Barbosa, 2009, 2011; Hsu et al., 2008; Yang et al., 2013). Mutations in *dinr* reduce follicle cell proliferation whereas some *tor* mutations extend the mitotic phase (LaFever et al., 2010). In contrast, starvation during the endocycle phase triggers egg chamber degeneration (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Pritchett and McCall, 2012). However, the surviving stage 7-10 egg chambers show a full developmental arrest, in which vitellogenesis and the endocycle are stopped (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Ikeya et al., 2002; Richard et al., 2005; Schiesari et al., 2011; Tu et al., 2002). These observations reflect a sharp change in the survival/developmental response to nutrient shortage occurring at the M/E switch. Yet, the effects of starvation and the role of IIS during this important transition remain unknown.

In this study, we characterized egg chamber response to nutrient variations specifically during the M/E transition. We show that nutrient deprivation stalls stage 6/7 egg chambers in a previously uncharacterized state that we termed the “Paused M/E Switch” (PMES). We show that PMES is reversible with oogenesis resuming remarkably quickly following re-feeding of starved flies. PMES is induced by a reduction of Dilps levels and dInR signaling. dFoxO is dispensable for the normal M/E switch, however it is essential for PMES induction. In these conditions, dFoxO activates Cut expression cell-autonomously in follicle cells which maintains N in a PMES-specific regulatory loop. Altogether, these results reveal that during oogenesis, the M/E switch is in fact an IIS controlled nutritional checkpoint, which

enables prompt and efficient adaptation to nutrient supplies therefore contributing to maintain the balance between reproduction and adult fitness.

RESULTS

Starvation blocks egg chambers in a Paused M/E Switch (PMES) state

To better characterize the role of IIS in nutrient sensing and growth during oogenesis, we first determined the stage at which egg chamber development arrests upon nutrient deprivation. Staging was performed using i) egg morphology, ii) the expression of Cut, which stains mitotic egg chambers, and iii) Notch signaling pathway reporters that mark endocycle egg chambers (NRE>GFP or NRE-LACZ)(Figure 1C, E)(Furriols and Bray, 2001; Zeng et al., 2010). Detailed analysis of egg chambers around the M/E switch showed that a significant proportion of them (stage 6/7 vs. stage 7-10 ratio of 0.28) were in a specific transient state between the M and E cycle (Fig. 1; Fig. 2E). Indeed, in normally fed flies, these egg chambers showed a concomitant expression of Cut and NRE>GFP (Figure 2A-A'', E). Interestingly, in starved flies there was a higher proportion of these intermediate stage 6/7 egg chambers compared to the fed condition (ratio of 0.52 compared to 0.28)(Figure 2B-B", E). There are two ways of explaining this result: either the intermediate egg chambers are slowed down upon starvation or they are blocked at the M/E switch. To distinguish between these two possibilities, we took advantage of the GAL80^{ts} system to pulse label newly generated stage 6/7 egg chambers with GFP (McGuire et al., 2003). Briefly, fed or starved NRE>GFP flies were raised 24h at 29°C (a permissive temperature allowing GFP expression) in order to label egg chambers from stage 6/7 onwards. Then, the egg chambers were shifted to a restrictive temperature (20°C) for 24h to stop *de novo* GFP expression (see Experimental Procedures). Hence, absence or strong reduction of GFP expression in

stage 6/7 egg chambers would have occurred if the M/E switch were still active and oogenesis normal, albeit slower than in fed conditions. On the other hand, persistence of GFP staining in stage 6/7 egg chambers would have indicated that starved egg chambers were in fact blocked at the M/E switch. And indeed this is what we observed. 24h following temperature shift, there were no GFP-labeled stage 6/7 egg chambers from fed flies (Figure 2C-C'', F) whereas most starved stage 6/7 egg chambers were still labeled with GFP (Figure 2D-D'', F). This indicates that upon starvation, stage 6/7 egg chambers stall at the M/E switch, maintaining both Cut expression and Notch activity. We conclude that upon starvation, stage 6/7 egg chambers remain in an intermediate switch-like stage that we termed "Paused M/E Switch" (PMES).

The M/E switch acts as a nutritional checkpoint

Next, we analyzed the effect of re-feeding on starvation-induced PMES egg chambers. Egg chambers were marked using flip-out clones expressing GFP. Flies were then starved on poor medium to induce PMES and re-fed during different periods of time to test the ability of paused egg chambers to proceed through the M/E switch once food was available again (Figure 3A, see Experimental Procedures). After 15 hours of starvation (t0 in Fig. 3), the proportion of stage 6/7 relative to stage 7-8 egg chambers increased compared to control fed flies (Figure 3B,C), indicating that starvation for 15 hours is sufficient to induce PMES egg chambers. Strikingly though, after only one hour of re-feeding, we already observed full Cut

downregulation in a significant proportion of egg chambers indicating that they were no longer paused and had entered the endocycle (Figure 3 B and D). Increasing the re-feeding period to 9 hours allowed most PMES egg chambers to develop into stage 8 egg chambers (Figure 3B, E). After 24 hours of rich food up-take, the ratio of stage 6-7 /stage 7-8 was back to level with the control fed flies (Fig. 3B).

Thus, upon nutrient supply, starvation-induced PMES egg chambers are able to quickly revert to normal oogenesis by entering the endocycle. These data suggest that the M/E switch serves as a nutritional checkpoint during oogenesis, responding rapidly to starvation and re-feeding to allow processing through vitellogenesis.

The M/E checkpoint responds to a reduction of neural Dilps

During oogenesis, response to starvation is mediated through reduced secretion of *Drosophila* insulin-like Peptides (Dilps) by the neural Insulin Producing Cells (IPCs) (LaFever and Drummond-Barbosa, 2005). To assess whether Dilps reduction controls the formation of PMES egg chambers, we genetically ablated the IPCs through ectopic expression of the pro-apoptotic gene *reaper* (*rpr*) in the IPCs (*dilp2>rpr*), thus preventing Dilps secretion from the brain altogether (Ikeya et al., 2002). As expected from previous studies, IPCs ablated flies were slower to develop, smaller in size and contained very few vitellogenic egg chambers (Ikeya et al., 2002). In addition, we noticed that IPCs ablation in fed flies induced an increase in the proportion of stage 6/7 egg chambers to the level of those observed in starved conditions (figure 4). These results show that, in the same way as starvation,

reduction in Dilps secretion from the IPCs acts on the M/E switch inducing the formation of PMES egg chambers.

IIS acts cell-autonomously in follicle cells to induce PMES

In order to analyze the requirement for dInR signaling in follicle cells, we generated clones of follicle cells mutant for different actors of the IIS pathway: the Dilps receptor (*dinr*), the catalytic subunit of *PI3K* (*dp110*) and *dakt* (Fig. 5A-C). All these conditions showed the same phenotype. Mutant follicle cells in otherwise wild type endocycle egg chambers, still expressed the mitotic stage marker Cut (Fig. 5A''' and data not shown) meaning that the mutant cells were still in the M cycle and had not yet entered the endocycle. Consistently, mutant cells had smaller nuclei compared to their wild type neighbors (Fig. 5A''-C''). In addition, IIS mutant cells showed N activation as evidenced by the expression of N^{icd}, Hnt and NRE-LacZ (Fig. 5B''',C''',A''''-C'''' and data not shown), indicating that the reduction in N activity usually observed once cells passed through the M/E switch had not occurred. Thus, IIS mutant follicle cells have all the features of PMES cells. In order to test whether activation of IIS is sufficient to force paused cells to proceed through the M/E switch, we generated IIS gain-of-function clones in starved egg chambers. In such conditions, both the expression of Cut and NRE-LacZ were abolished, showing that ectopic IIS activity is sufficient to bluff follicle cells into progressing through the M/E switch regardless of the shortage of food supply (Fig. 5D-D'''').

Altogether, these results show that the IIS pathway acts cell autonomously in follicle cells to induce their pausing in a PMES state in response to starvation.

dFoxO is essential to trigger PMES upon starvation

It has been shown that reduction of the IIS pathway upon starvation leads to the translocation of the transcription factor dFoxO to the nucleus where it acts as a negative regulator of growth (Junger et al., 2003; Puig et al., 2003). We were able to confirm that in fed flies, *dinr* mutant follicle cells show high levels of nuclear dFoxO, indicating that dFoxO is activated cell autonomously in response to loss of IIS function (Fig. 6A''''). To test the role of dFoxO in triggering both normal M/E switch and PMES, we raised *dfoxo* mutant flies in fed and starved conditions.

In fed conditions, we found that *foxo*$^{\Delta 94}$ homozygous mutant flies proceeded normally through oogenesis. In particular, the ratio of PMES/stage 7-10 egg chambers was similar to that of control flies (Fig. 6B). Furthermore, the levels of Cut and NRE>LacZ in *dfoxo* mutant cells were comparable to wild type levels in both M cycle and endocycle egg chambers (Fig. 6C-C'''',D-D''''). These results indicate that in the absence of nutritional stress, dFoxO is not essential for egg chamber development and that absence of dFoxO has no effect on the M/E switch, neither promoting nor delaying it.

To test whether dFoxO is involved in generating starvation-induced PMES, *foxo*$^{\Delta 94}$ homozygous mutant flies were grown on poor medium. In these conditions, PMES egg chambers were no longer observed and oogenesis proceeded like in fed flies (Fig. 6B), indicating that dFoxO is indeed required to induce PMES in response to the lack of nutrients. To verify that dFoxO controls PMES as a result of IIS downregulation, we generated clones of follicle cells either mutant for *dinr* or overexpressing a dominant negative form of the PI3K. Either way, the loss of IIS function mimicked the starvation-induced PMES state as shown by Cut misexpression (Fig. 6A-A''',E-E'''). However, this phenotype was fully suppressed in

absence of dFoxO (Compare Fig. 6E-E''' and 6F-F'''), indicating that upon starvation, IIS acts through dFoxO to induce PMES.

Finally, to assess whether dFoxO is sufficient to induce PMES, we generated clones overexpressing an active form of human FoxO (*hfoxo3a-TM;* mimicking dFoxO gain-of-function)(Junger et al., 2003) in the absence of any nutritional stress. Interestingly, activated FoxO was able to induce the concomitant expression of Cut and NRE-LacZ (Fig. 6G-G''''), indicating that FoxO is sufficient to trigger PMES.

Altogether, these results indicate that, in the absence of nutritional stress, dFoxO is dispensable for oogenesis. However, during starvation periods, dFoxO plays a critical role specifically at the M/E nutrient checkpoint downstream of IIS, leading to the induction of PMES egg chambers.

Cut activates Notch in a specific regulatory loop during PMES

PMES egg chambers are characterized by a puzzling concomitant activation of Cut and N. Indeed, in normal M/E-to-post-switch egg chambers (stage 6/7 onwards), a peak of N activity downregulates *Cut* through Hnt and this is followed by a strong reduction of N activity (Fig. 1)(Sun and Deng, 2007; Sun et al., 2008). The PMES-specific expression pattern therefore raises two questions: what maintains N activation and how is Cut expression preserved in the presence of N?

We first tested if Cut could be the potential regulator of N during PMES. To do so we inhibited Cut expression in follicle cells whilst overexpressing human FoxO to

mimic PMES *(>hfoxo3A-TM; cut^{RNAi})*. Interestingly, loss of Cut activity led to the inactivation of NRE-LacZ expression and an absence of N overexpression (Fig. 7A'''-A''''; compare with Fig. 6G''''). These results suggest that Cut itself maintains N activity during the PMES stage. To test whether Cut is sufficient to maintain N, Cut was misexpressed in post-switch egg chambers. Cut ectopic expression led to NRE-LacZ, N and Hnt up-regulation (Fig. 7B-C''''), indicating that Cut activates the N signaling pathway cell-autonomously. Furthermore, we found that N is essential for Cut-induced activation of N target genes. Indeed, upon N silencing Hnt is no longer activated by Cut (Fig. 7D-D''''), indicating that N is epistatic to Cut on *Hnt* regulation and that Cut does not regulate *Hnt* directly.

We next analyzed the role of N in the PMES regulatory pathway and in particular we tested whether N is also a negative regulator of *Cut* in PMES egg chambers. We made use of the IIS-mutant-PMES-induced egg chambers to overexpress the activated form of N (N^{icd}). N gain-of-function led to absence of Cut upregulation (Fig. 7E-E'''', compare to Fig. 5A, 6A and data not shown) suggesting that N also downregulates Cut in PMES egg chambers, as it does during the normal M/E switch. This result was further confirmed in N loss-of-function conditions which led to an increase in Cut expression (Fig. 7F-F''').

Altogether, these results reveal a regulatory loop characteristic of PMES egg chambers involving dFoxO, Cut and N which leads to the concomitant activation of both Cut and N. In this pathway, N activity is maintained by Cut downstream of dFoxO, while Cut levels are maintained by a balance whereby dFoxO is the activator and N the repressor. This regulatory network provides a molecular basis for the establishment of the PMES state in starved conditions (Fig. 7G).

DISCUSSION

In the wild, adult organisms experience repeated sessions of nutrient challenge forcing them to readapt. The IIS pathway contributes to the control of organ homeostasis and growth in response to nutrient variations. In females, oogenesis represents a major source of energy consumption competing with other physiological needs (Partridge et al., 2005a). Therefore, it is interesting to investigate how IIS regulates ovarian development in order to maintain a good balance between homeostasis/survival and reproduction.

To address this question, we used Drosophila egg chambers as a model of rapidly growing adult tissue with high nutrient requirements. We discovered that, upon starvation, the M/E switch acts as a nutritional checkpoint capable of restraining egg chamber progression into the energy consuming vitellogenic stages, hence protecting developing eggs from starvation-induced degeneration. PMES maintenance relies on a particular regulatory pathway involving the activation of N by Cut, their concomitant activity being established through a specific regulatory loop (Fig. 7G). The onset of PMES is dependent on the reduction of Dilps and IIS signaling inducing Cut activation through dFoxO, therefore linking the nutrient level to the state of oogenesis. Upon re-feeding, cells respond quickly (within an hour; Fig. 3) by downregulating dFoxO and Cut, thus allowing oogenesis to resume through the unblocking of the M/E switch (Fig. 7G). Therefore, pausing egg chamber development at the M/E switch provides a reactive and reversible mechanism controlling the flow of egg chambers towards vitellogenesis as well as supplying a reservoir of preserved egg chambers ready to quickly resume oogenesis when nutritional conditions are favorable.

Depending on their stage of maturation, egg chambers behave differentially upon starvation. During the early, M phases, prolonged nutrient deprivation and reduction of IIS activity slows egg chamber growth down which leads to a delay in egg maturation. On the other hand, starvation during the later, vitellogenic stages induces progressive cell degeneration eventually leading ovaries to lack most endocycling egg chambers.

Our results add a new critical step to the control of oogenesis upon nutrient challenge. Indeed, pausing egg chamber development at the transition between the M and E cycles is an ideal strategy to rapidly control the flow of egg chambers and prevent counterproductive and unnecessary energy expenditure when nutrients become limited to the organism. Thus, the M/E switch checkpoint occurs at a pivotal stage of egg chamber development to control homeostasis.

The developmental delay occurring during the mitotic phase combined with the PMES state provide an efficient response to nutrient deprivation preventing energy loss and allowing protection of egg chambers from degeneration as well as ensuring quick oogenesis restart upon re-feeding. An interesting question is whether and how the strategies deployed by different stage egg chambers are coordinated? Indeed, the level of control of oogenesis as a whole is still unknown. Whether the control of oogenesis relies solely on systemic insulin-like peptides or also involves local organ-specific mechanisms remains unanswered. For instance, it would be interesting to know whether the PMES state works as a physical or physiological ‘faucet’, not only blocking the process of oogenesis prior to vitellogenesis as shown in this study, but also by influencing the maturation of earlier egg chambers. Indeed, upon prolonged starvation, one might expect all M egg chambers to gradually end up in a PMES

state. However, cycles of starvation and re-feeding do not affect the linear order of egg chambers within the ovariole, suggesting the existence of egg chamber intercommunication.

Upon nutrient challenge, a rapid and efficient response is crucial to avoid energy drain from oogenesis. Regulation of metabolism through translational regulation and metabolite availability provides a first level of control through induction of a developmental delay. Here we show that the M/E switch is in fact an IIS sensitive checkpoint that provides egg chambers with an extra, organ-specific level of nutrient control. Induction of the PMES state upon starvation relies on the maintenance of a specific regulatory loop involving the concomitant activity of Cut and N (Fig. 7G), thus mimicking the normal M/E transition. The equilibrium between Cut and N activity depends on the balance between active nuclear dFoxO and repressive N. Reduction of nuclear dFoxO upon re-feeding leads to disruption of the Cut/N equilibrium and subsequent progression through the M/E checkpoint. A key aspect of the PMES molecular pathway is the finding that Cut itself can maintain N at high levels. Therefore, Cut translates IIS activity by integrating the N pathway, thus linking nutrient sensing and the transition towards the high energy consuming process of vitellogenesis. This association likely participates in setting a good balance between homeostasis/survival and reproduction, in register with nutrient availability.

The coupling of IIS with N signaling through Cut may represent a widespread way to link growth and other developmental/differentiation processes. In support of this view, previous work in Drosophila has also shown an interaction between Cut and N during spiracle development (Pitsouli and Perrimon, 2013) and at the D/V

boundary of the wing disc pouch (Buceta et al., 2007). In addition, a dFoxO/Fringe interaction in the germarium was reported recently (Yang et al., 2013). Furthermore, work in vertebrates has also demonstrated the existence of an interaction between the N and Insulin pathways in both physiological and developmental contexts such as the control of fatty acid metabolism in the liver (Pajvani et al., 2011), retinal neurogenesis (Jo et al., 2012), myogenic differentiation (Kitamura et al., 2007) and keratinocyte homeostasis (Mandinova et al., 2008). Future studies using Drosophila egg chambers should contribute to a better understanding of the complex interplay between the IIS and other signaling pathways in integrating metabolic cues to development, growth and differentiation.

Experimental procedures

Drosophila strains and culture

Flies were grown on protein-rich medium (10g/l agar, 17g/l yeast extract, 82.5g/l polenta, 60g/l sugar with wet yeast paste). For starvation experiments, 2-days old flies were switched from protein-rich medium to a 0,1x protein-poor medium (same as above with 1,7g/l yeast without yeast paste) during various periods of time (see figures legends). 2-days old females were transferred to 29°C to induce somatic cell clones. The same procedure was used for flies expressing GAL4/UAS combinations to invalidate genes using RNAi or express reporter lines.

The following *drosophila* stocks were used: *Gbe-Su(H)-LacZ* (Furriols and Bray, 2001), *Gbe-Su(H)-Gal4 (Zeng et al., 2010)*, *FRT82B dakt*^{1} (Rintelen et al., 2001), *FRT82B inr*^{31} (Brogiolo et al., 2001), *UAS-dinr*^{RNAi} *RII2* (a gift from R. Ueda), *UAS-N*^{icd} (Struhl et al., 1993), *dilp2 gal4- UAS nls GFP* and *UAS hfoxo3a-TM* (Junger et al., 2003), *FRT82B dp110*^{1C1}(obtained from Hugo Stocker, described in (Willecke et al., 2011)), *UAS cut*^{5} (Krupp et al., 2005), *foxo*$^{\Delta 94}$ and *FRT82B foxo*$^{\Delta 94}$ (Slack et al., 2011), *FRT82B inr*^{ex15} (Song et al., 2003). *Tub-gal80*^{ts}, *UAS rpr*, *UAS-dinr*^{del}, *UAS-cut*^{RNAi} *TRIP29625*, *UAS-N*^{RNAi} *TRIP28981*, *UAS-p60(PI3K*^{DN}*)*, and *FRT82B* strains were from the Bloomington Stock Center.

Generation of mosaic clones

Mitotic clones were generated using the FLP/FRT technique (Xu and Rubin, 1993). Flies with mutant alleles recombined on *FRT82B* chromosomes were crossed to *hsFLP;;FRT82B UbiGFP* flies. *UASp60; FRT82B foxo*$^{\Delta 94}$ and *UASp60; FRT82B* flies

were crossed to *yw, tubgal4-UAS GFP; FRT82B, tub gal80* flies (a gift from A. Ephrussi) to generate MARCM clones (Lee and Luo, 1999). Females with the required genotypes were heat-shocked for 1hr at 37°C, twice a day for 3 days, and dissected 2 days later. Mosaic mutant clones were marked by the absence of GFP (FLP/ FRT) or by GFP expression (MARCM). Gain-of-function clones were generated using the flip-out technique by crossing flies to a *hsFLP;; act<CD2<gal4, UAS-GFP* (a gift from D.J. Montell). The progeny was heat-shocked for 1hr at 37°C and dissected 1 or 2 days after or as indicated in the text.

TARGET technique and re-feeding experiment

For the TARGET experiment, fed or starved *Gbe-Su(H)-Gal4* , *UAS GFP; tubgal80^{ts}* flies were raised 24h at 29°C to allow GFP expression, then switched to 20°C during 24hrs. For the re-feeding experiment, *hsFLP;; act<CD2<gal4, UAS-GFP* flies were crossed to *Gbe-Su(H)-LacZ.* The progeny was fed for 2 days and heat-shocked for 1hr at 37°C to induce GFP-expressing clones. Flies were then starved during 15h and re-fed during different period of time as indicated.

Immunohistochemistry and microscopy

Antibody staining was carried out according to standard protocol. The following antibodies were used: mouse anti-Cut (1:100, 2B10, DSHB), rabbit anti-Cut (1:500, a gift from YN. Jan), mouse anti-Hnt (1:100, 1G9, DSHB), mouse anti-Notch intracellular (1:15, C17.9C6, DSHB), rabbit anti-dFoxO (1:500, a gift from P. Léopold), chicken anti-β-Galactosidase (1:1000, Gene Tex), rabbit anti-clived-

Caspase3 (1:200, Cell Signaling). The samples were mounted in Vectashield with DAPI and analyzed by confocal microscopy (Zeiss LSM510 or LSM710).

References

Andersen, D.S., Colombani, J., and Leopold, P. (2013). Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. Trends in cell biology *23*, 336-344.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. Current biology : CB *11*, 213-221.

Buceta, J., Herranz, H., Canela-Xandri, O., Reigada, R., Sagues, F., and Milan, M. (2007). Robustness and stability of the gene regulatory network involved in DV boundary formation in the Drosophila wing. PloS one *2*, e602.

Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Leopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls Drosophila growth. Cell *114*, 739-749.

Deng, W.M., Althauser, C., and Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in Drosophila follicle cells. Development *128*, 4737-4746.

Drummond-Barbosa, D., and Spradling, A.C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis. Developmental biology *231*, 265-278.

Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. Nature reviews Genetics *7*, 907-916.

Furriols, M., and Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. Current biology : CB *11*, 60-64.

Geminard, C., Rulifson, E.J., and Leopold, P. (2009). Remote control of insulin secretion by fat cells in Drosophila. Cell metabolism *10*, 199-207.

Gronke, S., Clarke, D.F., Broughton, S., Andrews, T.D., and Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of Drosophila insulin-like peptides. PLoS genetics *6*, e1000857.

Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2009). Insulin levels control female germline stem cell maintenance via the niche in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 1117-1121.

Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2011). Insulin signals control the competence of the Drosophila female germline stem cell niche to respond to Notch ligands. Developmental biology *350*, 290-300.

Hsu, H.J., LaFever, L., and Drummond-Barbosa, D. (2008). Diet controls normal and tumorous germline stem cells via insulin-dependent and -independent mechanisms in Drosophila. Developmental biology *313*, 700-712.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., and Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila. Current biology : CB *12*, 1293-1300.

Jo, H.S., Kang, K.H., Joe, C.O., and Kim, J.W. (2012). Pten coordinates retinal neurogenesis by regulating Notch signalling. The EMBO journal *31*, 817-828.

Junger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. Journal of biology *2*, 20.

Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Funahashi, Y., Shawber, C.J., Castrillon, D.H., Kollipara, R., DePinho, R.A., Kitajewski, J., and Accili, D. (2007). A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. The Journal of clinical investigation *117*, 2477-2485.

Krupp, J.J., Yaich, L.E., Wessells, R.J., and Bodmer, R. (2005). Identification of genetic loci that interact with cut during Drosophila wing-margin development. Genetics *170*, 1775-1795.

LaFever, L., and Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in Drosophila. Science *309*, 1071-1073.

LaFever, L., Feoktistov, A., Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2010). Specific roles of Target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the Drosophila ovary. Development *137*, 2117-2126.

Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron *22*, 451-461.

Lopez-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis. Genes & development *15*, 1393-1405.

Mandinova, A., Lefort, K., Tommasi di Vignano, A., Stonely, W., Ostano, P., Chiorino, G., Iwaki, H., Nakanishi, J., and Dotto, G.P. (2008). The FoxO3a gene is a key negative target of canonical Notch signalling in the keratinocyte UVB response. The EMBO journal *27*, 1243-1254.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila. Science *302*, 1765-1768.

Pajvani, U.B., Shawber, C.J., Samuel, V.T., Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., Kitajewski, J., and Accili, D. (2011). Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. Nature medicine *17*, 961-967.

Partridge, L., Gems, D., and Withers, D.J. (2005). Sex and death: what is the connection? Cell *120*, 461-472.

Pitsouli, C., and Perrimon, N. (2013). The homeobox transcription factor cut coordinates patterning and growth during Drosophila airway remodeling. Science signaling *6*, ra12.

Pritchett, T.L., and McCall, K. (2012). Role of the insulin/Tor signaling network in starvation-induced programmed cell death in Drosophila oogenesis. Cell death and differentiation *19*, 1069-1079.

Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., and Tjian, R. (2003). Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. Genes & development *17*, 2006-2020.

Richard, D.S., Rybczynski, R., Wilson, T.G., Wang, Y., Wayne, M.L., Zhou, Y., Partridge, L., and Harshman, L.G. (2005). Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in Drosophila melanogaster independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the chico1 insulin signaling mutation is autonomous to the ovary. Journal of insect physiology *51*, 455-464.

Rintelen, F., Stocker, H., Thomas, G., and Hafen, E. (2001). PDK1 regulates growth through Akt and S6K in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 15020-15025.

Schaeffer, V., Althauser, C., Shcherbata, H.R., Deng, W.M., and Ruohola-Baker, H. (2004). Notch-dependent Fizzy-related/Hec1/Cdh1 expression is required for the mitotic-to-endocycle transition in Drosophila follicle cells. Current biology : CB *14*, 630-636.

Schiesari, L., Kyriacou, C.P., and Costa, R. (2011). The hormonal and circadian basis for insect photoperiodic timing. FEBS letters *585*, 1450-1460.

Shcherbata, H.R., Althauser, C., Findley, S.D., and Ruohola-Baker, H. (2004). The mitotic-to-endocycle switch in Drosophila follicle cells is executed by Notch-dependent regulation of G1/S, G2/M and M/G1 cell-cycle transitions. Development *131*, 3169-3181.

Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., and Partridge, L. (2011). dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in Drosophila. Aging cell *10*, 735-748.

Song, J., Wu, L., Chen, Z., Kohanski, R.A., and Pick, L. (2003). Axons guided by insulin receptor in Drosophila visual system. Science *300*, 502-505.

Struhl, G., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1993). Intrinsic activity of the lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. Cell *74*, 331-345.

Sun, J., and Deng, W.M. (2005). Notch-dependent downregulation of the homeodomain gene cut is required for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in Drosophila follicle cells. Development *132*, 4299-4308.

Sun, J., and Deng, W.M. (2007). Hindsight mediates the role of notch in suppressing hedgehog signaling and cell proliferation. Developmental cell *12*, 431-442.

Sun, J., Smith, L., Armento, A., and Deng, W.M. (2008). Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling. The Journal of cell biology *182*, 885-896.

Tamori, Y., and Deng, W.M. (2013). Tissue repair through cell competition and compensatory cellular hypertrophy in postmitotic epithelia. Developmental cell *25*, 350-363.

Tu, M.P., Yin, C.M., and Tatar, M. (2002). Impaired ovarian ecdysone synthesis of Drosophila melanogaster insulin receptor mutants. Aging cell *1*, 158-160.

Wang, X., and Proud, C.G. (2009). Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. Trends in cell biology *19*, 260-267.

Willecke, M., Toggweiler, J., and Basler, K. (2011). Loss of PI3K blocks cell-cycle progression in a Drosophila tumor model. Oncogene *30*, 4067-4074.

Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. Development *117*, 1223-1237.

Yang, S.A., Wang, W.D., Chen, C.T., Tseng, C.Y., Chen, Y.N., and Hsu, H.J. (2013). FOXO/Fringe is necessary for maintenance of the germline stem cell niche in response to insulin insufficiency. Developmental biology.

Zeng, X., Chauhan, C., and Hou, S.X. (2010). Characterization of midgut stem cell- and enteroblast-specific Gal4 lines in drosophila. Genesis *48*, 607-611.

Acknowledgements

We are grateful to R. Bodmer, S. Bray, WM. Deng, A. Ephrussi, SX. Hou, YN. Jan, P. Léopold, DJ. Montell, L. Partridge, L. Pick, H. Stocker, G. Struhl and R. Ueda for sharing reagents and fly lines. We thank the TRiP at Harvard Medical School (NIH/NIGMS R01-GM084947) for providing transgenic RNAi fly stocks used in this study. We wish to thank the Bloomington stock center and DSHB for reagents and the iBV PRISM imaging facility for advice and support. We are also grateful to members of the lab and P. Léopold for discussion and comments. Work in SN laboratory is supported by CNRS, ANR, ARC, FRM.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Marker and gene expression profiles during the M/E switch

(A) Schematic representation of an ovariole showing egg chambers before (stage 5), during (stage 6/7) and after (stage 8) the M/E switch.

(B) Scheme showing the expression of *cut*, *NRE-LacZ* and *hnt* in follicle cells during the M/E switch.

(C-E) Expression of NRE-LacZ (C, green), Hnt (D, green) and Cut (E, red) in egg chambers from control flies raised on a protein-rich medium. The stage 6/7 egg chambers undergoing the M/E switch are characterized by transient concomitant expression of Cut and N activity markers (NRE-lacZ and Hnt).

Figure 2: Starvation blocks oogenesis in a Paused M/E Switch (PMES) state

(A-B) NRE>GFP egg chambers from normally fed (A-A'') or starved (B-B'') flies. In starved condition, one in two endocycle egg chambers (expressing only NRE>GFP) are degenerating (B-B'').

(C-D) Pulse labeling of egg chambers stage 7 and onwards (using *NRE>GFP; tubgal80^{ts}*) from fed (C-C'') and starved (D-D'') flies. Egg chambers were dissected 24hrs after shifting them from a permissive (29°C) to a restrictive (20°C) temperature

to block *de novo* expression of GFP. Stage 6-7 egg chambers from control flies (C-C'') proceeded through the M/E switch while those from starved flies did not (D-D'').

(E) Graph showing the ratio of stage 6-7 vs. stage 7-10 egg chambers in fed and starved conditions.

(F) Graph showing the percentage of pulse-labeled stage 6-7 egg chambers from fed and starved flies. 24hrs after chasing (shift from permissive to restrictive temperature). In fed flies, stage 6-7 egg chambers proceeded normally through the M/E switch, while in starved flies, they stalled.

Data represent the mean of triplicate (E) or duplicate (F) experiments +/- SD. N≥200 for each experiment. Egg chambers are labeled with NRE-lacZ (green, A'''-D''') or Cut (red, B'-D').

Figure 3: The PMES state is reversible upon re-feeding

(A) Schematic representation of the re-feeding experiment. Flies were starved for 15hrs and the development of egg chambers analyzed 1hr, 9hrs or 24hrs after re-feeding. GFP expression allows the tracing of egg chambers that have gone through starvation.

(B) Graph represents the ratios between the number of stage 6/7 (PMES) and stage 7-8 egg chambers at different time-points from control fed (orange), starved (blue) and re-fed flies (red).

(C-E) Expression of Cut (gray), NRE-LacZ (red), GFP (green) and DAPI (cyan) in egg chambers taken at different time points after re-feeding (as indicated in A). Asterisks indicate PMES egg chambers from starved flies (C) that developed into stages 7 (D) and 8 (E) after re-feeding.

Figure 4: Neural Dilps control the formation of PMES egg chambers

(A) Effect of ablating the Insulin Producing Cells (IPCs) on the ratio of stage 6-7/stage 7-10 egg chambers. Graph shows egg chamber ratios in control fed or starved flies (*dilp2>GFP)* and IPCs-ablated flies (*dilp2>GFP, rpr*). Data represent the mean of duplicate experiments +/- SD. N≥200 in each experiment.

(B-D) Example of ovariole squashes taken from control *dilp2>GFP* fed (B-B'') or starved flies (C-C'') and IPCs-ablated *dilp2>GFP, rpr* flies (D-D'').

Figure 5: The IIS pathway controls the expression of Cut and N

(A-C) IIS loss-of-function clones generated in stage 9 egg chambers (mutant follicle cell clones are outlined and marked by the absence of GFP) (A'-C', green).

(A-A'''') Apical view of a $p110^{1C1}$ mosaic egg chamber. Mutant clones outlined in A') express Cut (A''', grey).

(B-B’’’’) Cross-section of an *akt(1)* mosaic egg chamber. Mutant clones (outlined in B’) show stronger N^{icd} staining compared to WT cells (B’’’, grey).

(C-C’’’’) Apical view of an inr^{31} mosaic egg chamber. Mutant clones (outlined in C’) show similar Hnt expression to WT cells (C’’’, grey).

(D-D’’’’) Cross section of a flip-out clone (marked by the presence of GFP, outlined in D’) expressing UAS-$dInr^{del}$ (activated form). Cut (D’’’) and NRE-lacZ (D’’’’) expressions are lost.

Egg chambers are stained for DAPI (cyan; A’’-D’’), NRE-lacZ (red, A’’’’-D’’’’) and Cut, N^{icd} or Hnt (grey, B’’’-E’’’).

Figure 6: dFoxO is essential to trigger PMES egg chambers

(A-A’’’’) Endocycle (stage 8) $dinr^{ex15}$ mosaic egg chamber showing Cut expression and strong dFoxO nuclear staining in mutant follicle cells. Mutant clones are marked by the absence of GFP (outlined).

(B) Graph representing the ratio of stage 6-7(PMES)/stage 7-10 egg chambers from fed or starved $foxo^{\Delta 94}$ flies and control $foxo^{\Delta 94}/TM6B$. Data represent the mean of duplicate experiments +/- SD (N≥200 in each experiment).

(C-C’’’’ and D-D’’’’) Mitotic (stage 5)(C) and endocycle (stage 8)(D) $foxo^{\Delta 94}$ mosaic egg chambers showing similar stainings for Cut and NRE-LacZ in WT and mutant follicle cells (marked by GFP, outlined).

(E-E’’’) Endocycle (stage 8) egg chamber with *UAS-p60(PI3K^{DN})*-expressing clones (marked by the presence of GFP, outlined), in which the expression of Cut is induced.

(F-F’’’) Endocycle (stage 8) egg chamber with *UAS-p60(PI3K^{DN}); foxo$^{\Delta 94}$* follicle cell clones (marked by the presence of GFP, outlined). Loss of *dfoxo* activity suppresses the expression of Cut.

(G-G’’’’) Endocycle (stage 8) egg chamber containing *UAS-hfoxo3a-TM* FC clones (marked by the presence of GFP, outlined). Ectopic activation of dFoxO leads to the activation of Cut expression and up-regulation of NRE-lacZ.

Loss-of-function (A,C,D), MARCM (E,F) or *flip-out* clones (G) are marked by the absence (green,A’, C’, D’) or presence of GFP (E’,F’,G’), respectively. Clones are outlined or indicated by arrows. Egg chambers are marked for the clonal marker GFP (green, A’, C’-G’), DAPI (cyan, A’’, C’’-G’’), Cut (grey, A’’’, C’’’-G’’’), dFoxO (A’’’’) and NRE-lacZ (C’’’’,D’’’’,G’’’’).

Figure 7: Cut acts in a feedback loop to maintain Notch activity during PMES

(A-A’’’’) *UAS-hfoxo3a-TM; UAS-cut^{RNAi}* follicle cell clones (marked by the presence of GFP, A’) show similar N^{icd} (A’’’, grey), and NRE-LacZ (A’’’’, red) staining compared to neighboring control cells.

(B-B’’’’, C-C’’’’) *UAS-cut* follicle cell clones (marked by the presence of GFP, B’,C’) show stronger N^{icd} (B’’’, grey), Hnt (C’’’, grey) and NRE-LacZ (B’’’’,C’’’’) staining compared to neighboring control cells.

(D) Loss of Hnt staining in *UAS-Notch*^{RNAi}*; UAS-cut* follicle cell clones (marked by the presence of GFP, D') (D''', grey).

(E) loss of Cut staining in *UAS-N*^{icd}*; akt(1)* follicle cell clones (marked by the presence of GFP, E') (E''', grey).

(F) Cut expression is activated in UAS-*inr*^{RNAi}*; UAS-Notch*^{RNAi} follicle cell clones (marked by the presence of GFP, F') (F''', grey).

(G) Schematic representation of the genetic pathway leading to the formation of PMES egg chambers during starvation and its reversal to normal development upon re-feeding.

Egg chambers are marked with GFP (green, A'-F'), Dapi (cyan, A''-F''), NRE-LacZ (red, A''''-C''''), N^{icd} (grey in A''',B'''; red in E''''), Hnt (grey, C''',D''') and Cut (grey in E''',F'''; red in D'''').

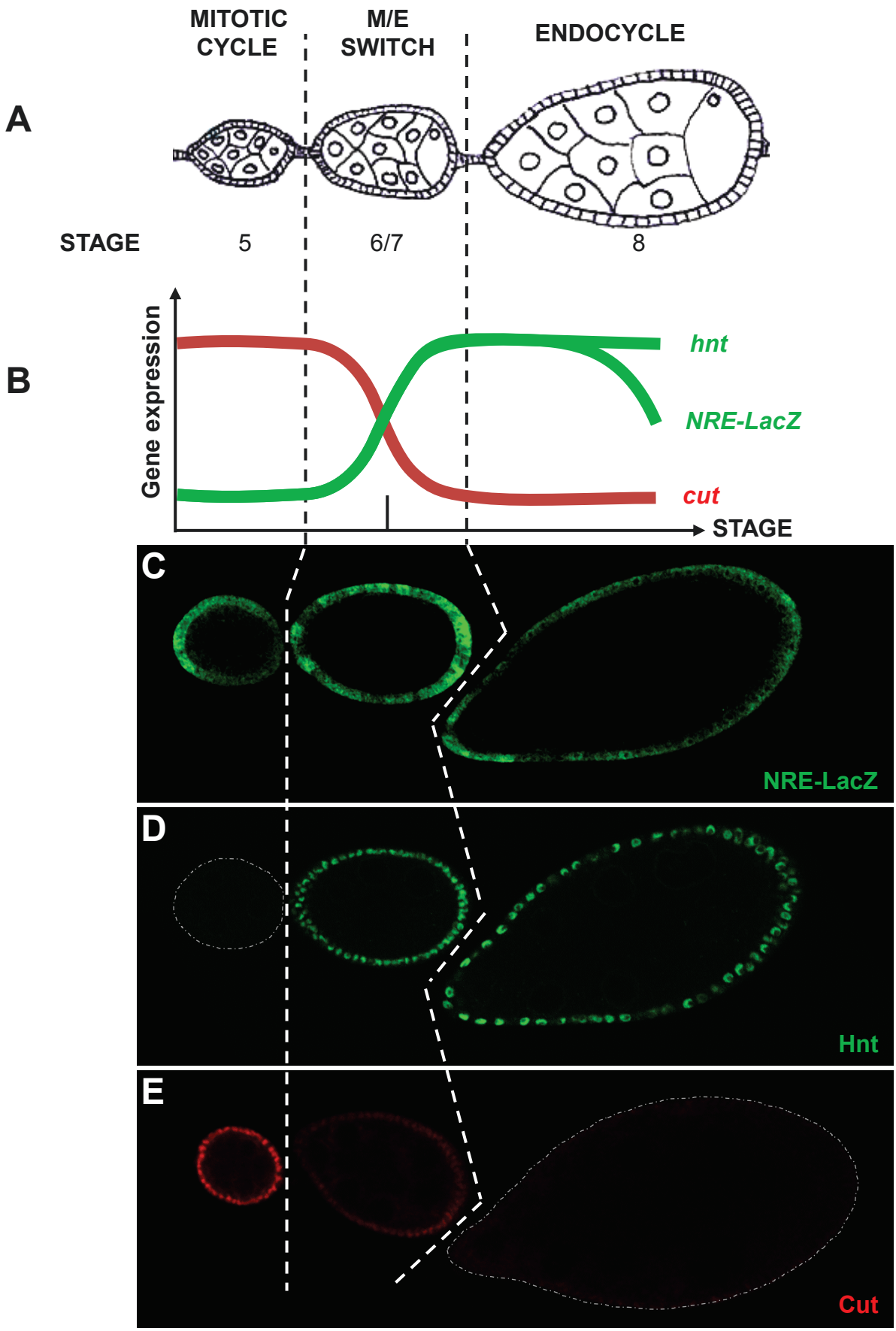


Fig. 1 (Jouandin et al)

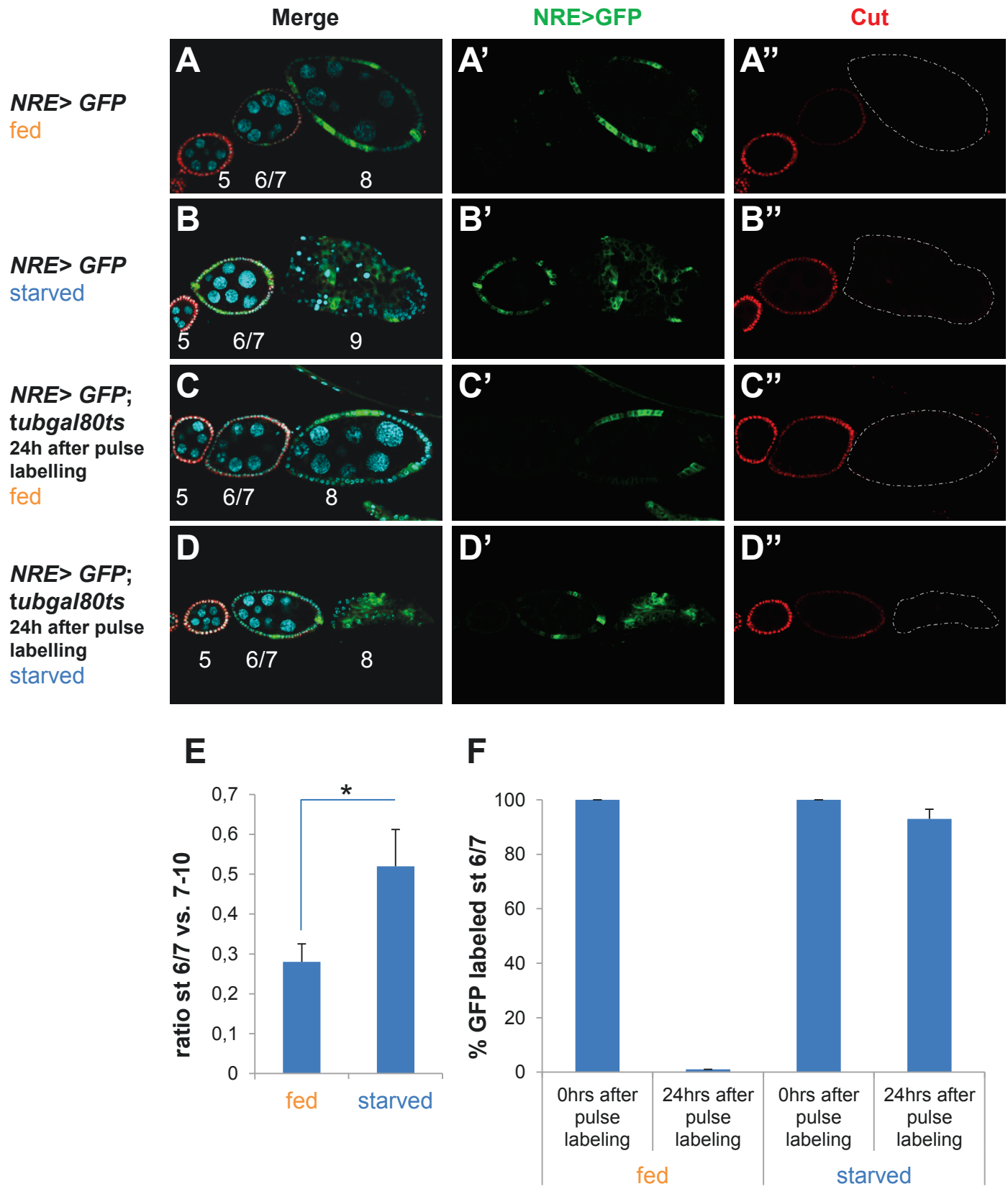


Fig. 2 (Jouandin et al)

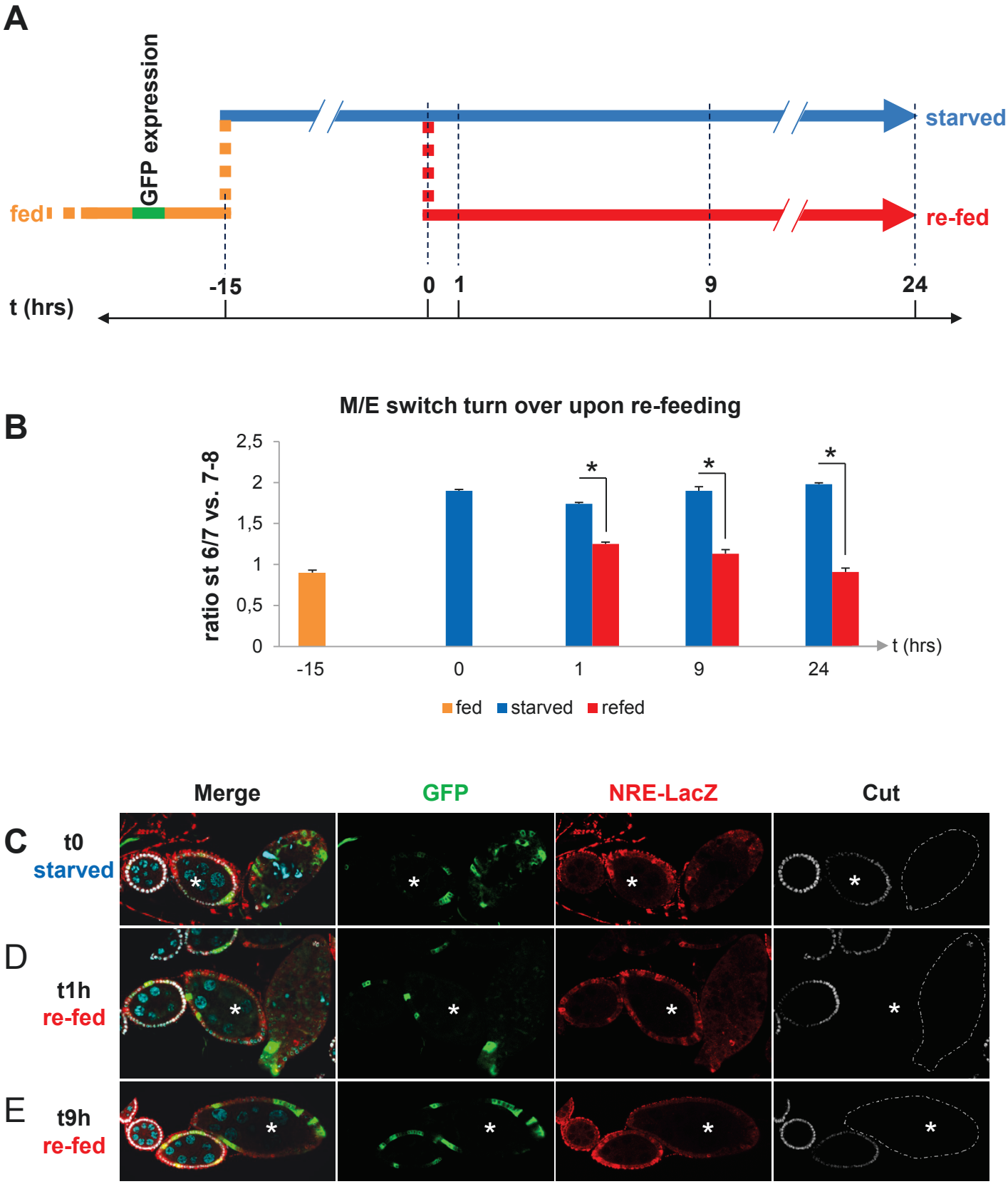


Fig. 3 (Jouandin et al)

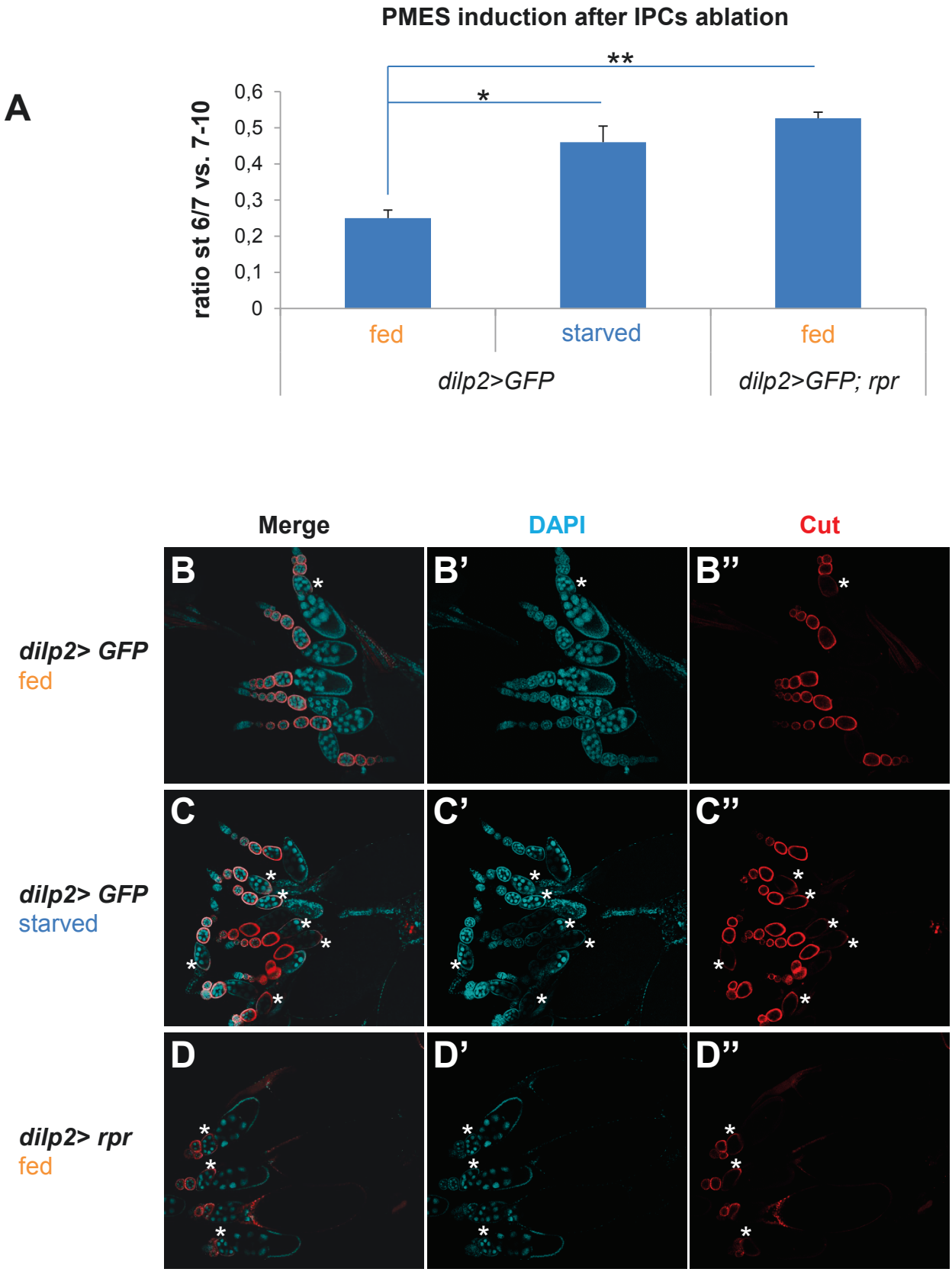


Fig. 4 (Jouandin et al)

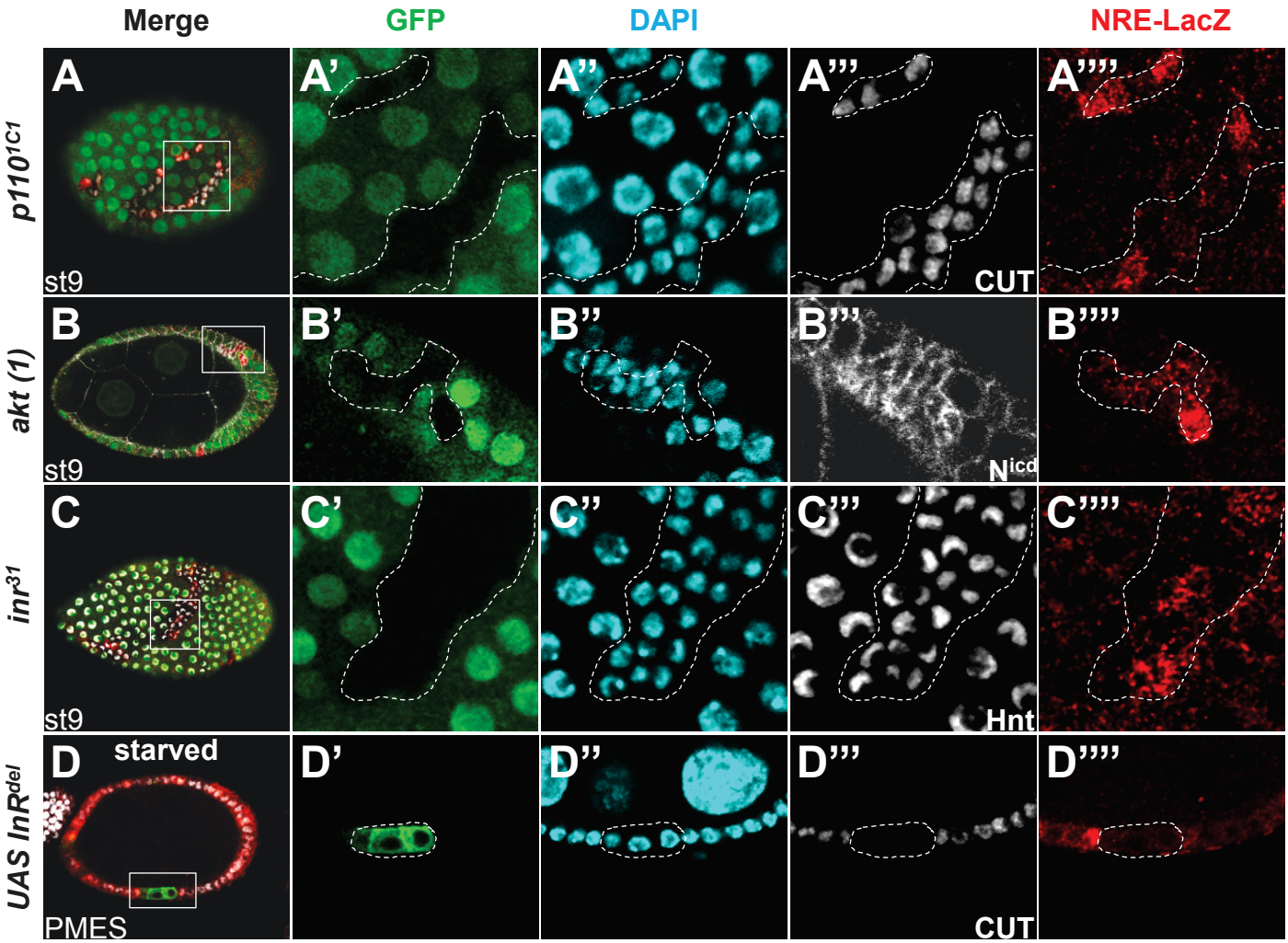


Fig. 5 (Jouandin et al)

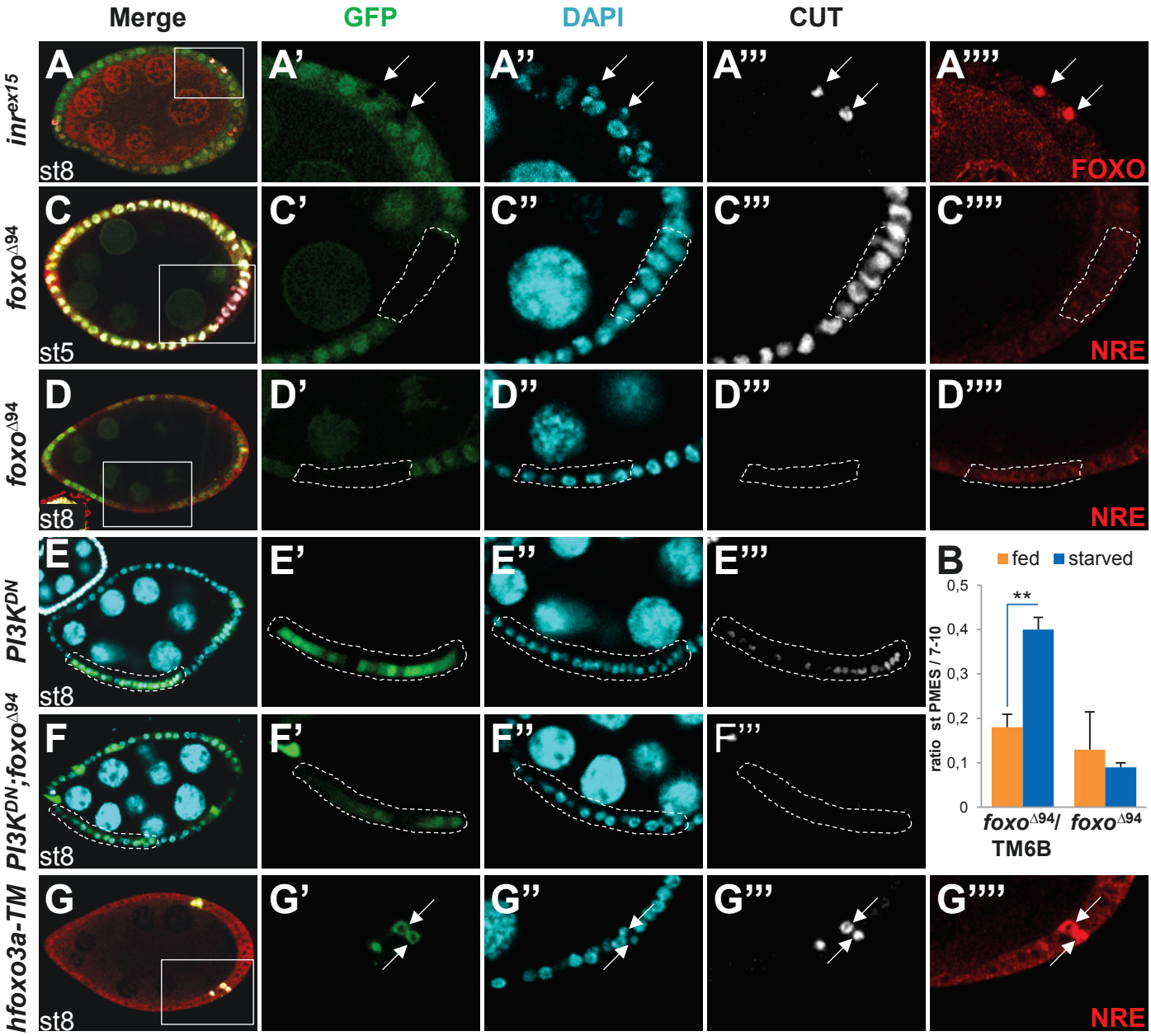
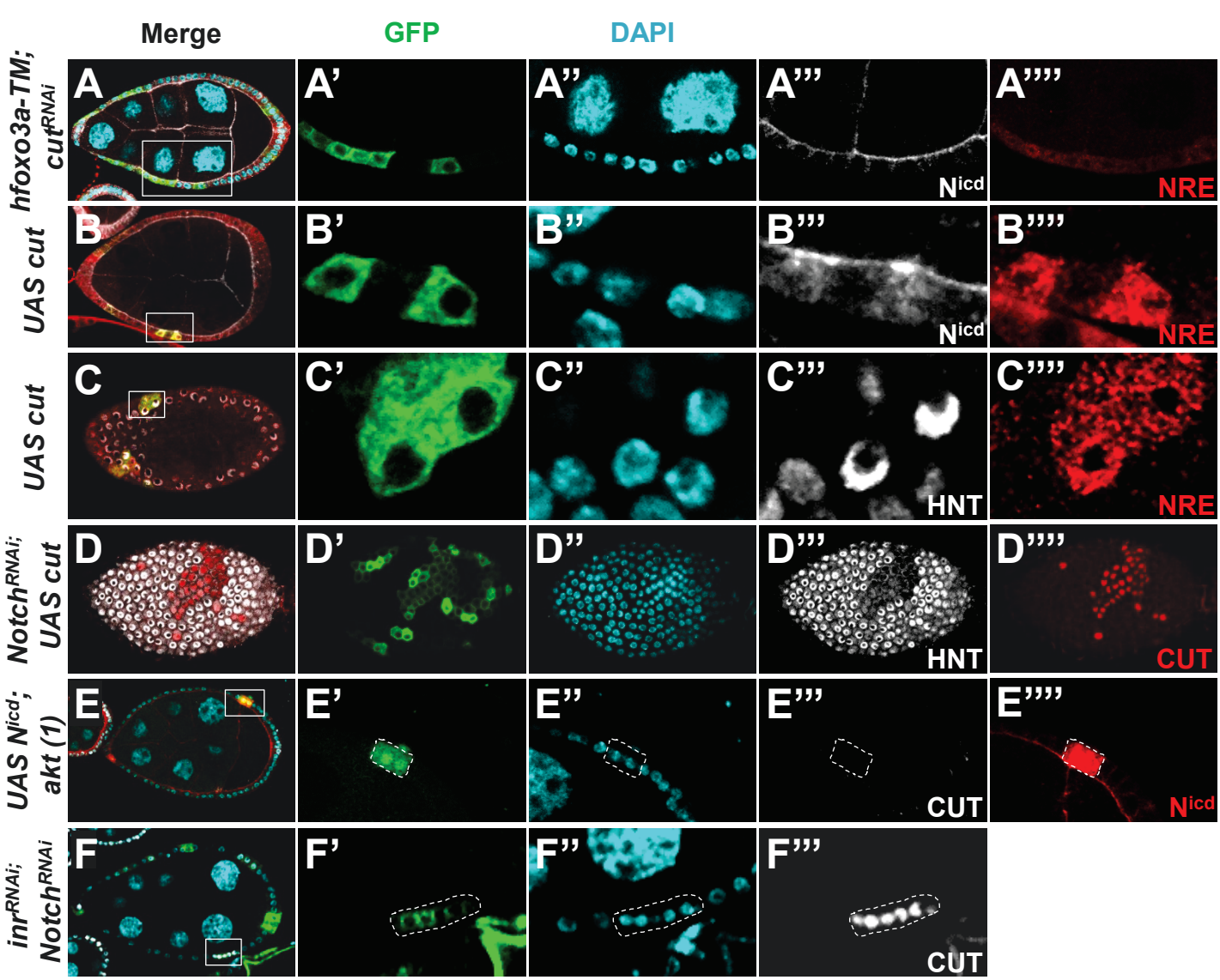


Fig. 6 (Jouandin et al)



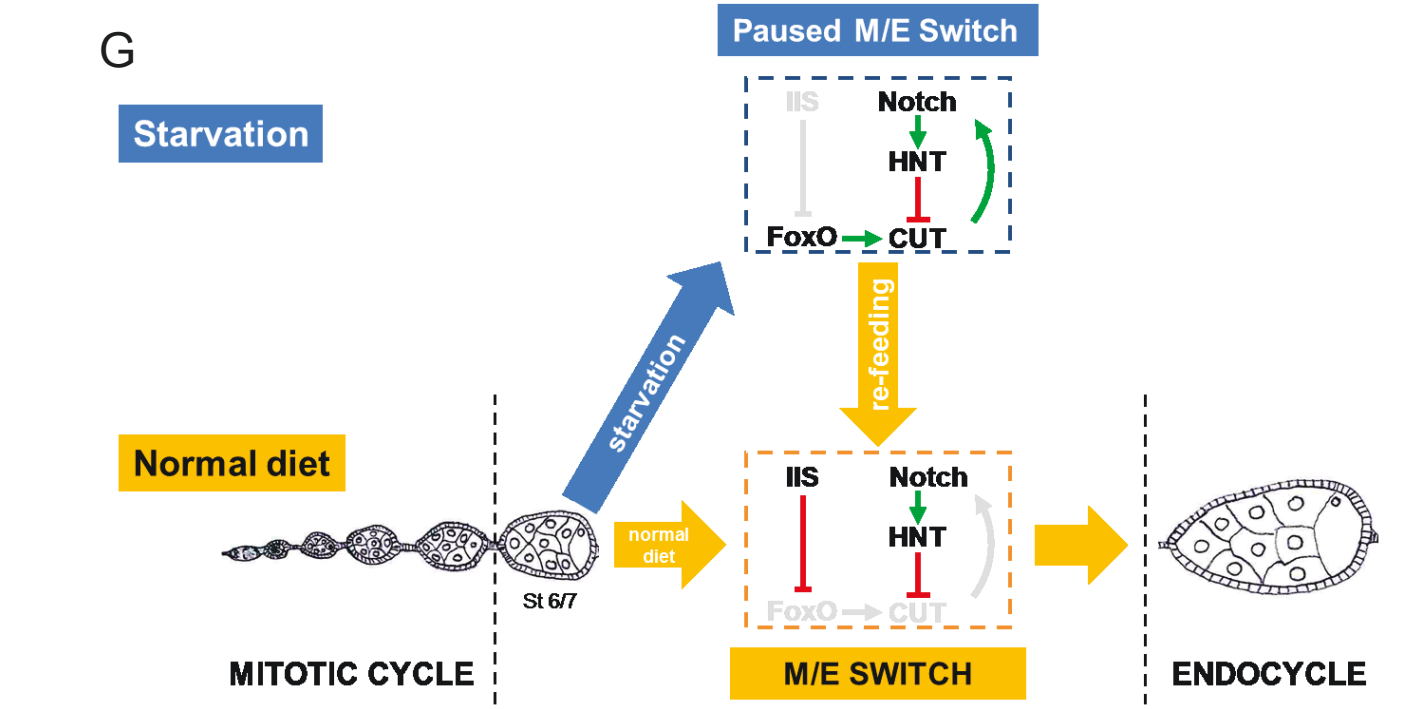


Fig. 7 (Jouandin et al)

Résultats complémentaires et discussion

Cut protège les chambres d'œuf de la dégénérescence induite par la carence

En condition de carence, les chambres d'œuf réagissent de trois manières différentes selon les phases de l'ovogenèse où elles se trouvent. Durant les stades 1 à 6, elles ralentissent leur développement. Au moment de la transition mitose/ endocycle, entre les stades 6 et 7 (6/7), elles sont maintenues dans un état quiescent, la PMES, en attente d'un retour des nutriments. Passé ce stade, la vitellogenèse se bloque et une grande partie des chambres d'œuf entre en apoptose. Il semble donc que le comportement des deux premières phases vise à retarder l'entrée des chambres en vitellogenèse, afin d'éviter leur dégénérescence. Ces observations suggèrent donc qu'un changement drastique des capacités de survie des chambres d'œuf s'opère à la transition mitose/endocycle. Cependant, les mécanismes qui protègent les stades 1 à 6/7 de la dégénérescence sont inconnus.

Il faut noter que les stades protégés de l'apoptose, incluant la PMES, expriment tous le facteur de transcription Cut dans l'épithélium folliculaire. De manière intéressante, Cut est connu pour inhiber l'apoptose dans l'embryon en réprimant un facteur pro-apoptotique codé par *reaper* (Pitsouli and Perrimon, 2010; Zhai et al., 2012). J'ai donc testé l'implication de Cut en tant que facteur de survie des chambres d'œuf en carence.

L'expression ectopique de Cut dans les cellules folliculaires (CF) des stades vitellogéniques de mouches carencées bloque la dégénérescence des chambres d'œuf. En effet, ni les CF, ni les cellules germinales n'entrent en apoptose (Figure 37A-B). A l'inverse, la perte de fonction de Cut dans les CF des stades précoces induit leur dégénérescence (Figure 37C-D). D'une part, ces résultats indiquent qu'en carence, Cut protège les stades précoces de l'apoptose. D'autre part, ils suggèrent que la répression de Cut lors de la transition mitose/ endocycle entraine la capacité des chambres d'œuf de dégénérer en carence.

Cut est exprimé dans les CF uniquement, mais il est capable de protéger toute la chambre d'œuf de la dégénérescence. Ceci suggère que Cut porte des fonctions non

autonomes pour la survie des cellules germinales. De ce fait, deux hypothèses sont envisageables. Soit la survie des cellules folliculaires (induite par Cut et peut-être la répression de *reaper*) entraîne indirectement celle des cellules germinales, soit Cut émet un signal protecteur perçu directement par les cellules germinales.

Pour discriminer entre ces deux possibilités, j'ai utilisé un inhibiteur général de l'apoptose, p35, afin d'induire la survie des CF dans des chambres vitellogéniques carencées, tout en m'affranchissant d'un potentiel signal de Cut. La survie des CF dans ces conditions n'empêche pas la dégénérescence des chambres d'œuf (Figure 37E). Ces résultats suggèrent donc que Cut est à l'origine de la production d'un signal visant à réprimer l'apoptose dans les cellules germinales.

En carence, la dégénérescence des chambres d'œuf est principalement due à la baisse d'activité de la voie de signalisation IIS dans les cellules germinales (Pritchett and McCall, 2012). Un moyen efficace de protéger les chambres d'œuf de l'apoptose serait donc de pallier à cette inhibition d'IIS. J'ai testé l'implication de Cut dans la production de DILPs. En effet, des DILPs sécrétés par les CF pourraient réactiver IIS dans les cellules germinales.

Dans mes conditions expérimentales de RT-PCR en temps réel, seuls les ARNm des DILPs 6 et 7 sont détectables à partir d'extraits ovariens totaux (résultats non montrés). De manière intéressante, la carence, au même titre que la surexpression de Cut, entraînent l'augmentation spécifique des ARNm de DILP6 (Figure 37F). Il semble donc que Cut soit en effet capable de réguler l'expression de certains DILPs dans les cellules folliculaires.

Afin de déterminer si DILP6 est en mesure de sauver les cellules germinales de l'apoptose, je l'ai surexprimé dans les CF de chambres vitellogéniques en carence. Bien que cette surexpression de soit pas spécifique (*act<CD2<gal4*), les résultats suggèrent que DILP6 puisse en effet réactiver IIS dans les cellules germinales puisque les chambres d'œuf sont protégées de la dégénérescence dans ces conditions (Figure 37E).

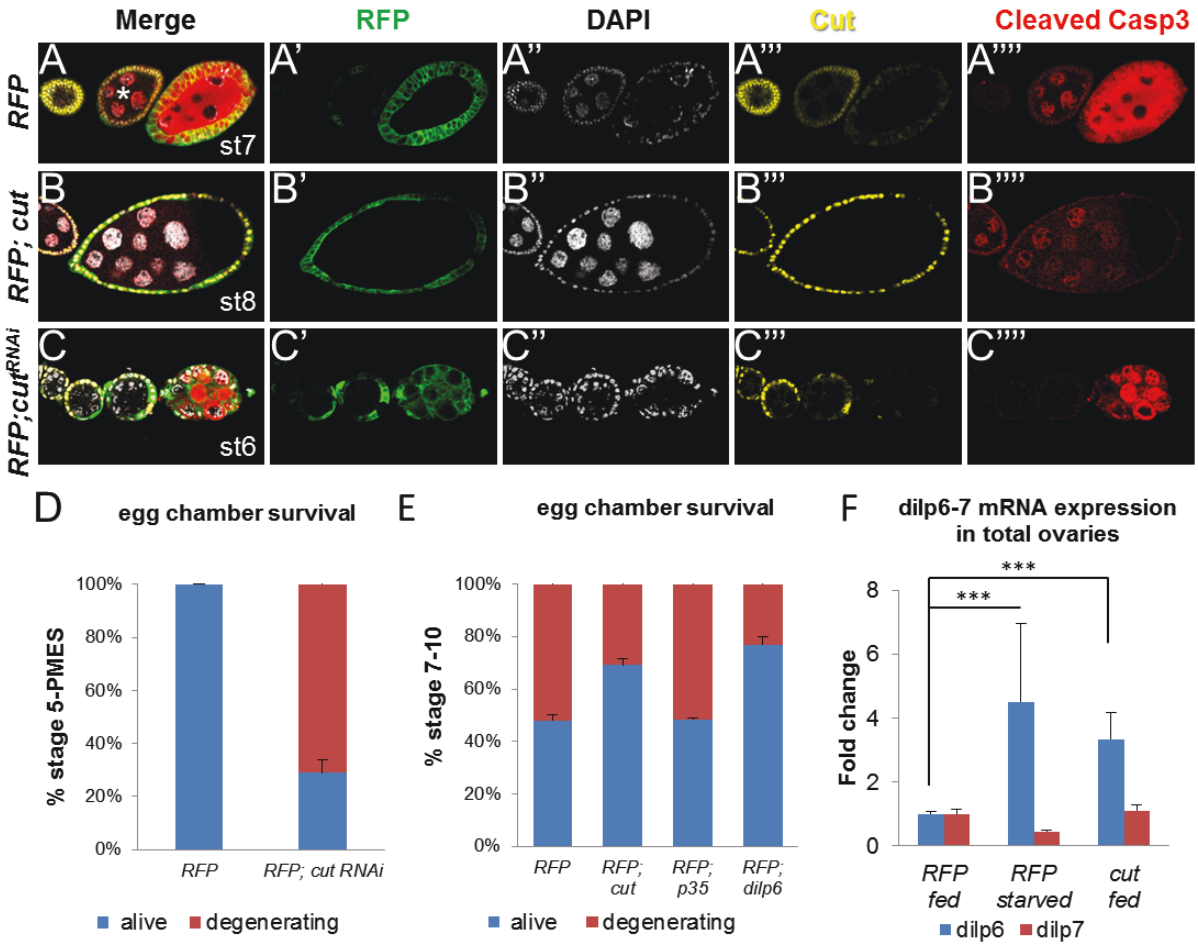


Figure 37 : Cut et DILP6 protègent la dégénérescence des chambres d'œuf induite par la carence. (A-C) Les clones de surexpression dans des chambres d'œuf issues de mouches carencées sont marqués par la RFP (vert) (A'-C'). Les marquages DAPI sont en blanc (A''-C''), et les marquages CUT en jaune (A'''-C'''). Le canal rouge montre le marquage de la Caspase 3 Clivée, qui indique les cellules apoptotiques (A''''-C''''). (A) Chambres d'œuf au stade PMES en vie (indiquée par l'astérisque) et apoptotique au stade 7 issues de mouches contrôles carencées. (B) L'expression de l'*UAS-cut* dans les CF d'une chambre au stade 8 bloque l'apoptose. (C) L'expression de l'*UAS-cut*^{RNAi} dans les CF d'une chambre au stade 6 induit sa dégénérescence. (D) Graphique représentant les pourcentages de survie des stades 5 à PMES dans la condition C. (E) Graphique représentant les pourcentages de survie des stades 7 à 10 issus de mouches carencées après surexpression de Cut, p35 ou DILP6 dans les CF. (D-E) Les résultats représentent la moyenne de trois expériences +/- SD. N≥200 pour chaque expérience. (F) Mesure de l'expression de *dilp6 et dilp7* par qRT-PCR à partir d'extraits d'ovaires totaux de mouches carencées ou non. Cut est surexprimé ou non dans les CF. Les résultats sont relatifs à la condition contrôle, non carencée. (***p<0.005).

Quoique ces résultats soient très préliminaires, ils posent les bases d'une régulation non autonome de la survie des chambres d'œuf en condition de carence. Cut pourrait agir à la fois directement dans les CF pour inhiber l'apoptose, et indirectement sur les cellules germinales pour leur permettre des niveaux de croissance viables.

Il faut noter que DILP6 a déjà été identifié comme un facteur capable d'activer la voie de signalisation IIS en conditions de carence (Slaidina et al., 2009). dFoxO agit notamment dans le corps gras pour induire la transcription de DILP6, qui une fois sécrété induit la croissance systémique. Il est donc probable que Cut et dFoxO coopèrent pour réguler la survie des chambres d'œuf précoces en condition de carence. Par ailleurs, au travers de l'expression de DILP6, FoxO pourrait être requis pour réguler spécifiquement la balance entre survie et dégénérescence des stades vitellogéniques, dans lesquels Cut n'est plus exprimé. De telles études pourraient permettre de mieux comprendre comment l'homéostasie de l'ovogenèse est assurée en dépit de conditions de nutritions fluctuantes.

Interaction entre les voies de signalisation IIS et Notch.

En condition de carence, la pause de la transition mitose/ endocycle (PMES) dépend d'une interaction entre les voies de signalisation IIS et Notch. L'intégration de ces facteurs systémiques et locaux permet d'ajuster un processus cellulaire à l'état énergétique global de l'organisme, établissant ainsi un point de contrôle nutritionnel. Ces dernières années, d'autres interactions entre les voies de signalisation IIS et Notch ont été mises en évidence dans des contextes différents, à la fois chez la drosophile et chez les mammifères. Trois modèles de communication entre ces signaux ont notamment été montrés. Ces voies de signalisation étant bien conservées au cours de l'évolution, il est possible que leurs mécanismes d'interaction le soient également. Je discuterai ces différents modèles et les comparerai avec celui proposé pour l'établissement de la PMES, afin de comprendre s'ils sont conciliables.

1) Au cours de la PMES, FoxO maintient l'activité de Notch au travers de Cut, et la signalisation de Notch elle-même est requise pour la mise en place de ce rétrocontrôle (Figure 38A). L'interaction entre IIS/FoxO et Notch dépend donc de Cut, qui joue le rôle d'intermédiaire. D'autres études proposent cependant une interaction plus directe entre ces voies. Très récemment, les travaux de (Yang et al., 2013) ont montré une communication dFoxO/Notch dans le maintien des cellules de la « niche » du germarium, affectant indirectement l'identité des cellules souches germinales (GSCs) chez la drosophile. Quand l'activité IIS décroit dans les cellules de la niche, l'activité de Notch se comporte de même. Notch étant nécessaire au maintien de ces cellules, leur nombre diminue, entrainant la perte des GSCs (Hsu and Drummond-Barbosa, 2011). Ces résultats semblent donc contradictoires avec la régulation de l'activité Notch pendant la PMES, qui est induite par FoxO.

Les auteurs proposent que FoxO soit responsable de l'inhibition de Notch au travers de la régulation d'une glycosyltransferase codée par *fringe*. Ils montrent que la surexpression de *fringe* est responsable de l'inhibition de Notch (Figure 38B). Cependant, cet effet semble spécifique de leur modèle. En effet, la glycosylation du récepteur Notch par

Fringe est décrite pour augmenter son affinité avec le ligand Delta, au détriment de sa liaison avec Serrate (Bruckner et al., 2000; Panin et al., 1997). De manière plus générale, Fringe régule ainsi l'activation de Notch. Une régulation FoxO/ Fringe reste donc envisageable lors de l'établissement de la PMES. FoxO pourrait en effet réguler Fringe en parallèle de Cut, augmenter l'affinité de Notch pour Delta et ainsi participer au maintien de son activation (Figure 38C).

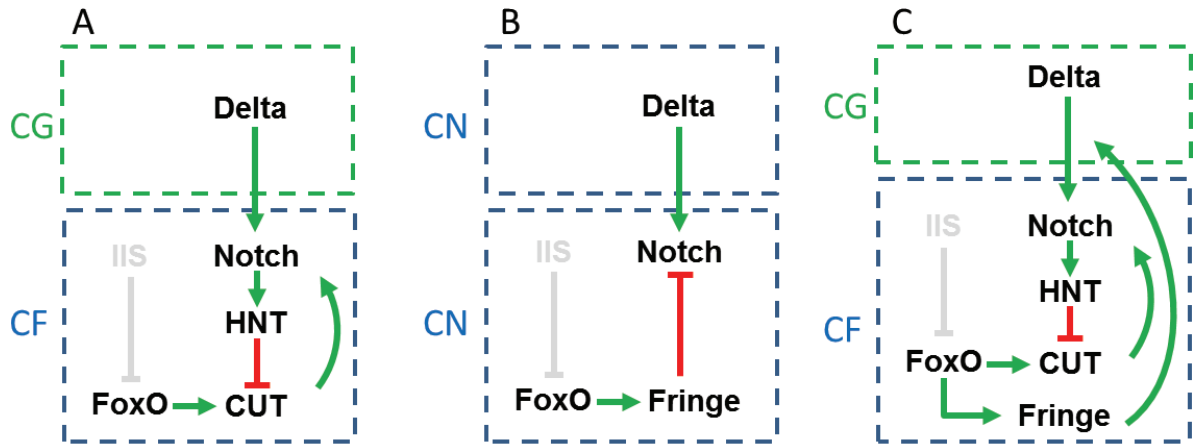


Figure 38. A) Interaction FoxO/Notch pendant la PMES. CF : cellule folliculaire, CG : cellule germinale. B) Interaction FoxO/Notch au cours de la régulation des cellules de la niche (CN). C) Superposition hypothétique des deux mécanismes d'interaction dans le contrôle de la PMES.

2) Dans un tout autre contexte, lors de la différenciation des myocytes à partir de myoblastes de souris en culture, FoxO et Notch coopèrent pour le maintien des progéniteurs musculaires (Kitamura et al., 2007). Les auteurs montrent que FoxO1 se fixe directement à CSL (homologue de Su(H) chez la drosophile) et déplace ses corépresseurs, ce qui facilite le switch transcriptionnel et permet l'expression des gènes cibles de Notch (Figure 39A). Ces derniers inhibent la différenciation des myoblastes. Une telle interaction, strictement entre dFoxO et Su(H), reste cependant difficilement envisageable pour l'établissement de la PMES chez la drosophile. En effet, Cut est nécessaire et suffisant au maintien de l'activité de Notch et à l'expression de ses gènes cibles. Cependant, rien n'exclut que Cut et dFoxO agissent ensemble en tant que co-facteurs de Su(H) pour réguler

l'expression des membres de la voie Notch (Figure 39B). Ce mécanisme constituerait un couplage en temps réel, direct et rapide, entre des signaux d'ordre métabolique et l'activité locale de la signalisation Notch.

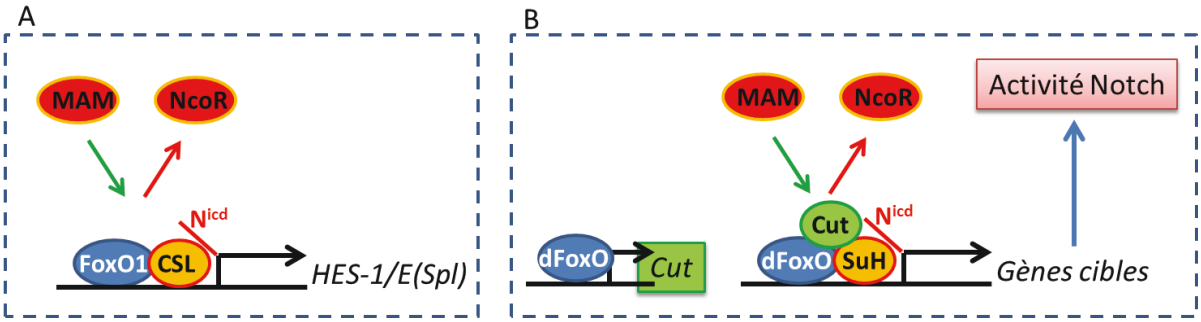


Figure 39. A) Interaction FoxO/Notch pour le maintien des myoblastes privés de sérum. N^{icd} : domaine intracellulaire de Notch. *hes*, homologue des gènes *e(spl)* chez la drosophile, est un gène cible canonique de la voie de signalisation Notch. B) Intégration hypothétique du mécanisme proposé en A) dans la régulation de la PMES.

3) Enfin, une régulation inverse, montrant FoxO comme une cible transcriptionnelle de Notch, a également été reportée (Mandinova et al., 2008). Les auteurs montrent en effet que l'exposition de kératinocytes humains et murins aux UVB induit une hausse d'activité de Notch1, qui en retour inhibe l'expression de FoxO3a pour prévenir de l'apoptose (Figure 40C). Il semble donc que FoxO3a et Notch1 aient des fonctions opposées dans ce contexte. Chez la drosophile, dFoxO et Notch ont également des fonctions antagonistes lors de la transition mitose/ endocycle (M/E). Le premier l'inhibe alors que le second l'induit. De manière intéressante, dans des conditions de nutrition favorables, dFoxO présente un profil d'expression différent avant et après la transition M/E, comme l'est l'activité de Notch (Figure 40A, B). dFoxO est fortement exprimé dans les cellules folliculaires avant la transition, puis son expression diminue au moment où Notch est activé (Figure 40A'-A''). Il serait donc intéressant de vérifier si l'expression de dFoxO est négativement régulée par

Notch dans ce contexte, de manière à prévenir d'un blocage du switch en condition non carencée (Figure 40D).

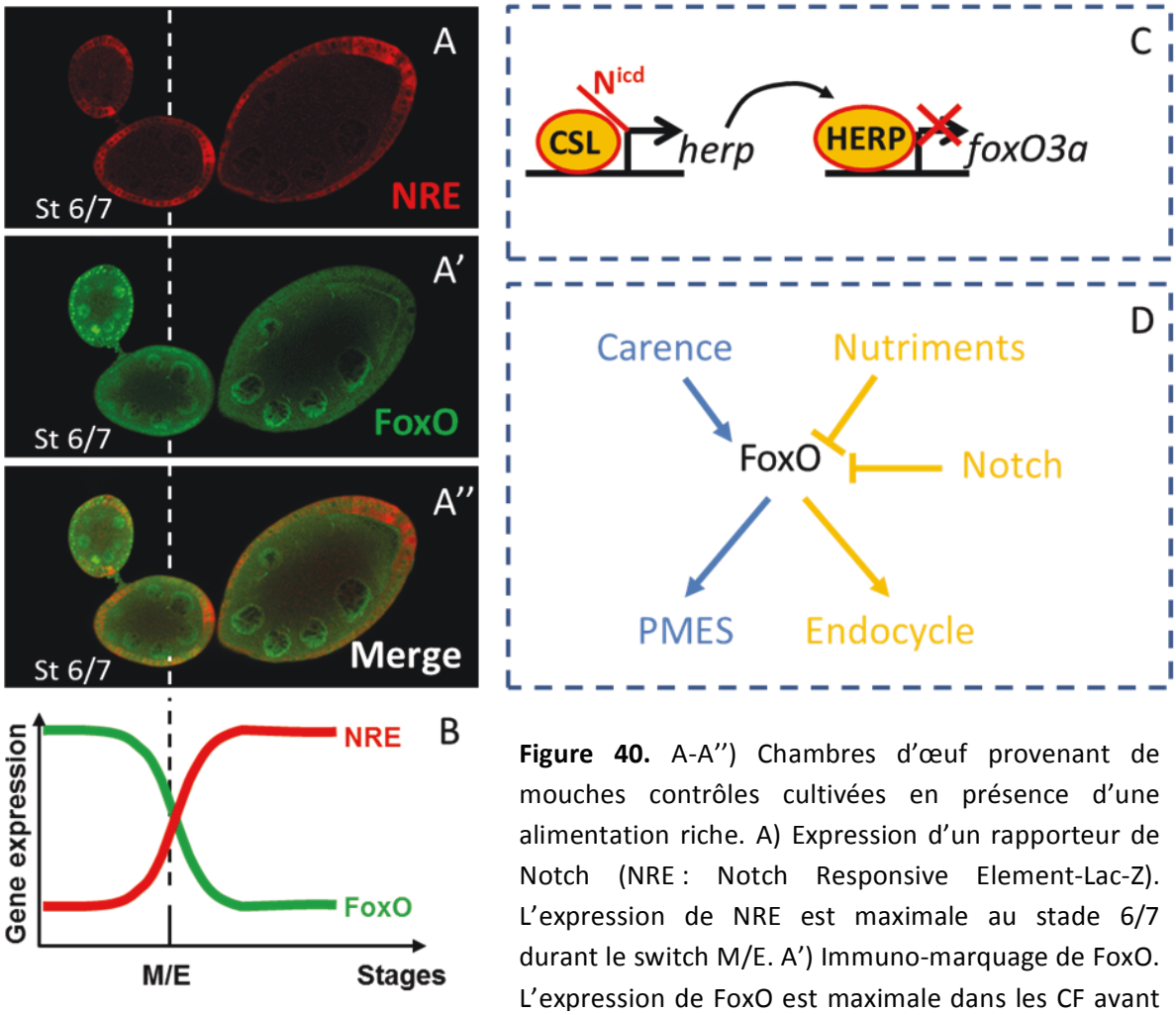


Figure 40. A-A'') Chambres d'œuf provenant de mouches contrôles cultivées en présence d'une alimentation riche. A) Expression d'un rapporteur de Notch (NRE : Notch Responsive Element-Lac-Z). L'expression de NRE est maximale au stade 6/7 durant le switch M/E. A') Immuno-marquage de FoxO. L'expression de FoxO est maximale dans les CF avant B) Représentation schématique de l'expression de NRE et de FoxO avant et après la transition M/E. C) Régulation de FoxO3a par Notch dans des kératinocytes exposés aux UVB. HERP est une protéine de la famille de HES (homologue de E(spl) chez la drosophile. N^{icd} : domaine intracellulaire de Notch. D) Intégration hypothétique du mécanisme proposé en B) dans la régulation de la transition M/E.

Les trois modèles présentés semblent potentiellement conciliables avec la régulation de la PMES chez la drosophile. Ces interactions entre les voies de signalisation IIS et Notch pourraient donc constituer des mécanismes conservés au cours de l'évolution. Leur étude

approfondie pourrait permettre de comprendre comment les organismes intègrent des informations de nutrition dans le contrôle de différents processus cellulaires.

Par ailleurs, on peut imaginer que ce lien entre des paramètres métaboliques et développementaux soit réutilisé dans différents tissus pour établir d'autres points de contrôle nutritionnel, couplant ainsi le développement au rythme de croissance des organismes. Chez la drosophile, la voie de signalisation Notch/Cut est utilisée pour la mise en place de différents organes. Elle maintient notamment la frontière dorso/ ventrale (D/V) des disques imaginaux d'ailes (de Celis and Bray, 1997; Micchelli et al., 1997) (Figure 41).

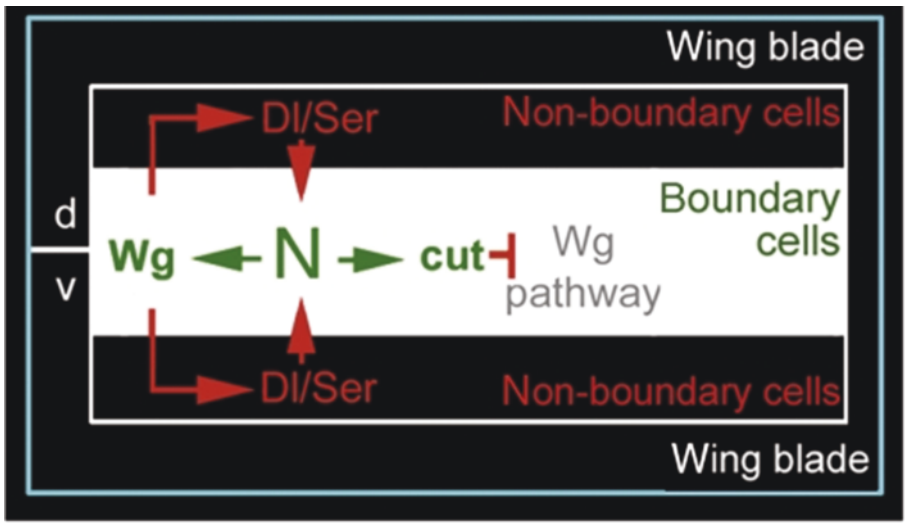


Figure 41: Mise en place de la frontière dorso/ ventrale dans les disques d'ailes. L'activité de Notch est spécifiquement maintenue à haut niveau à la frontière D/V, ce qui induit l'expression de Cut. (D'après (Herranz et al., 2008))

De manière intéressante, j'ai pu observer de fortes interactions génétiques entre les voies de signalisation IIS et Notch dans ce modèle. La mutation d'une copie de *dinr* suffit à sauver les défauts de développement induits par des mutations Notch (Figure 42A, B). Ceci suggère donc que la voie IIS réprime celle de Notch lors de l'établissement et du maintien de la frontière D/V. Cependant, l'inhibition de Notch induit la perte de Cut à la frontière D/V (Figure 42C, D, F), et la perte de fonction d'IIS reproduit partiellement ces effets (Figure 42E, G-G'). Dans ce cas, les résultats suggèrent que la voie IIS active celle de Notch.

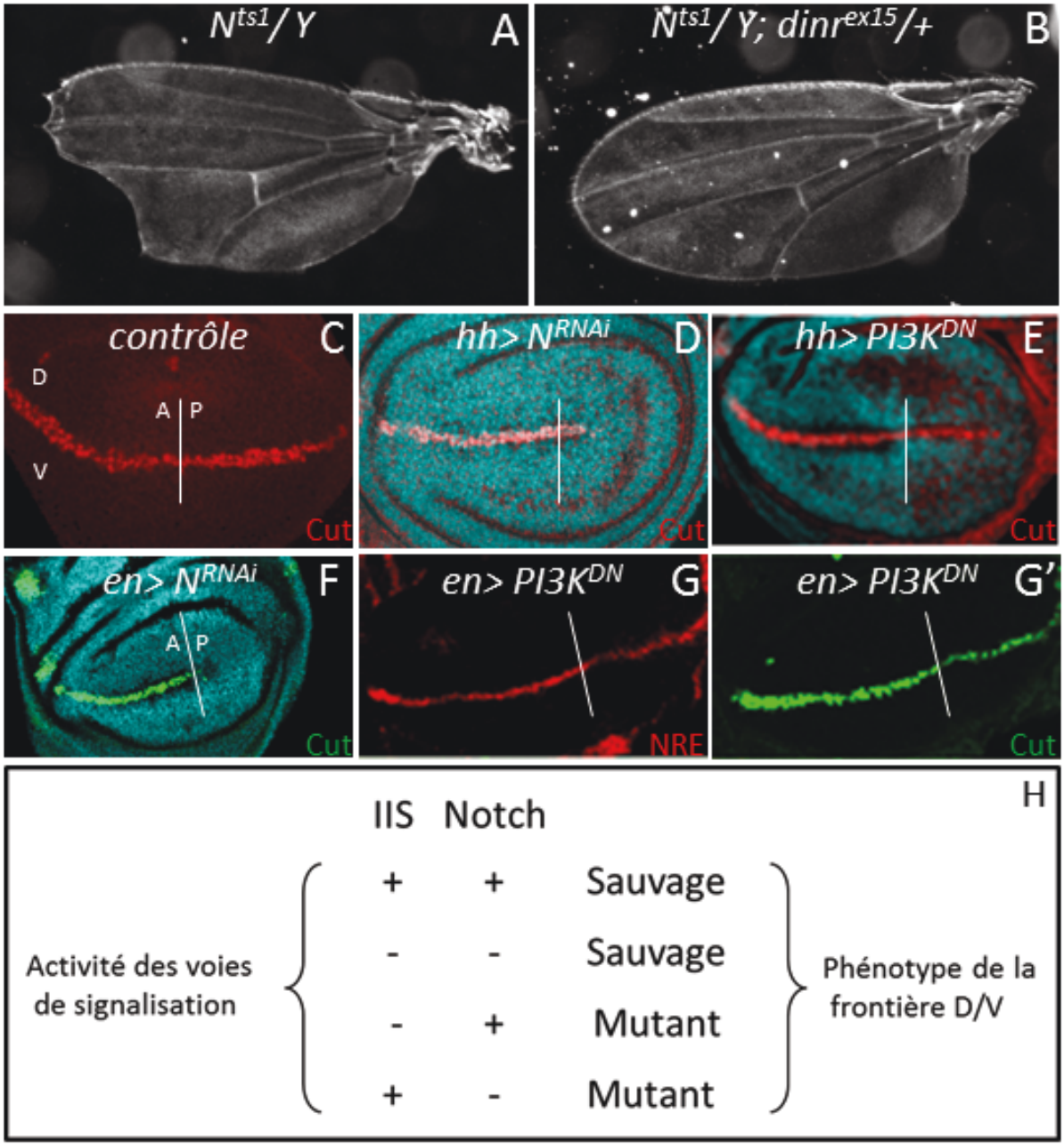


Figure 42 : Interaction IIS/Notch dans le maintien de la frontière D/V dans les disques imaginaux d'ailes chez la drosophile. A) Ailes de mouches mutantes pour un allèle thermosensible de Notch (N^{ts1}) élevées à température restrictive (29°) à partir du stade larvaire L3. B) Même condition qu'en A avec une mutation hétérozygote *inr*^{ex15}, un allèle nul, qui restaure le phénotype sauvage. C-G') Disques imaginaux d'ailes de larves L3. Leur orientation est indiquée en C et F. D-G') L'expression d'ARNi dirigés contre Notch (D, F) ou d'une forme dominante négative de la PI3K (E, G-G') induit la diminution du marquage de Cut (rouge, C,D,E ; vert, F, G') et de NRE (rapporteur de Notch) (rouge, G). Les lignées pilotes, *hedgehog gal4 (hh>) (D-E)* et *engrailed gal4 (en>) (F-G')* s'expriment dans tout le compartiment postérieur du disque d'aile. H) récapitulation des phénotypes.

Ces observations montrent que la frontière D/V est correctement formée uniquement lorsque les voies de signalisation Notch et IIS possèdent des niveaux relatifs d'activation identiques (Figure 42H). Ceci suggère la nécessité d'un couplage des signaux développementaux et de croissance pour former cette structure. Des points de contrôle impliquant une signalisation FoxO/Cut/Notch sont donc envisageables dans ce processus.

La régulation de Cut par Notch varie selon les organes. Par exemple, Notch inhibe Cut dans les ovaires ou durant la formation des trachées (le système respiratoire primitif de la drosophile) (Pitsouli and Perrimon, 2013). En revanche, Notch active Cut dans les disques imaginaux d'ailes (Buceta et al., 2007). Ainsi, si l'on considère que des interactions IIS/Notch conduisent à l'établissement de points de contrôle nutritionnels, les mécanismes mis en jeu seraient probablement spécifiques de chaque organe. Cependant, une telle communication entre des signaux métaboliques et développementaux établit un parallèle intéressant avec les mammifères, chez lesquels ces mécanismes semblent conservés.

Rôle de la signalisation Insuline lors de migration des Cellules de la Bordure

Introduction

La migration cellulaire est un processus physiologique largement utilisé au cours du développement. Elle est requise lors de la morphogenèse embryonnaire ou encore lors de la colonisation de l'ébauche des ovaires par les cellules germinales primordiales. En condition pathologique, elle est à l'origine de l'inflammation des tissus. Lors de la formation d'une tumeur, la dérégulation des mécanismes contrôlant la migration peut entraîner l'invasion de tissus sains par des cellules transformées. Ce processus est à l'origine de la formation de métastases, principale cause de mortalité chez les patients atteints de cancer. Les mécanismes régulant d'une part la capacité des cellules à devenir motiles et d'autre part leur aptitude à envahir d'autres tissus font donc l'objet d'études intensives.

La migration des Cellules de la Bordure (CB) chez la drosophile est un modèle couramment utilisé afin de comprendre ces processus *in vivo*. En effet, la plupart des gènes régulant la motilité de ces cellules épithéliales ont des homologues impliqués dans l'invasion cellulaire chez les mammifères (Naora and Montell, 2005). Par ailleurs, une proportion importante de cancers est d'origine épithéliale, c'est par exemple le cas de 90% des cancers ovariens (Dubeau, 1999; Feeley and Wells, 2001).

Durant la première année de ma thèse, j'ai participé à un crible pan-génomique par ARN interférant visant à mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la migration des CB. Chaque gène était systématiquement invalidé dans l'ensemble des CB (*upd> ; slbo>*) en présence d'un *UAS-GFP*, de manière à pouvoir visualiser et analyser simplement les phénotypes de migration engendrés. Ce crible nous a notamment permis de mettre en évidence le rôle du facteur de transcription Traffic jam (Tj) (Ghiglione et al., en préparation) ainsi que de la protéine d'ancrage *Drosophila* Adenomatous polyposis coli protein 1 (dApc1) (De Graeve et al., 2012) dans la migration des CB (Voire annexes 1 et 2). Un autre candidat

potentiel révélé par ce crible est *dinr*, le gène codant pour l'unique homologue du Récepteur Insuline chez la drosophile.

Au cours du développement, des événements mécaniquement indépendants doivent être coordonnés de manière à assurer l'intégrité de l'organogenèse. Ainsi, lors de la maturation des chambres d'œuf, la migration des CB doit être coordonnée à la morphogenèse du reste de la structure pour assurer la formation du micropyle, nécessaire à la fécondation. La voie de signalisation IIS étant largement impliquée dans le développement des chambres d'œuf, elle pourrait être utilisée pour coupler ce processus et la migration des CB. Un signal systémique relativement uniforme au sein d'un organe pourrait en effet détenir ce potentiel de coordination. Par ailleurs, l'activité IIS a déjà été corrélée à l'émergence de processus invasifs, à la fois en conditions physiologique et pathologique comme pour la formation de métastases dans le cas de certains cancers (Guvakova, 2007). De plus, l'activité de la PI3K est connue pour réguler le dynamisme du cytosquelette d'actine, un mécanisme nécessaire à la migration des cellules (Sasaki and Firtel, 2006). Ces observations suggèrent un rôle crucial de la voie IIS dans la migration cellulaire, confortant l'identification d'InR au cours du crible. Nous avons donc entrepris d'étudier l'implication de la voie IIS dans la migration des CB.

Dans cette étude, nous montrons que la voie IIS est fortement activée dans les CB et qu'elle contrôle leur migration. En effet, IIS participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine, nécessaire à la formation de longues extensions cytoplasmiques indispensables à la migration. Nos résultats indiquent que dFoxO joue un rôle clé dans ce processus puisqu'il réprime l'expression de *chickadee*, qui code pour la Profiline et régule la polymérisation de l'actine. Activée dans les CB lors de leur délamination, IIS inhibe dFoxO et induit ainsi l'accumulation de la Profiline, la polymérisation de l'actine, la formation d'extensions cytoplasmiques et donc la migration. A l'inverse, la perte de fonction d'IIS active dFoxO et bloque la délamination des CB.

Ainsi, le niveau d'activation d'IIS influence le développement des chambres d'œuf et adapte en fonction la migration des CB, prévenant ainsi du découplage de ces mécanismes indépendants.

Article 2

The Drosophila Insulin Pathway Controls *Profilin* Expression and Dynamic Actin-Rich Protrusions during Collective Cell Migration

The Drosophila Insulin Pathway Controls *Profilin* Expression and Dynamic Actin-Rich Protrusions during Collective Cell Migration

Christian Ghiglione[1,2,3] , Patrick Jouandin[1,2,3] and Stéphane Noselli[1,2,3]

1. Univ. Nice Sophia Antipolis, institut de Biologie Valrose, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France

2. CNRS, institut de Biologie Valrose, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France

3. INSERM, institut de Biologie Valrose, iBV, U1091, 06100 Nice, France

Contact:

Stéphane Noselli

Tel: +33 492 076 433

Fax: +33 492 076 403

Email : noselli@unice.fr

Running title: Role of Insulin signalling in border cell migration

SUMMARY

Cell migration is essential during embryonic development and for immune response in adults. During cancer, cells can regain motility and spread through the body leading to metastasis. Therefore, understanding how cells of various origins acquire their motile behaviour is central to many normal and pathological processes. To address this question, we use Drosophila border cells as a model of collective cell migration. Here, we identify the *Drosophila* Insulin/Insulin-like Growth Factor Signalling (IIS) pathway as a key regulator of actin dynamics in border cells. Loss of IIS activity blocks the formation of actin-rich long cellular extensions that are important for the initiation of cluster migration. We show that IIS activates the expression of Chickadee, the Drosophila homolog of Profilin, therefore promoting the formation of actin extensions and migration. In this process, the transcription factor dFoxO acts as a repressor of *profilin* expression. Altogether, these results show that systemic activation of IIS controls local collective cell migration through regulation of actin protrusion dynamics.

INTRODUCTION

Motility is a key property of some specific cell types and is essential during embryogenesis to ensure proper development. It is also important during adult life, for example during the immune response, inflammation or wound-healing (Montell, 2008; Ridley et al., 2003). It is well known that cancer cells can re-activate embryonic migratory programs leading to their escape from the tumour and metastasis. In all these processes, cells can migrate either alone or in groups, in which case clusters can show complex organization into cell populations with specific functions. Cell motility can be permanent or transient, for example during an epithelial-to-mesenchymal transition or when cells re-epithelialize after reaching their target tissue. Because of the wide diversity of migration in various normal and pathological processes, it is important to develop genetically amenable models to decipher the pathways and molecules at work.

The migration of Border Cells provides a unique system to genetically dissect the mechanisms regulating invasive cell migration *in vivo* (Montell, 2006; Rorth, 2002). Border cells are a group of about eight somatic cells that are specified at the anterior pole of *Drosophila* egg chambers (Montell et al., 1992). At stage 9 of oogenesis, border cells change their shape, delaminate from the epithelium and form a cohesive cluster composed of two central Polar Cells and 6-8 surrounding outer border cells (Fulga and Rorth, 2002).

Several signalling pathways have been identified that control specific processes during border cell migration. Whereas JAK/STAT signalling and its target gene Slow Border Cells (Slbo) specify pre-migratory cells among the follicular

epithelium (Beccari et al., 2002; Ghiglione et al., 2002; Silver and Montell, 2001), Ecdysone signalling controls the timing of migration (Jang et al., 2009) while PVR/EGFR signalling determines the direction of the cluster movement (Duchek and Rorth, 2001; Duchek et al., 2001; McDonald et al., 2006). These studies as well as genome-wide profiling (Borghese et al., 2006; Wang et al., 2006) showed that border cell behaviour is subject to complex regulation with multiple signals coming from surrounding cells.

Migration of border cells is initiated by the formation of a single actin-rich 'long cellular extension' (LCE) that facilitates motility through a "grapple and pull" mechanism (Fulga and Rorth, 2002). In addition, during their migration border cells extend and retract actin-rich protrusions dynamically through cycles of F-actin assembly and disassembly (Prasad and Montell, 2007). During this essential "treadmilling" process, the dynamic actin cytoskeleton is regulated by a number of molecules, including highly conserved actin-monomer-binding proteins such as Profilin, which promotes actin polymerization, and Cofilin, which enhances filament depolymerization. Mutations in these two actin-regulating proteins lead to border cell migration defects (Verheyen and Cooley, 1994). Membrane ruffling and actin protrusions are therefore important for border cell migration, however how exactly actin dynamics is controlled in border cells to drive cell locomotion is still not fully understood.

In this study, we revealed the *Drosophila* Insulin/Insulin-like growth factor Signalling (IIS) pathway as an important new regulator of border cell migration. The IIS pathway plays a central role to couple growth with nutrition (Andersen et al., 2013; Edgar, 2006), and during oogenesis, it regulates germline stem cell division, cyst

growth and vitellogenesis (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; LaFever and Drummond-Barbosa, 2005; LaFever et al., 2010).

Here we show that specific loss of IIS activity in border cells leads to an immotile phenotype. IIS is activated by DILPs and we show that the function of IIS in border cells is independent of its role on cell growth control. Upon DILPs activation, IIS relieves the repressive activity of dFoxO on the *chickadee* gene, therefore promoting actin polymerization and the formation of long cellular extensions essential to initiate migration. These results demonstrate that systemic Insulin-like peptides provide a hormonal cue to control local cell migration through the regulation of dynamic, actin-rich protrusions.

RESULTS

The Drosophila Insulin Receptor controls border cell migration

In order to identify new genes involved in border cell migration, we performed an RNAi screen using available collections of *UAS-RNAi* transgenic flies (see Materials and Methods; unpublished results). RNAi lines were individually crossed to a composite Gal4-expressing strain *(USG>),* carrying both the *upd-Gal4 (UPD>;* polar cell driver) and *slbo-Gal4* (*SLBO>;* outer border cell driver) drivers*,* therefore targeting the expression of *UAS-RNAi* constructs in both polar and border cells. This combination of Gal4 lines allows to target all cells making the border cell cluster.

Among the candidates identified by this screen, the RNAi construct targeting the *CG18402* gene interfered strongly with border cell migration. *CG18402* encodes for the unique *Drosophila* Insulin Receptor (dInR) (Fernandez-Almonacid and Rosen, 1987; Petruzzelli et al., 1986). *USG>dinr-RNAi* stage 10 egg chambers showed strong migration defects, with 75% of border cell clusters not migrating or only partially (Fig. 1A, E). In addition, we found that the frequency and the severity of border cell migration defects rose from 75 to 95% in a $dinr^{ex15}$ *(an amorphic allele for dinr)* heterozygous mutant background (*USG>dinr-RNAi ;* $dinr^{ex15}$/+)(Fig.1E).

To confirm these results, we generated mosaic clones mutant for *dinr* (see Materials & Methods)(Xu and Rubin, 1993). Mosaic border cell clusters containing either $dinr^{ex15}$ *or* $dinr^{EC304}$ (a hypomorphic allele) homozygous mutant cells failed to migrate (Fig. 1C and data not shown). Detailed analysis showed that migration was blocked when outer border cells were mutant, however, the clusters migrated normally when only the polar cells were mutant for *dinr*, suggesting that *dinr* does not

play a role in polar cells for border cell migration (Fig. 1C,D). These results were further confirmed by expressing *dinr-RNAi* in either border (using *SLBO*>), or polar cells (using *UPD*>)(Fig. 1E).

To rule out any indirect effect of *dinr* silencing on border cell differentiation, we stained mosaic *dinr*^{ex15} clusters with a number of differentiation markers (Slbo, Singed) and found that mutant border cells were specified normally (Fig. 1B; data not shown).

Altogether, these results indicate that dInR is required specifically in outer border cells for normal migration.

The canonical IIS pathway is required for border cell migration

Expression of a dominant-negative form of the PI3K catalytic subunit (dp110^{D945A}) has been reported to have no effect on border cell migration (Duchek and Rorth, 2001; Fulga and Rorth, 2002). We repeated this experiment and obtained the same result (data not shown). Thus, our identification of dInR requirement was surprising and suggested that dInR may act in a non-canonical pathway to control migration. To test this hypothesis further, we first analysed whether a constitutive activated form of PI3K could suppress *dinr-RNAi* border cell migration defects. As shown in Fig. 2D, expression of PI3K (d*p110*^{CAAX}) fully rescued the *dinr-RNAi* migration phenotype (compare to Fig. 1E). In addition, overexpression of either *UAS-P60* (the PI3K regulatory subunit) or the inhibitory phosphatase PTEN led to severe migration phenotypes (Fig. 2A and D). Finally, generation of mutant mosaic clusters for the d*p110*^{1C1} amorphic allele or expression of *dakt-RNAi* led to impaired border cell migration (Fig. 2B, D). These results clearly indicate that PI3K is involved in

border cell migration. The discrepancy with previous results can be explained by a poor efficiency of the dp110^{D945A} construct in blocking PI3K activity.

To further assess the activity of the IIS pathway, we monitored the intracellular localization of the *tGPH* reporter gene (a GFP fused to the PH domain of the receptor for phosphoinositides-1)(Britton et al., 2002). In wild-type egg chambers, GPH is localized to the membranes of all the germ and follicle cells, with a stronger accumulation in germ cells (Fig. 2D)(Fulga and Rorth, 2002). We noticed an increase in GPH membrane localization in border cells compared with other follicle cells, starting at around stage 8-9 and persisting during migration, indicating higher activation of the IIS pathway in border cells (Fig. 2C).

Altogether, these results indicate that the canonical dInR/PI3K/dAkt signalling pathway is required for border cell migration.

Reduction of cell size is not a primary cause of migration defects in *IIS* mutant border cells

In addition to border cell migration defects, reducing *dinr* activity leads to a reduction of cell and nucleus size both in border and follicle cells (Fig. 1B, C and Fig. 3A), consistent with the known role of IIS in growth control. Since a reduced cell size may affect the ability of border cells to migrate in a comparatively normally grown egg chamber, we tested the effect of size alone on cell migration by downregulation of the proto-oncogene dMyc (de la Cova and Johnston, 2006).

Reducing *dmyc* activity either through targeted expression of *dmyc-RNAi* in border cells or generation of *dmyc*^{4} amorphic mutant border cells, led in both cases to a strong reduction of cell size (Fig. 3B; data not shown), without affecting the migration of border cells (Fig. 3C,D). These results indicate that *dmyc* is not required

for cluster movement and suggest that border cells mutants for IIS do not fail to migrate as a consequence of growth defects.

The Insulin pathway controls the organization and dynamics of the actin cytoskeleton

The actin cytoskeleton is important for membrane ruffling and protrusion dynamics during border cell migration (Prasad and Montell, 2007). It has been shown that border cells initiate their migration through the formation of a single long cellular extension (LCE) promoting movement through a “grapple and pull” mechanism (Fulga and Rorth, 2002).

Because border cells mutant for the Insulin pathway stall before they initiate migration, we tested a possible role of IIS in LCE formation, using an EGFP-actin reporter (Fulga and Rorth, 2002). Interestingly, inhibiting IIS through overexpression of P60 blocked the formation of LCE in border cells (Fig. 3A,B). Furthermore, follicle or border cells mutant for *dinr* showed a strong reduction of F-actin structures (Fig. 3C and D).

These findings indicate that the IIS pathway is important for the assembly and organization of both dynamic and stable actin structures. The absence of LCE and regular actin cytoskeleton in IIS mutant border cells provide a molecular basis for the absence of migration.

The Insulin pathway controls the levels of Profilin in follicle and border cells

The strong reduction in F-actin structures observed in *dinr* mutant cells suggests that IIS might be involved in actin polymerization, a process relying in part on the Profilin protein which maintains pools of monomeric actin. Drosophila Profilin

is encoded by the *chickadee (chic)* gene and has been shown to be involved in border cell migration (Verheyen and Cooley, 1994). Interestingly, Drosophila Profilin is ubiquitously expressed in egg chambers with a stronger accumulation in border cells (Fig. 5A,B). Clonal analysis using the $chic^{D5203}$ mutation confirmed the role of Profilin in the formation of F-Actin structures and border cell migration (Fig. 5C,D), which are both absent in mutant cells.

To test for a possible functional interaction between *chic*/Profilin and IIS, we performed genetic, molecular and rescue experiments. First, we found that removing one functional copy of the *dinr* gene led to a strong enhancement of a *chic* border cell migration phenotype. Indeed, flies harbouring a heteroallelic combination for *chic* mutations ($chic^{1320}$/ $chic^{D5203}$) led to a weak migration phenotype (13% of mutant egg chambers not migrating), which rose to greater than 50% when heterozygous for the $dinr^{ex15}$ null mutation ($chic^{1320}$/ $chic^{D5203}$; $dinr^{ex15}$ /+)(Fig. 5E and F).

Furthermore, we found that IIS controls *chic* expression in both follicle and border cells, as shown by the strong reduction of Profilin protein accumulation in $dinr^{ex15}$ mutant cells (Fig. 5G and H). To ask whether this activation of *profilin* expression represents a major response to Insulin signalling during migration, we tested the ability of *chic* to rescue a loss of IIS activity. Remarkably, Profilin overexpression was able to rescue *dinr-RNAi* border cell migration defects with the frequency of normal border cell migration raising from 4% to greater than 25% (Fig. 5F).

Taken together, these results show that IIS controls the levels of Profilin expression, which in turn is important for F-actin accumulation and migration of border cells.

FoxO is a repressor of *chickadee/profilin* expression downstream of the Insulin pathway

To further characterize the mechanism controlling *chic* expression downstream of IIS, transcriptional or not, we looked at the role of the FoxO transcription factor.

The FoxO protein is expressed in both germline and follicle cells during oogenesis (Fig. 6A). Interestingly, detailed analysis shows a dynamic expression pattern of FoxO in border cells; before delamination, the expression of FoxO is similar in presumptive border cells and surrounding follicle cells; however, once the cluster has delaminated, the levels of FoxO decrease significantly and FoxO becomes undetectable afterwards. This pattern of FoxO expression is well consistent with that of IIS activity as revealed by tGPH staining (Fig. 2D).

The decrease in FoxO and the concomitant increase in Chic/Profilin suggest that FoxO could negatively control *chic* expression to promote migration. To test this hypothesis, we overexpressed either a wild-type form of Drosophila FoxO or an active form of human FoxO (*UAS-hfoxo3a*) in border cells. Forcing the expression of FoxO through this approach led to severe migration defects, with 70% to 100% of border cell clusters not migrating (Fig. 6B-D). In these conditions, the levels of chic mRNA expression are strongly reduced, as revealed by qRT-PCR (Fig. 6E). In addition, cells mutant for *dinr* showed a strong reduction of a *chic-lacZ* reporter line (Fig. 6F,G), confirming that the Insulin pathway controls *chic* expression transcriptionally.

These results show that FoxO acts as a repressor of *chic/profilin* expression in border cells, controlling the assembly of dynamic actin-rich structures downstream of the Insulin pathway.

Summary

In this study, we reveal the Insulin pathway as a major regulator of migration in cohort. We show that activation of the IIS canonical pathway takes place in outer border cells - cells harbouring migratory activity within the cluster – and is essential for the assembly of long cellular extensions important all along the migration, including the initial steps. Results show that the formation of these actin-rich extensions relies on the up-regulation of the monomeric actin-binding protein Profilin, to support the high demand on actin necessary to assemble dynamic LCEs. In particular, IIS activation leads to increased expression of Profilin, an essential step for proper assembly and dynamics of the F-actin cytoskeleton. In this process, FoxO acts as a repressor of Profilin, whose inhibitory function is relieved through InR activation.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila strains and genetics

Drosophila culture and crosses were performed following standard procedures at 25°C, except where indicated. The following *Drosophila* strains have been used: *dinr-RNAi* (NIG-Fly); *dakt-RNAi* and *dmyc-RNAi* (VDRC); *UAS-dfoxo* and *UAS-*d*p110*^{CAAX} (Bloomington); *slbo-Gal4* (Rorth et al., 1998); *upd-Gal4* (a gift from D. Montell); *slbo-Gal4, tGPH* and *EGFP-actin, slbo-Gal4* (Fulga and Rorth, 2002) *; UAS-hfoxo3a-TM* (Junger et al., 2003); *chic*^{D5203}*FRT40A, chic*^{1320} and *UAS-chic* (a gift from L. Cooley); *pten*^{117} *FRT40A, UAS-P60, UAS-PTEN* (a gift from P. Léopold); *dinr*^{ex15} *FRT82B and dinr*^{EC304} *FRT82B (Song et al., 2003)*; *dp110*^{1C1}*FRT82B (a gift from H. Stöcker, described in (Willecke et al., 2011)); dfoxo*$^{\Delta 94}$ *FRT82B (Slack et al., 2011); dmyc*^{4} *FRT19A* (a gift from P. Gallant).

For Gal4/UAS system, 2 days old females with the designated genotypes were incubated for two days at 29°C before dissection. The *w*^{1118} flies were used as control strain.Mutant follicle cell clones were generated by mitotic recombination using the FLP/FRT technique (Xu and Rubin, 1993). Mutations on *FRT82B* chromosomes were crossed with *hsFLP; FRT82B UbiGFP* flies. Females with the *hsFLP/+; FRT82B* mutant allele/*FRT82B UbiGFP* genotype were heat-shocked for 1 hr at 37°C, twice a day for 3 days, and dissected 2 days after the last heat-shock. *chic*^{D5203}*FRT40A* or *pten*^{117} *FRT40A* mosaic clones were generated in the same way after crossing *with hsFLP; FRT40A UbiGFP* flies. *dmyc*^{4} *FRT19A mosaic clones were generated after crossing with FRT19A UbiGFP; e22cGal4, UAS-FLP* flies. In all cases, mosaic mutant clones were marked by the absence of GFP.

Gain-of-function clones were generated using the flip-out technique by crossing *UAS* flies with *hsFLP; act<CD2<Gal4, UAS-GFP* (a gift from D. Montell). The progeny was heat-shocked for 1h at 37°C, and dissected 2 days later.

***In vivo UAS-RNAi* screen**

This screen was performed by crossing the NIG-Fly *UAS-RNAi* transgenic fly collection with the *USG>* driver (a combination of *UPD>* and *SLBO>,* which allows to target the expression of *UAS* constructs in PC and outer border cell respectively, together with a *UAS-GFP* transgene allowing to visualize the border cell (De Graeve et al., 2012). *USG>UAS-RNAi* females were dissected after two days of incubation at 29°C and candidates *UAS-RNAi* lines were selected when abnormal border cell migration was observed in more than 20% of stage-10 egg chambers.

Immunostaining and imaging

Ovary dissection, fixation, and staining with antibodies, phalloidin, and DAPI were performed as described previously (Ghiglione et al., 2002). The primary antibodies used were: rabbit anti-Slbo (1:1000, (De Graeve et al., 2012)); mouse anti-Singed (1:50, SN7C, Studies Hybridoma Bank (DSHB), University of Iowa, IA, USA); mouse anti-FasIII (1:100, 7G10, DSHB); mouse anti-Profilin (1:100, DSHB); rabbit anti-dFoxO (1:500, (Slaidina et al., 2009)); chicken anti-β-Galactosidase (1:1000, Gene Tex).

Alexa Fluor-conjugated goat antibodies were used as the secondary antibodies (Molecular Probes). Phalloidin conjugates and Dapi (1:1000, Sigma) were used to outline cells and label DNA, respectively.

The samples were mounted in Mowiol and images were taken on a Zeiss LSM510 or LSM710 confocal microscope.

Real-time RT-PCR

Total RNA extraction from dissected ovaries and real-time RT-PCR for *chickadee* were performed as previously described (Slaidina et al., 2009). Three independent biological experiments each with a triplicate measurement were conducted. Primers (left 5'-ctgcatgaagacaacacaagc-3' and right 5'-caagtttctctaccacggaagc-3') were designed using the PrimerExpress software (Applied Biosystems), and tested by standard curves experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all members of the laboratory for fruitful discussions; P. Léopold and laboratory members for providing numerous reagents and helpful advices; L. Cooley, P. Gallant, E. Hafen, D. Montell, L. Partridge, L. Pick, P. Rorth, for reagents; the DSHB for antibodies; the Bloomington *Drosophila* Stock Center, the National Institute of Genetics Fly (NIG-Fly) and Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) *Drosophila* RNAi Centers for providing *Drosophila fly* lines; We thank F. Bondi, D. Chobert, M.A. Derieppe, G. Gozzerino, M. Pierret, A. Samuel and J. Soltys for their help with the *UAS-RNAi* screen; and the PRISM platform for providing state of the art imaging resources. Work in SN laboratory is supported by CNRS, Agence Nationale pour la Recherche, Association pour la Recherche sur le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale.

S.N. was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence nationale pour la Recherche (ANR), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), FRM and LabexSignalife.

Andersen, D.S., Colombani, J., and Leopold, P. (2013). Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. Trends in cell biology *23*, 336-344.

Baserga, R., Peruzzi, F., and Reiss, K. (2003). The IGF-1 receptor in cancer biology. International journal of cancer Journal international du cancer *107*, 873-877.

Beccari, S., Teixeira, L., and Rorth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during Drosophila oogenesis. Mechanisms of development *111*, 115-123.

Bianco, A., Poukkula, M., Cliffe, A., Mathieu, J., Luque, C.M., Fulga, T.A., and Rorth, P. (2007). Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. Nature *448*, 362-365.

Borghese, L., Fletcher, G., Mathieu, J., Atzberger, A., Eades, W.C., Cagan, R.L., and Rorth, P. (2006). Systematic analysis of the transcriptional switch inducing migration of border cells. Developmental cell *10*, 497-508.

Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M., and Edgar, B.A. (2002). Drosophila's insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. Developmental cell *2*, 239-249.

De Graeve, F.M., Van de Bor, V., Ghiglione, C., Cerezo, D., Jouandin, P., Ueda, R., Shashidhara, L.S., and Noselli, S. (2012). Drosophila apc regulates delamination of invasive epithelial clusters. Developmental biology *368*, 76-85.

de la Cova, C., and Johnston, L.A. (2006). Myc in model organisms: a view from the flyroom. Seminars in cancer biology *16*, 303-312.

Drummond-Barbosa, D., and Spradling, A.C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis. Developmental biology *231*, 265-278.

Duchek, P., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis. Science (New York, NY) *291*, 131-133.

Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. Cell *107*, 17-26.

Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. Nature reviews Genetics *7*, 907-916.

Fernandez-Almonacid, R., and Rosen, O.M. (1987). Structure and ligand specificity of the Drosophila melanogaster insulin receptor. Molecular and cellular biology *7*, 2718-2727.

Fulga, T.A., and Rorth, P. (2002). Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions. Nature cell biology *4*, 715-719.

Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballes, F., Medioni, C., Cerezo, D., and Noselli, S. (2002). The Drosophila cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. Development *129*, 5437-5447.

Junger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. Journal of biology *2*, 20.

LaFever, L., and Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in Drosophila. Science (New York, NY) *309*, 1071-1073.

LaFever, L., Feoktistov, A., Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2010). Specific roles of Target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the Drosophila ovary. Development *137*, 2117-2126.

McDonald, J.A., Pinheiro, E.M., Kadlec, L., Schupbach, T., and Montell, D.J. (2006). Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. Developmental biology *296*, 94-103.

Montell, D.J. (2006). The social lives of migrating cells in Drosophila. Current opinion in genetics & development *16*, 374-383.

Montell, D.J. (2008). Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. Science (New York, NY) *322*, 1502-1505.

Montell, D.J., Rorth, P., and Spradling, A.C. (1992). slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes Drosophila C/EBP. Cell *71*, 51-62.

Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. Endocrine reviews *22*, 818-835.

Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis. The Journal of cell biology *144*, 533-547.

Petruzzelli, L., Herrera, R., Arenas-Garcia, R., Fernandez, R., Birnbaum, M.J., and Rosen, O.M. (1986). Isolation of a Drosophila genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated Drosophila receptor with an anti-peptide antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *83*, 4710-4714.

Prasad, M., and Montell, D.J. (2007). Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. Developmental cell *12*, 997-1005.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science (New York, NY) *302*, 1704-1709.

Rorth, P. (2002). Initiating and guiding migration: lessons from border cells. Trends in cell biology *12*, 325-331.

Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G.M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W.*, et al.* (1998). Systematic gain-of-function genetics in Drosophila. Development *125*, 1049-1057.

Silver, D.L., and Montell, D.J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. Cell *107*, 831-841.

Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., and Partridge, L. (2011). dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in Drosophila. Aging cell *10*, 735-748.

Slaidina, M., Delanoue, R., Gronke, S., Partridge, L., and Leopold, P. (2009). A Drosophila insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states. Developmental cell *17*, 874-884.

Song, J., Wu, L., Chen, Z., Kohanski, R.A., and Pick, L. (2003). Axons guided by insulin receptor in Drosophila visual system. Science *300*, 502-505.

Verheyen, E.M., and Cooley, L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. Development *120*, 717-728.

Wang, X., Bo, J., Bridges, T., Dugan, K.D., Pan, T.C., Chodosh, L.A., and Montell, D.J. (2006). Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the Drosophila ovary. Developmental cell *10*, 483-495.

Willecke, M., Toggweiler, J., and Basler, K. (2011). Loss of PI3K blocks cell-cycle progression in a Drosophila tumor model. Oncogene *30*, 4067-4074.

Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. Development *117*, 1223-1237.

Zhang, H., Liu, J., Li, C.R., Momen, B., Kohanski, R.A., and Pick, L. (2009). Deletion of Drosophila insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 19617-19622.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *dinr* is required for border cell migration

A: *USG >dinr-RNAi* stage 10 egg chamber showing an absence of border cell migration (border cell indicated by white arrow). *dinr-RNAi* expressing cells were identified by the presence of GFP (green).

B: Detail of mosaic $dinr^{ex15}$ border cell cluster showing normal Slbo (in blue) expression in mutant cells.

C: Mosaic border cell cluster with $dinr^{ex15}$ mutant border cell and wild-type PC (indicated by Fas III, in red) remained attached to the anterior tip of the stage 10 egg chamber. White box showing border cell in C is enlarged in C' to C'''.

D: Mosaic border cell cluster with $dinr^{ex15}$ mutant PC (indicated by Fas III, in red) and wild-type border cell migrated normally. White box showing border cell in D is enlarged in D' to D'''.

E: Quantification of stage 10 border cell migration index (absence, partial or normal migration) for each indicated genotype.

$dinr^{ex15}$ mutant cells were identified by the absence of GFP (B-D).

Dapi (in grey) was used to label nuclei (A,B,C',D').

Figure 2: The canonical IIS pathway is required for border cell migration

A: *USG >P60* stage 10 egg chamber showing an absence of border cell migration (border cell indicated by white arrow). *P60* expressing cells were identified by the presence of GFP.

B: Mosaic border cell cluster with d*p110*^{1C1} mutant border cell remained attached to the anterior tip of the stage 10 egg chamber. White box showing border cell in B is enlarged in B' and B''. Dapi (in grey) was used to label nuclei. d*p110*^{1C1} mutant cells were identified by the absence of GFP.

C: Visualisation of IIS/PI3K signalling by membrane localization of *tGPH* reporter gene (in green) in wild-type egg chambers. GPH is expressed in nurse cells, oocyte, and FC in this early stage 9 egg chamber (C). Note the stronger GPH membrane accumulation in anterior FC before border cell migration as compared with the adjacent FC. C' to C''' are high magnification views of border cell expressing GPH during their migration.

D: Quantification of stage 10 border cell migration index (absence, partial or normal migration) for each indicated genotype.

Figure 3: The reduction in cell size is not responsible for migration defects

A: *dinr* ^{ex15} mutant FC are smaller than wild-type neighbouring cells.

B*: dmyc*^{4} mutant FC are smaller than wild-type neighbouring cells.

C: Stage 10 egg chamber with border cell cluster entirely mutant for *dmyc*^{4} migrated normally. White box showing border cell in C is enlarged in C' to C'''. Fas III (in red) labelled PC.

dinr^{ex15} (A) and *dmyc*^{4} (B and C) mutant cells were identified by the absence of GFP. The borders between mutant clones and neighbouring wild-type cells are marked by white dotted lines (A and B).

DAPI (in grey) labelled nuclei (A-C).

D: Quantification of border cell migration index (absence, partial or normal migration) in *USG>dmyc-RNAi* stage 10 egg chambers.

Figure 4: The Insulin pathway controls the organization and dynamics of the actin cytoskeleton

A and **B**: Stage 9 egg chambers with border cell overexpressing P60 and EGFP-actin (B) exhibited no LCE as opposed with border cell expressing EGFP-actin alone (A). A' et B' are the same views than in A and B, but show only EGFP-actin (in green). Slbo (in red) labelled border cell (A and B).

C: High magnification view of a *dinr*^{ex15} mosaic stage 9 egg chamber stained with rhodamin-phalloidin showing a reduction of F-Actin (in red) in mutant FC. The borders between mutant clone and neighbouring wild-type cells are marked by white dotted lines.

D: High magnification view of stage 10 *dinr*^{ex15} mosaic egg chamber stained with rhodamin-phalloidin showing a reduction of F-Actin in mutant border cell (marked by white arrow). Slbo (in blue) labelled border cell.

dinr^{ex15} mutant cells were identified by the absence of GFP (C and D). DAPI (in grey) labelled nuclei (A-D).

Figure 5: The Insulin pathway controls the levels of Profilin in follicle and border cells

A and **B**: Wild-type egg chambers at stage 8 and 9 (A) and 10 (B) of oogenesis stained with anti-Profilin antibodies. Profilin is ubiquitously expressed but is strongly accumulated in border cell (indicated by white arrows) before and during their migration.

C: Stage 9 *chic*^{D5203} mosaic egg chamber stained with rhodamin-phalloidin (in red) showed a reduction of F-Actin in mutant FC.

D: Mosaic border cell cluster with *chic*^{D5203} mutant oborder cell and wild-type PC (indicated by Fas III, in red) remained attached to the anterior tip of the stage 10 egg chamber.

E: *chic*^{1320}/ *chic*^{D5203} ; *dinr*^{ex15} /+ stage 10 egg chamber showing a strong border cell migration phenotype, indicating a genetic interaction between *dinr* and *chic*. Fas III (in red) labelled the PC and Slbo (in blue) labelled border cell (marked by white arrow).

F: Quantification of stage 10 border cell migration index (absence, partial or normal migration): dosage-sensitive interaction between alleles of *chic* and *dinr*^{ex15} and rescue of *dinr-RNAi* migration defects by overexpressing Profilin in border cell.

G: A *dinr*^{ex15} mosaic stage 10 egg chamber showing a reduction of the level of Profilin (in blue) in mutant FC, as compared with neighbouring cells. Mutant clone are marked by white dotted lines.

H: High magnification view of *dinr*^{ex15} mosaic stage 10 egg chamber showing a reduction of Profilin (in blue) in mutant border cell (marked by white arrows).

chic^{D5203} (C-D) and *dinr*^{ex15} (G-H) mutant cells were identified by the absence of GFP Mutant clones are outlined (D,G). DAPI (in grey) labelled nuclei (C',D', E, G',H').

Figure 6: FoxO is a repressor of *chickadee/profilin* expression downstream of the Insulin pathway

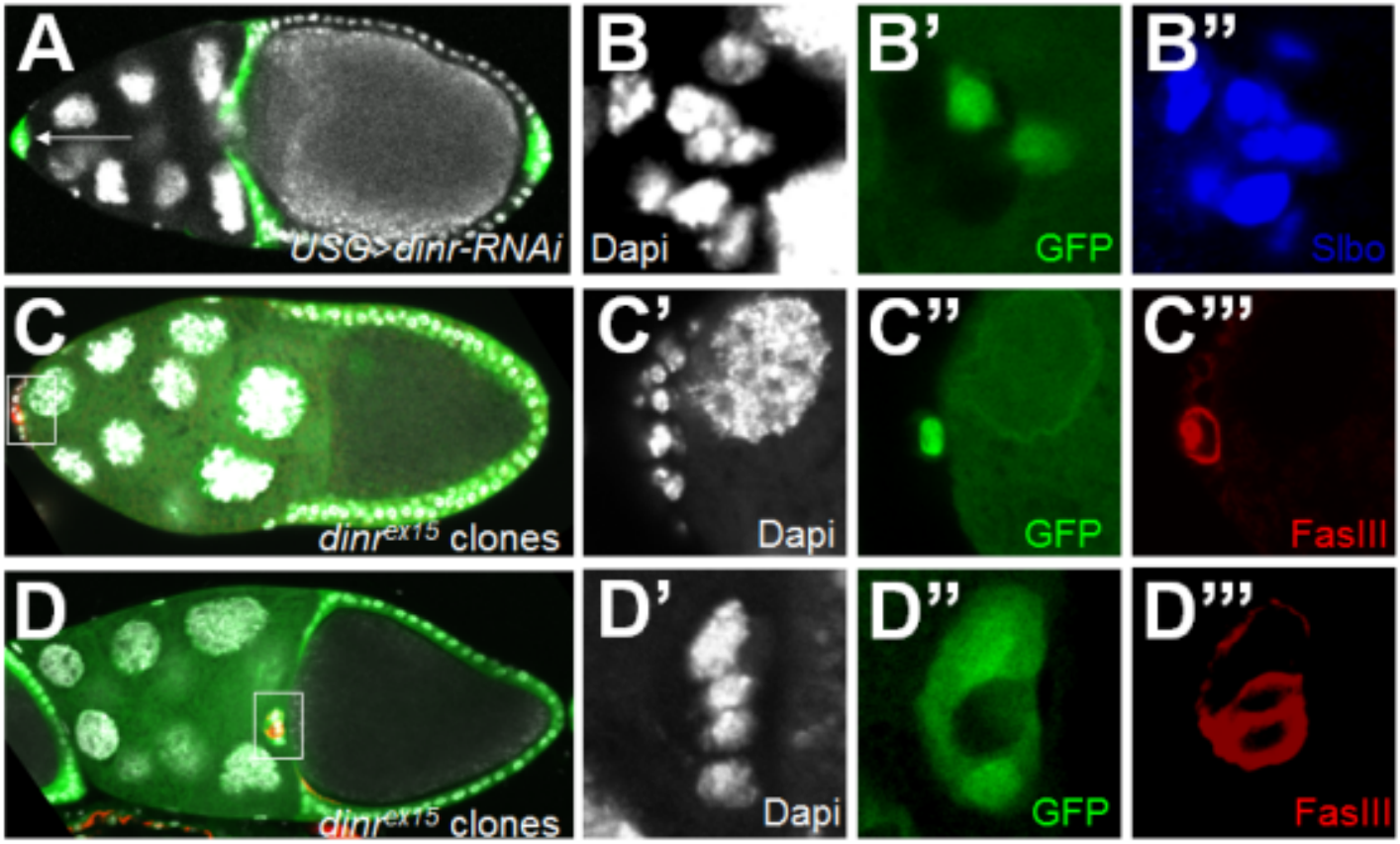
A: Wild-type egg chambers at stage 7 and 9 of oogenesis stained with anti-dFoxO antibodies showed a strong reduction of dFoxO (in red) in border cell, starting at stage 8-9. White box showing border cell in A is enlarged in A' to A'''.

B and **C**: Overexpression of wild-type dFoxO (B) or activated form of hFoxO3a (C), by using *SLBO>,* impaired border cell migration (border cell indicated by white arrows). FoxO expressing cells were identified by the presence of GFP (C and D).

D: Quantification of stage 10 border cell migration index (absence, partial or normal migration) for each indicated genotype.

E: Measurement of *chic* expression by qRT-PCR in total ovaries from control, *slbo>foxo* and *slbo>hfoxo3a-TM* flies. Fold changes are relative to the control condition. Data represent the mean of triplicate experiments +/- SD (***p<0.005). *chic* expression is repressed following FoxO activation compared to controls.

F and **G**: Mosaic stage 10 egg chambers with FC (F) or border cell (G) mutant for *dinr*^{ex15} made in *chic-lacZ* background. Mutant FC and border cell showed a strong reduction of *chic-lacZ* expression, revealed by anti-β-Galactosidase staining (F''' and G''', in red), as compared with neighbouring wild-type cells. *dinr* mutant cells were identified by the absence of GFP and are marked by white arrows.


A
USG>dinr-RNAi
B
Dapi
B'
GFP
B''
Slbo
C
dinr^ex15 clones
C'
Dapi
C''
GFP
C'''
FasIII
D
dinr^ex15 clones
D'
Dapi
D''
GFP
D'''
FasIII

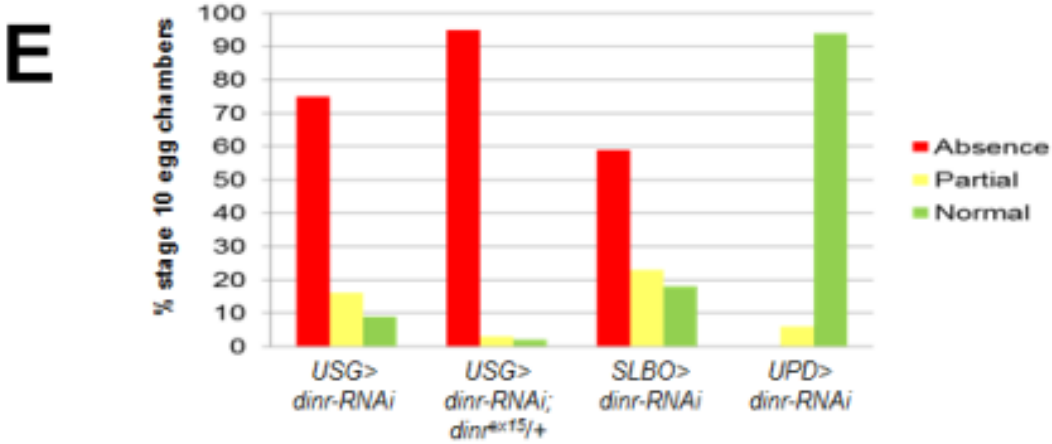
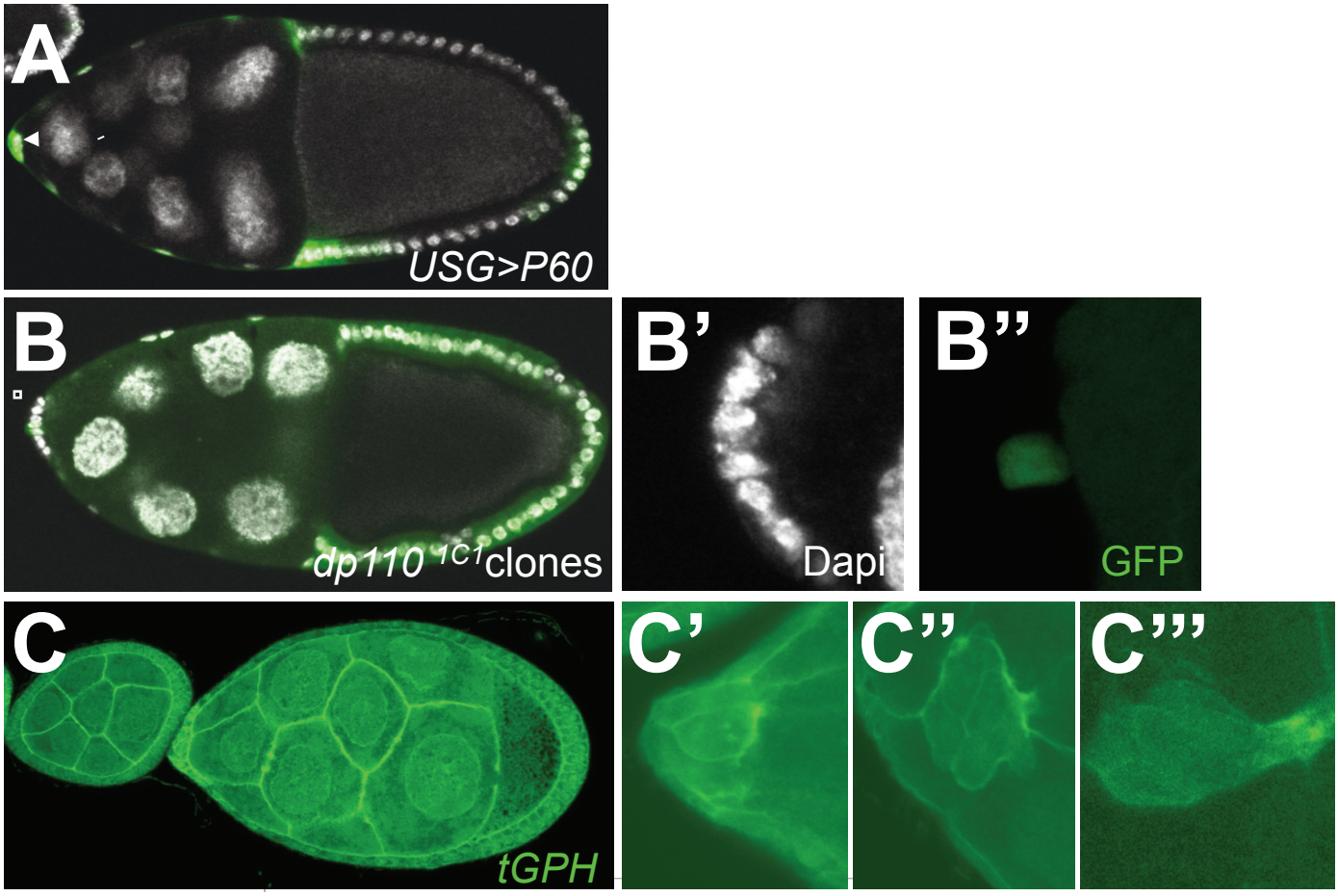

E
% stage 10 egg chambers
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
USG> dinr-RNAi
USG> dinr-RNAi; dinr^ex15/+
SLBO> dinr-RNAi
UPD> dinr-RNAi
Absence
Partial
Normal

Figure 1


A
USG>P60
B
dp110 1C1 clones
B'
Dapi
B''
GFP
C
tGPH
C'
C''
C'''

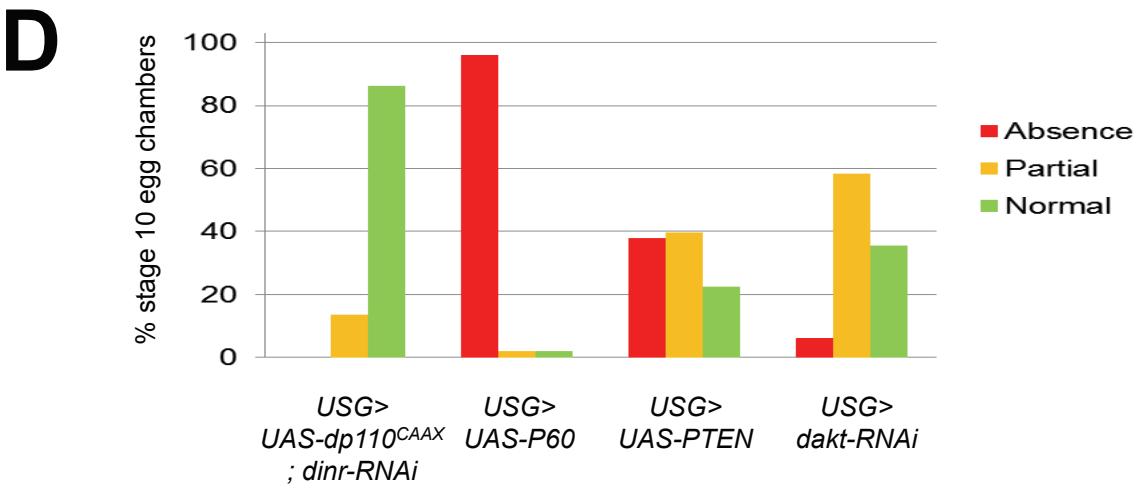
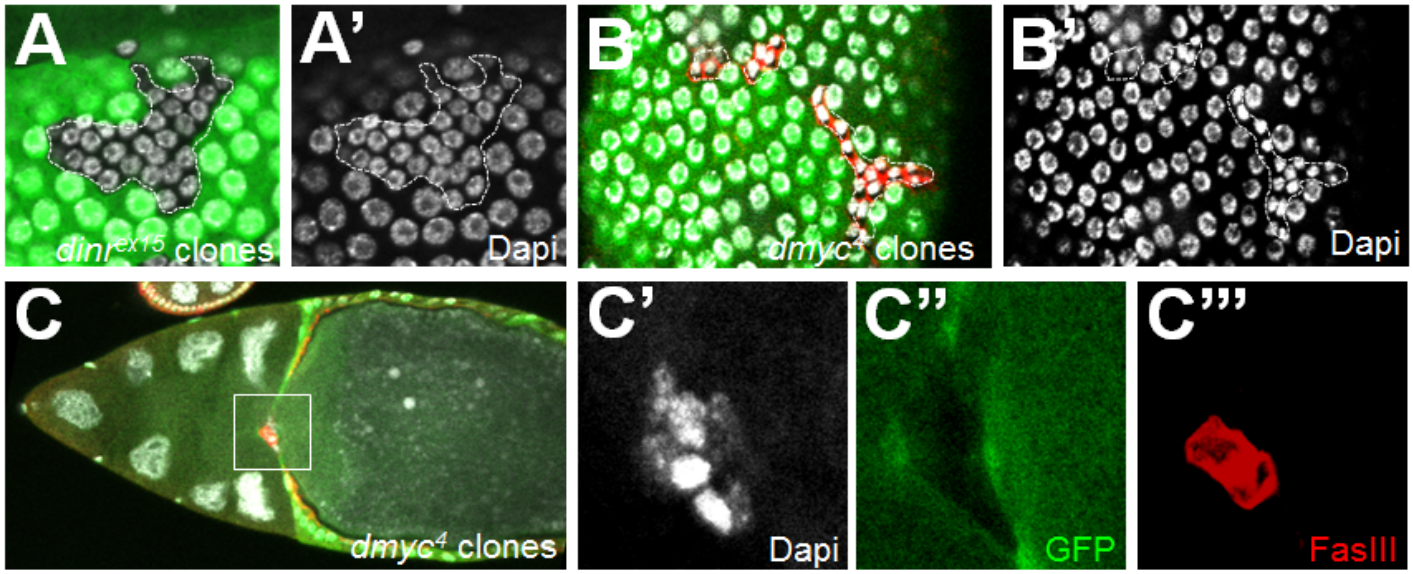

D
% stage 10 egg chambers
100
80
60
40
20
0
Absence
Partial
Normal
USG> UAS-dp110CAAX ; dinr-RNAi
USG> UAS-P60
USG> UAS-PTEN
USG> dakt-RNAi

Figure 2


A
dinr ex15 clones
A'
Dapi
B
dmyc3 clones
B'
Dapi
C
dmyc4 clones
C'
Dapi
C''
GFP
C'''
FasIII

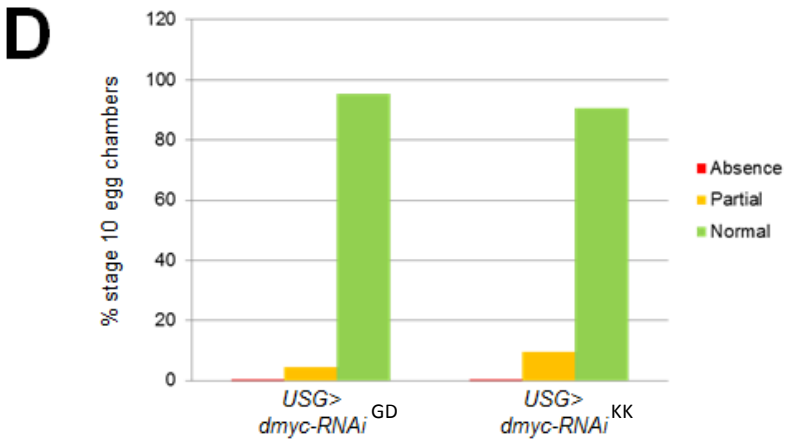

D
% stage 10 egg chambers
120
100
80
60
40
20
0
USG> dmyc-RNAi GD
USG> dmyc-RNAi KK
Absence
Partial
Normal

Figure 3

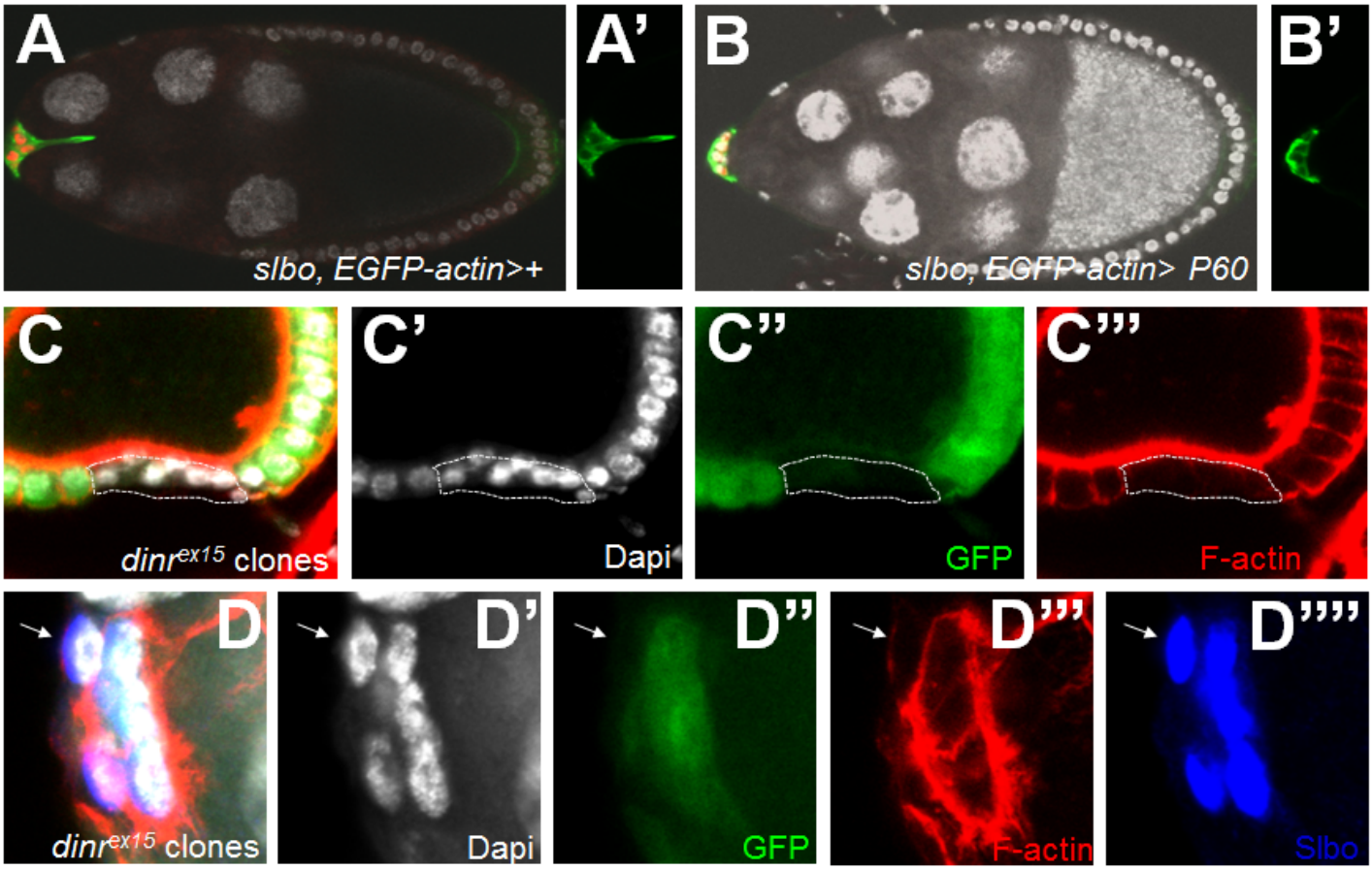

A
slbo, EGFP-actin>+
A'
B
slbo, EGFP-actin> P60
B'
C
dinr ex15 clones
C'
Dapi
C''
GFP
C'''
F-actin
D
dinr ex15 clones
D'
Dapi
D''
GFP
D'''
F-actin
D''''
Slbo

Figure 4

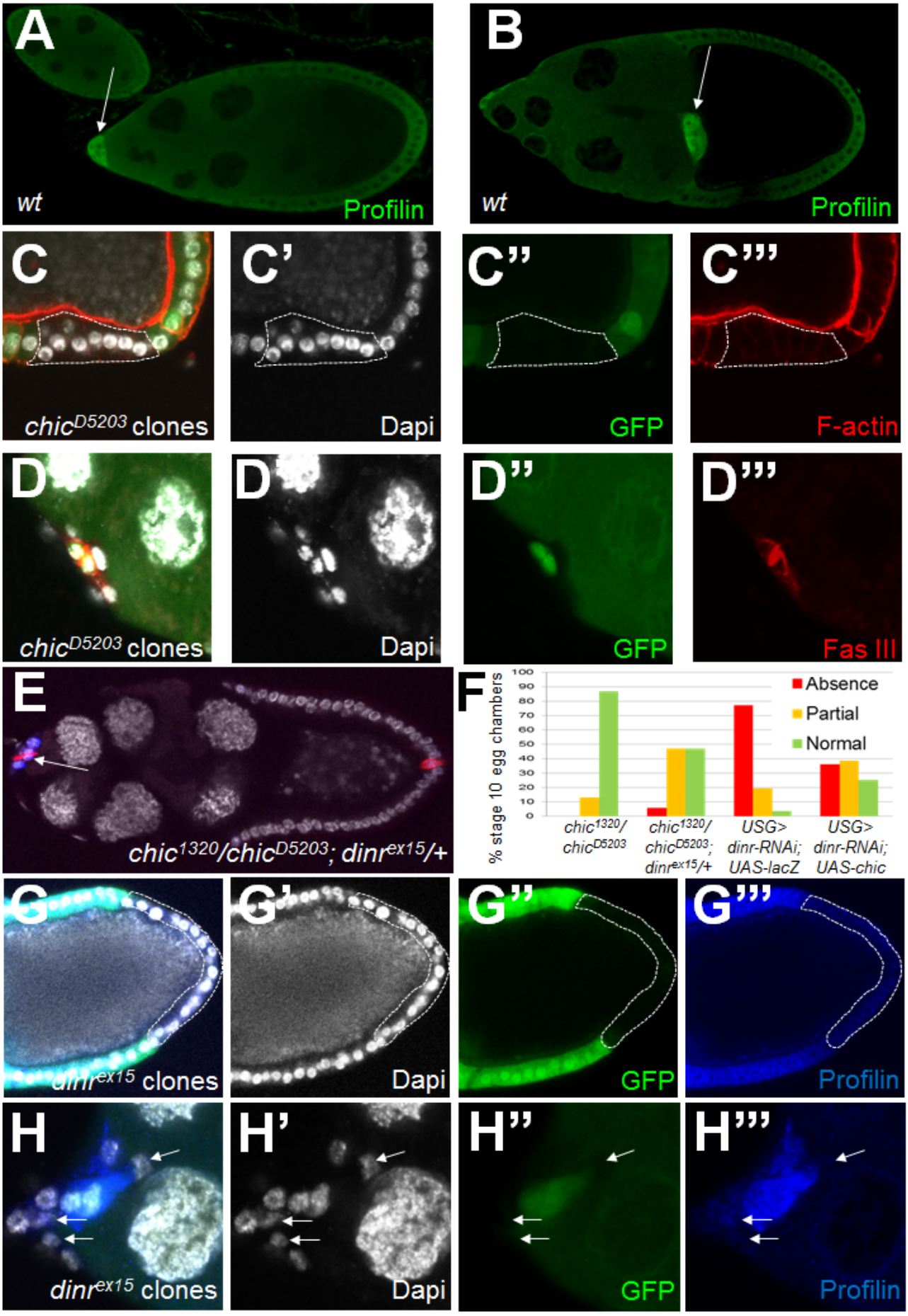

A
wt
Profilin
B
wt
Profilin
C
chicD5203 clones
C'
Dapi
C''
GFP
C'''
F-actin
D
chicD5203 clones
D
Dapi
D''
GFP
D'''
Fas III
E
chic1320/chicD5203; dinrex15/+
F
% stage 10 egg chambers
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Absence
Partial
Normal
chic1320/ chicD5203
chic1320/ chicD5203; dinrex15/+
USG> dinr-RNAi; UAS-lacZ
USG> dinr-RNAi; UAS-chic
G
dinrex15 clones
G'
Dapi
G''
GFP
G'''
Profilin
H
dinrex15 clones
H'
Dapi
H''
GFP
H'''
Profilin

Figure 5

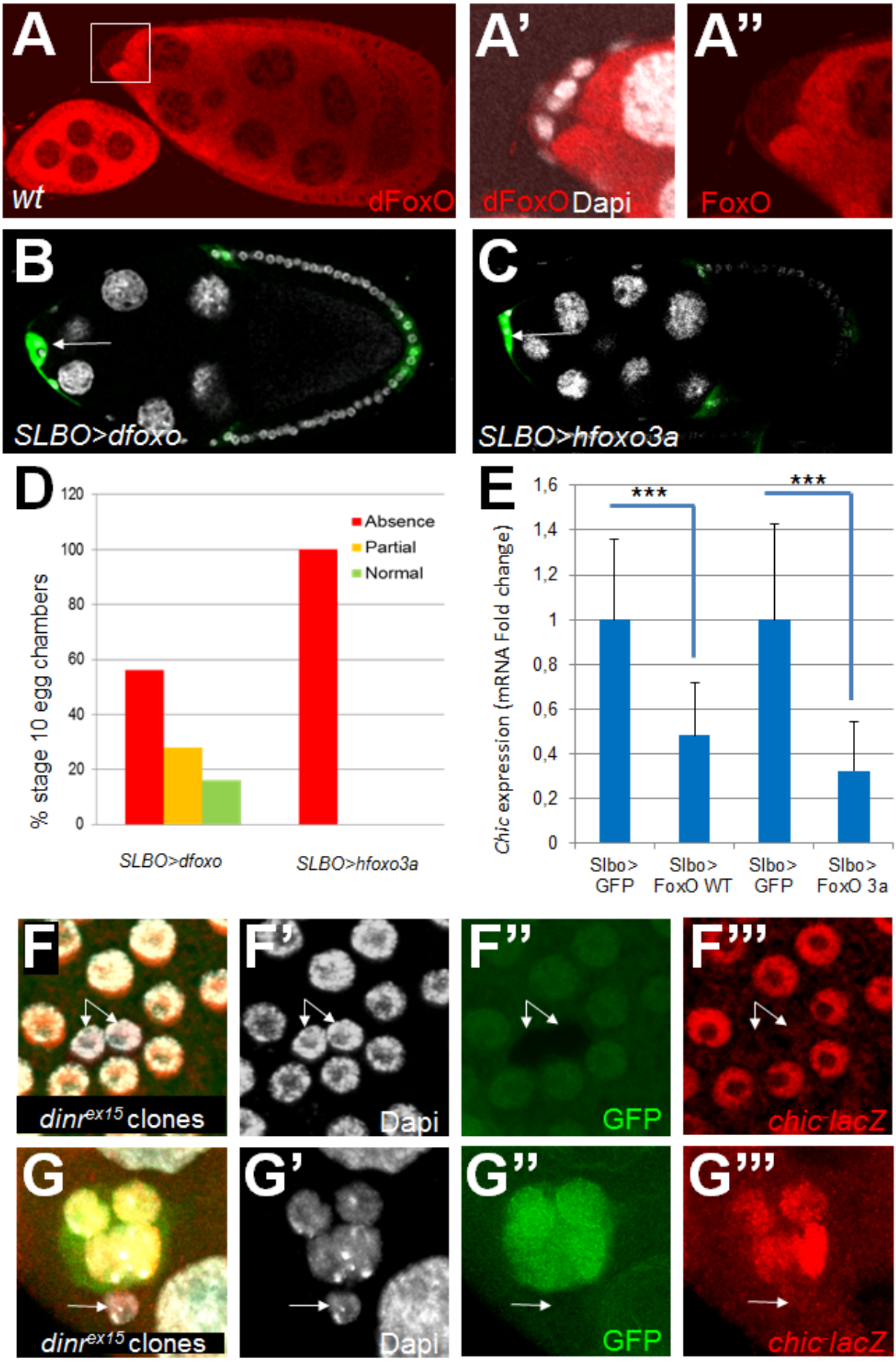

A
wt
dFoxO
A'
dFoxO Dapi
A''
FoxO
B
SLBO>dfoxo
C
SLBO>hfoxo3a
D
% stage 10 egg chambers
120
100
80
60
40
20
0
Absence
Partial
Normal
SLBO>dfoxo
SLBO>hfoxo3a
E
Chic expression (mRNA Fold change)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
***
***
Slbo> GFP
Slbo> FoxO WT
Slbo> GFP
Slbo> FoxO 3a
F
dinr^ex15 clones
F'
Dapi
F''
GFP
F'''
chic-lacZ
G
dinr^ex15 clones
G'
Dapi
G''
GFP
G'''
chic-lacZ

Figure 6

Discussion

Un aspect crucial de la morphogenèse des chambres d'œuf est la migration des cellules épithéliales en position postérieure, où elles forment le chorion. Un groupe de cellules épithéliales spécifiées, les Cellules de la Bordure (CB), migre indépendamment du reste de l'épithélium folliculaire, au travers du tissu germinal. La migration des CB et celle des autres cellules folliculaires doivent être coordonnées, puisque ces cellules participeront de concert à la formation du micropyle. La délamination des CB doit donc intervenir à un stade de développement spécifique, et la voie de signalisation de l'Ecdysone en contrôle le déclenchement. Cependant, l'état nutritionnel des organismes faisant varier les vitesses de développement, un découplage entre la vitesse de croissance des chambres et la vitesse de migration des CB est susceptible de se mettre en place.

La voie de la signalisation IIS régule l'ovogenèse en fonction des apports nutritionnels. En plus de son rôle dans les cellules germinales et au sein de l'épithélium folliculaire, nous avons montré qu'elle agissait également dans les CB. En effet, IIS intervient en parallèle de la signalisation Ecdysone, probablement de manière à ajuster leur migration au développement des chambres d'œuf.

Il serait intéressant de vérifier qu'en condition de carence, la diminution des signaux d'IIS induise également l'activation du facteur de transcription dFoxO dans les CB, pour conduire à la répression de *chickadee*, un gène codant pour l'homologue de la Profiline chez la drosophile. Il est probable que la Profiline soit requise pour la formation de longues extensions cytoplasmiques (LCE), indispensables à la migration des CB. Ces dernières seraient donc bloquées en carence, au même titre que le développement des chambres d'œuf, évitant ainsi tout décalage entre ces processus. A l'inverse, lorsque les conditions de nutrition sont optimales, l'activité d'IIS réprime celle de dFoxO, levant ainsi le verrou sur la migration. Les CB se dirigent alors progressivement vers l'ovocyte, en même temps que les autres cellules folliculaires.

Lors de la migration des CB, un unique LCE est formé, systématiquement dans la Cellule de la Bordure externe en position la plus postérieure de la cohorte. Nous avons

montré que la voie IIS contrôle la formation du LCE. Ceci suggère que, malgré l'implication de ces signaux hormonaux, une activation polarisée d'IIS se mette en place au sein des CB, avec une activité maximale dans la cellule postérieure. Pour aboutir à un tel phénomène, deux possibilités, non exclusives, sont envisageables. L'activité IIS peut être potentialisée dans la CBe postérieure, ou à l'inverse tamponnée dans les CBe antérieures.

Au cours de cette étude, nous n'avons pas été en mesure de déterminer les sources précises des DILPs perçus par les CB. Une hypothèse expliquant l'activation différentielle d'IIS serait la sécrétion des ligands sous forme de gradient, par exemple depuis l'ovocyte. Cependant, les capacités de diffusion d'une hormone restent difficilement conciliables avec l'établissement d'un gradient sur une courte distance. Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes visant à modifier la signalisation en aval d'InR, de manière cellulaire autonome.

Il faut noter que le gradient de molécules de guidage sécrétées par l'ovocyte tend déjà à rendre les CB non équivalentes au sein de la cohorte. En effet, les voies de signalisation des récepteurs EGF et PVF sont également plus activées dans la CBe la plus en avant, permettant ainsi la formation d'un LCE unique *via* Rac (Wang et al., 2010). Par ailleurs, la petite GTPase dRas est un effecteur en aval de ces récepteurs Tyrosine Kinase, requis pour la migration des CB (Lee and Montell, 1997). Il est donc probable que son activation soit également polarisée, en fonction du gradient de molécules de guidage. De manière intéressante, il a été montré que la PI3K présente un domaine de liaison à dRas, nécessaire à son activation maximale, notamment pendant l'ovogenèse (Orme et al., 2006). Une telle interaction entre dRas et la PI3K dans les CB pourrait donc biaiser l'activation de la PI3K en aval de dInR, indépendamment des DILPs. Un tel mécanisme conduirait en effet à potentialiser l'activité de la PI3K, et donc la synthèse de Profiline, dans la CBe qui émet le LCE.

Au sein du cluster en migration, l'information de direction est propagée par l'activation de la voie de signalisation JNK, qui ajuste en fonction la cohésion des CB (Wang et al., 2010). Chez les mammifères, il a été montré que JNK phosphoryle les facteurs de transcription FoxO sur des résidus différents de ceux régulés par AKT, de manière à les activer (Essers et al., 2004). Chez la drosophile, JNK est également capable d'activer dFoxO, notamment pour réguler l'apoptose en réponse à l'irradiation aux UV (Luo et al., 2007).

Ainsi, lors de la migration des CB, dFoxO pourrait être un autre facteur régulé par la voie de signalisation JNK, de manière à relayer l'information de direction entre les cellules. En effet, l'activation de dFoxO *via* JNK conduirait à la répression de la Profiline dans les cellules qui ne doivent pas étendre de LCE.

Ainsi, malgré la réception uniforme de DILPs au sein des CB, l'activité de la voie de signalisation en aval de dInR serait ajustée de manière à ce qu'elle soit conciliable avec la migration. D'une part, l'activité PI3K serait potentialisée par dRas dans la CBe au front de migration, de manière à inhiber FoxO. D'autre part, dFoxO serait directement activé dans les cellules en arrière du front de migration par la voie JNK. Ce mécanisme conduirait l'expression maximale de la Profiline spécifiquement dans la cellule émettant le LCE. Ce modèle reste dépendant du niveau d'activité initial d'IIS, ajustant la migration des CB au développement de la chambre d'œuf en fonction de l'état nutritionnel (Figure 43).

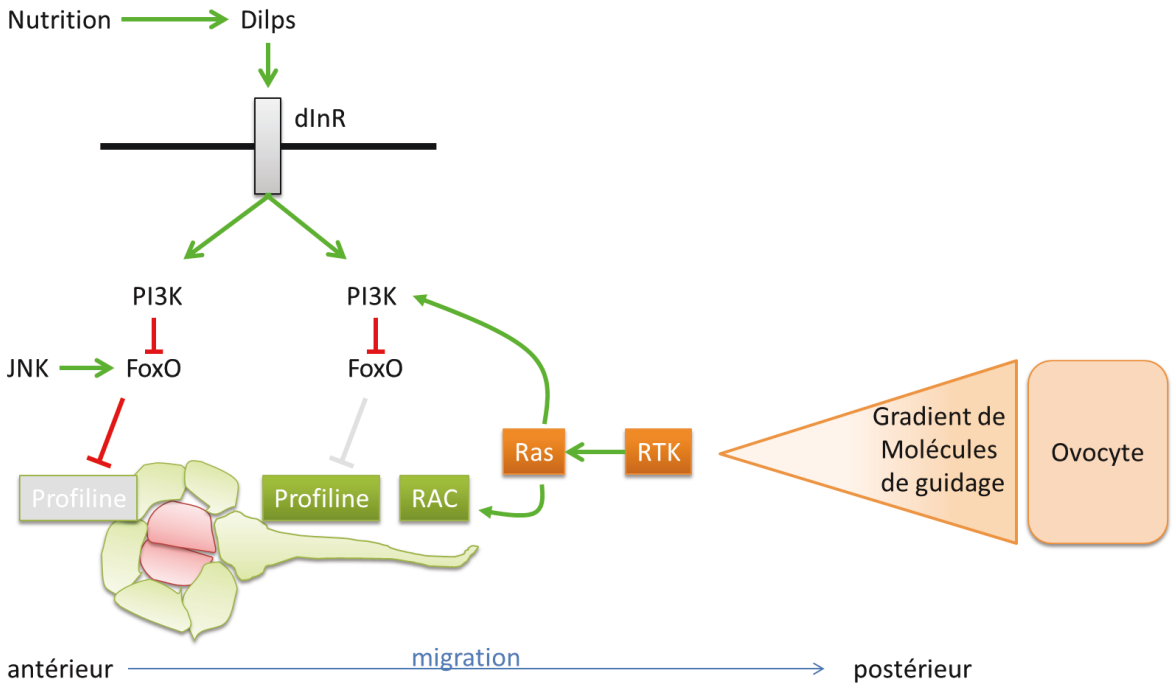


Figure 43 : Hypothèse de polarisation de l'activité IIS dans le contrôle de la formation d'un LCE unique. Dans les CB antérieures, la Profiline est réprimée sous l'effet JNK/FoxO. Au front de migration, l'expression de la Profiline est maintenue à haut niveau grâce à l'interaction Ras/PI3K. Rac et Profiline coopèrent pour la formation du LCE. RTK : Récepteurs Tyrosine Kinase.

Discussion générale

Ovogenèse : croissance des follicules et sélection

Différentes stratégies de reproduction sont présentes au sein du règne animal, de manière à concilier au mieux l'assurance d'une descendance avec les modes de vie des organismes. De ce fait, on peut retrouver des stratégies visant à engendrer une descendance massive, gage de survie d'au moins une partie, c'est le cas de la drosophile. A l'inverse, d'autres espèces optimisent la capacité de survie d'une descendance limitée en nombre, c'est le cas des mammifères. Différents mécanismes assurent l'efficacité de chaque stratégie, comme par exemple la ponte d'œufs, la gestation ou le soin aux juvéniles. Leur optimisation est déjà visible lors de la production des ovocytes. Chez la drosophile, les ovocytes sont produits rapidement, en continu, et sont tous équivalents. A l'inverse, chez les mammifères, leur développement est lent, interrompu par des mécanismes de contrôle cycliques, et ils sont sélectionnées pour leur potentiel de fécondation. Cependant, dans les deux cas, la robustesse de l'ovogenèse influence directement les capacités reproductrices des individus, et repose sur des mécanismes communs.

L'intégrité de l'ovogenèse, chez les mammifères comme chez la drosophile, dépend du développement concomitant et interdépendant de cellules somatiques et germinales. L'intercommunication de ces tissus permet de coordonner leur maturation. De plus, des signaux systémiques couplent leur développement à l'état physiologique des organismes.

Atteignant un certain stade, la vitellogenèse chez la drosophile ou le stade antral chez les mammifères, les follicules ovariens entrent dans une phase de croissance massive, dont l'initiation dépend d'organes centraux, la glande en anneau chez la drosophile et la glande pituitaire de l'hypophyse chez les mammifères. En effet, chez la drosophile, la JH induit la sécrétion d'ecdysone par les chambres d'œuf. Chez les mammifères, la FSH induit la sécrétion d'œstrogènes par les follicules ovariens. Dans les deux cas, cette production d'hormones stéroïdes participe largement à la croissance. Une fois cette croissance suffisante, les follicules finissent leur maturation et l'ovocyte reprend la méiose.

Les principales phases de l'ovogenèse sont donc conservées entre mammifères et drosophile. Cependant, de nombreuses différences existent, à la fois développementales et

morphologiques. Une différence majeure semble être la dégénérescence spontanée des follicules ovariens, l'atrésie, spécifique des mammifères. Cependant, la régulation de ce processus est encore mal connue. De manière intéressante, en condition de carence, de tels mécanismes de sélection par l'apoptose se mettent en place chez la drosophile. Il est donc probable que chez la drosophile, la carence mette au jour des signaux conservés qui régulent également l'atrésie chez les mammifères. Par ailleurs, la voie de signalisation IIS participe à la survie des follicules ovariens à la fois chez la drosophile et chez les mammifères. L'apport d'un nouveau modèle, celui de « l'ovogenèse chez la drosophile carencée », pourrait donc permettre de mieux comprendre ce processus de sélection constitutif présent chez les mammifères, dépendant ou non de la voie IIS.

Les apports du modèle drosophile

Dégénérescence précoce

Chez les mammifères, une première vague d'apoptose se met en place durant les stades précoces, lors de la formation des cystes germinaux jusqu'à la génération de follicules primordiaux. Cette apoptose, constitutive, est présentée comme nécessaire à l'individualisation des ovogonies au sein des cystes, de manière à permettre la formation d'un follicule (Pepling and Spradling, 2001). Parmi les follicules primordiaux, certains ovocytes dégénèrent tandis que les cellules de la granulosa précoce persistent pour s'associer aux survivants, une manière de contrôler le nombre initial de cellules somatiques par ovocyte (Scaramuzzi et al., 2011). Cependant, les signaux régulant l'apoptose de ces cellules sont peu documentés.

Chez la drosophile, en condition de carence nutritionnelle, un tel processus de dégénérescence des cystes germinaux se met en place dans les régions 2a et 2b du germarium (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001) ; le but étant probablement d'éliminer dès le début de leur développement des follicules qui ne pourront être maintenus sous une carence prolongée. De manière intéressante, la voie de signalisation IIS n'est impliquée dans

cette apoptose précoce chez aucun de ces organismes, tandis que son activité semble participer à l'intégrité de la plupart des étapes suivantes de l'ovogenèse (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Sirotkin, 2010). Cependant, ce processus intervient à des stades de développement comparables entre ces espèces, suggérant que des mécanismes communs peuvent être à l'origine de son contrôle. L'équivalent des facteurs de dégénérescence des cystes germinaux en carence chez la drosophile pourrait donc contrôler le pool de follicules primordiaux chez les mammifères, c'est-à-dire le potentiel reproductif de ces derniers.

Dégénérescence tardive

Bien que des vagues d'apoptose précoce existent chez les mammifères, la phase majeure de l'atrésie proprement dite se met en place lors de la formation des follicules antraux. En effet, une sélection se fait sur les capacités de croissance des follicules. Prérequis pour la formation d'un ovocyte mature, les ovocytes moins prompts à croitre entrent en apoptose par défaut (Webb and Campbell, 2007). A l'inverse de la dégénérescence au sein des cystes germinaux, les IGFs jouent un rôle majeur durant cette phase puisqu'ils promeuvent la croissance de concert avec les gonadotrophines et les stéroïdes. Un déficit de la signalisation IIS au sein de ces follicules entraîne l'activation des facteurs de transcription FoxO, l'expression de gènes pro-apoptotiques et donc un comportement atrétique (Uhlenhaut and Treier, 2011).

Un processus comparable se met en place en carence chez la drosophile, à des stades de développement équivalents. Pendant la vitellogenèse, IIS agit en parallèle et en amont de l'hormone juvénile (JH) et de l'ecdysone pour contrôler la croissance des chambres d'œuf (Schiesari et al., 2011). La carence induit l'inhibition d'IIS, entraînant leur dégénérescence. Le modèle drosophile et ses outils génétiques poussés pourraient donc permettre de mieux comprendre l'effet de ces signaux au sein de chaque tissu et comment ils sont transmis entre les tissus pour induire l'apoptose généralisée des follicules ovariens. Je discuterai dans

les paragraphes suivants le potentiel du modèle drosophile sur la compréhension des mécanismes liés à l'atrésie folliculaire.

Transition mitose/endocycle et sélection des follicules ovariens

Chez les mammifères, suite à la sécrétion cyclique de hauts niveaux de FSH, une population de follicules antraux précoces est sélectionnée chaque mois pour poursuivre son développement (McGee and Hsueh, 2000). Parmi ceux-ci, un follicule dominant (ou plus selon les espèces) est sauvé de l'atrésie (Gore et al., 1997). L'hormone antimüllérienne (AMH), une glycoprotéine de la famille des TGFβ (transforming growth factor β,) porte des fonctions antagonistes des processus de sélection et dominance. Sécrétée par les cellules de la granulosa du stade primaire au stade antral précoce, l'AMH semble inhiber l'action de la FSH, bien que les mécanismes soient mal décrits (Son et al., 2011). La sécrétion d'AMH décroit au fur et à mesure que les follicules grossissent, et elle est abolie dans le follicule dominant (Jeppesen et al., 2013). Sélection et dominance des follicules résultent donc d'une balance entre les niveaux de FSH et d'AMH.

Chez la drosophile, de tels processus de sélection n'existent pas. Pourtant, on peut situer l'équivalent de ces follicules antraux précoces au niveau des chambres d'œuf au stade 6/7, lors de la transition mitose/ endoréplication (M/E) des cellules folliculaires. En effet, en condition de carence, c'est le stade qui délimite la frontière entre les chambres d'oeuf en développement et les chambres en dégénérescence, tout comme l'atrésie débute au stade antral chez les mammifères. De plus, chez la drosophile, en carence, j'ai montré que les follicules entrent dans un état de « transition mitose/ endocycle en pause » (PMES). Dans ces conditions, les chambres d'œuf sont donc en attente de signaux, les DILPs, leur permettant la reprise de leur croissance, au même titre que les follicules antraux précoces sont en attente d'un signal de sélection chez les mammifères. Etant données ces similarités, il est envisageable que des mécanismes conservés régulent ces étapes. Conformément à cette hypothèse, IIS contrôle d'une part la transition M/E chez la drosophile, mais également la sélection des follicules chez les mammifères.

Chez la drosophile, la voie de signalisation Notch inhibe celle de Hedgehog (Hh) lors de la transition M/E (Sun and Deng, 2007). En effet, Hh antagonise cette transition puisqu'il promeut la prolifération des cellules folliculaires (Zhang and Kalderon, 2000). Cependant, les cibles d'Hh dans ce processus sont inconnues. De manière intéressante, un gène cible de la voie de signalisation Hh est une protéine de la famille des TGFβ, codée par *decapentaplegic* (*dpp*) (Zecca et al., 1995). Un parallèle intéressant peut donc être fait avec les mammifères, où les TGFβ (AMH et Dpp) pourraient inhiber ces transitions cruciales au cours de l'ovogenèse. La démonstration d'un rôle de Dpp lors de la transition M/E permettrait alors de mieux décrypter les effets de l'AMH sur les follicules antraux, qui restent mal compris.

Transition mitose/endocycle, atrésie et facteurs de survie

Chez les mammifères, l'atrésie se met en place pendant la phase antrale, et seuls 0,1% des follicules survivront. Chez la drosophile, en carence, la dégénérescence débute avec les phases vitellogéniques, et approximativement 50% des chambres d'œuf entrent en apoptose. Les follicules ovariens subissent donc un brusque changement de leur capacité de survie lors de ces transitions, c'est-à-dire lorsque la phase de croissance massive se met en place. Par ailleurs, chez les mammifères, la survie des follicules est décrite comme résultant principalement de leur capacité de croitre. Il est donc important de bien connaitre d'une part les facteurs antagonistes de la croissance mais garantissant la survie avant la transition, et d'autre part les facteurs qui promulguent la croissance lors de la transition mais dont les niveaux déterminent la balance entre survie et dégénérescence. Si ces derniers sont bien connus chez les mammifères (Webb and Campbell, 2007), peu de données existent sur les signaux de survie des phases pré-vitellogéniques, ou pré-antrales.

Au cours de mes travaux, j'ai pu identifier Cut comme un facteur potentiel de survie des chambres d'œuf en condition de carence. L'expression de Cut est spécifiquement maintenue lors de l'établissement de la PMES, de manière à garder en vie ces chambres d'œuf quiescentes. Son expression ectopique sauve les chambres d'œuf vitellogéniques de l'apoptose, et à l'inverse, son inhibition induit la dégénérescence des stades

prévitellogéniques. C'est donc la répression de Cut à la transition M/E qui rend les chambres d'œuf susceptibles d'entrer en apoptose. Il est intéressant de noter que la présence d'un mécanisme de ce type chez les mammifères expliquerait également la mort massive des ovocytes. En effet, la répression d'un tel facteur de survie dans les stades antraux aurait pour conséquence leur atrésie.

Dominance des follicules ovariens

Chez les mammifères, le phénomène de dominance permet à de rares follicules ovariens d'échapper à l'atrésie. Chez la drosophile, les chambres d'œuf vitellogéniques survivantes en carence peuvent être considérées comme dominantes. Une différence majeure est que ces dernières restent bloquées au lieu de poursuivre leur croissance. Cependant, il est probable que les mécanismes qui déterminent leur survie soient similaires à ceux qui contrôlent la dominance d'un follicule chez les mammifères. Il est donc envisageable de s'appuyer sur les données du modèle mammifère pour élucider ces mécanismes.

Sélection négative

Chez les mammifères, le follicule dominant résulte d'abord d'un processus de sélection négative. Un follicule antral aux capacités de croissance sensiblement supérieures à celles des autres induit un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire de FSH. En absence de ce facteur gonadotrope déterminant, l'écart de croissance se creuse entre le follicule dominant et les follicules légèrement plus précoces. A cela s'ajoute l'effet de l'AHM, qui continue de réprimer la croissance de ces derniers, tandis qu'elle n'est plus exprimée par le follicule dominant. Enfin, les IGFs intra-ovariens favorisent d'autant plus la croissance de celui-ci. L'ensemble de ces mécanismes fait que seul le follicule dominant est sauvé de l'atrésie.

Il est intéressant de noter que chez la drosophile, en condition de carence nutritionnelle, la dégénérescence au sein des phases vitellogéniques n'est pas uniforme (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001). En effet, une proportion de chambres d'œuf plus élevée dégénère aux stades 8 et 9 comparée au stade 10. En d'autres termes, les chambres d'œuf dont la croissance est plus avancée semblent moins sensibles à l'apoptose. Cette observation suggère donc une sélection négative des chambres d'œuf « dominantes », comme c'est le cas chez les mammifères.

Les cellules somatiques des follicules ovariens et des chambres d'œuf « dominants » permettent une production de protéines en quantité accrue. Dans le premier cas, elles sont plus nombreuses, et dans le second les cycles d'endoréplication sont plus avancés. Chez les mammifères, c'est cette propriété du follicule dominant qui permet l'émission d'un signal assez important pour inhiber la sécrétion de FSH. Par analogie avec les mammifères, il est donc possible que les chambres d'œuf « dominantes » en carence inhibent la production d'hormone juvénile (JH) par la glande en anneau, ajoutant ainsi à l'effet de l'inactivation d'IIS (qui réduit également la production de JH). L'absence de ces facteurs gonadotropes expliquerait l'apoptose des stades moins avancés. Par la suite, l'existence de facteurs de sélection positifs déterminerait le maintien des chambres d'œuf survivantes.

Sélection positive

En parallèle de la sélection négative, une sélection positive participe également au maintien du follicule dominant. Pour cela, ce dernier potentialise sa propre sensibilité à la FSH, notamment en induisant l'expression des récepteurs de cette hormone. Par ailleurs, les IGFs sont largement impliqués dans la sélection positive, d'une part au travers de la sensibilité à la FSH et d'autre part au niveau de leur fonction de croissance propre. Ces follicules continuent donc de croitre et de répondre à la FSH, malgré sa concentration limitée du fait de l'inhibition des sécrétions pituitaires.

Chez la drosophile, la carence entraîne la baisse de sécrétion de JH et de synthèse d'ecdysone par les ovaires, reproduisant un effet similaire au rétrocontrôle des follicules sur

l'hypophyse chez les mammifères. Par analogie avec ces derniers, il est donc possible que des mécanismes visent à sur-exprimer les récepteurs de ces hormones dans les chambres d'œuf vitellogéniques survivantes, de manière à ce qu'elles puissent toujours y répondre et ainsi être maintenues.

Le facteur de transcription dFoxO pourrait jouer un rôle particulier dans les follicules « dominants ». D'abord, *dinr* (codant pour le Récepteur Insuline) est une cible positive connue de dFoxO, qui augmente donc la sensibilité des chambres d'œuf survivantes aux DILPs. De manière intéressante, j'ai observé que la sur-expression de DILP6 dans les ovaires, induite par la carence, est abolie en l'absence de dFoxO (Figure 37 et résultats non montrés). Ceci suggère que dFoxO régule également l'expression de DILP6 dans les ovaires. Un équilibre entre l'activation de dFoxO, l'expression d'InR et de DILP6 pourrait donc participer au maintien des chambres d'œuf « dominantes » en carence. Conformément à cette hypothèse, j'ai observé que la mutation de dFoxO dans des mouches carencées entraîne une chute drastique de la survie des chambres d'œuf vitellogéniques (résultats non montrés). Il est donc probable que des mécanismes de sélection positive des follicules ovariens existent également chez la drosophile, et qu'ils se révèlent en condition de carence.

Communication inter-folliculaire

Chez les mammifères, le follicule dominant inhibe systématiquement la croissance des autres. Ces phénomènes de dominance se retrouvent également pour des follicules en culture, initialement équivalents. La dominance ne pouvant être expliquée par le relai de l'hypophyse dans ces conditions, ces observations suggèrent l'existence de signaux inter-folliculaires. La démonstration d'une telle communication reste cependant très difficile à mettre en œuvre *in vivo*.

Chez la drosophile, l'ovogenèse consiste en une succession de chambres d'œuf à des stades progressivement plus avancés. Les temps de développement de chaque stade sont différents, et la carence a des effets variables selon ces stades. Malgré cela, des cycles successifs de carence puis de retour à une alimentation riche ne perturbent jamais la

hiérarchie du développement des chambres au sein d'une ovariole (résultats non montrés). Ceci suggère donc que deux chambres d'œuf successives « connaissent » leur position mutuelle au sein de l'ovariole, et ajustent en fonction leur développement. L'hypothèse d'une communication entre les chambres d'œuf est donc plausible.

Au cours de cette étude, j'ai montré que les chambres d'œuf au stade 6/7 sont bloquées dans le stade PMES. En parallèle, la carence est connue pour ralentir la croissance des follicules ovariens plus précoces, sans pour autant la bloquer totalement. On peut donc imaginer que, lors d'une carence prolongée, plusieurs chambres d'œuf de stade PMES s'accumulent ; un phénotype que je n'ai cependant jamais observé. Ceci suggère que les stades PMES inhibent le développement des follicules plus précoces. Le mécanisme sous-jacent de cette régulation pourrait être une communication entre les chambres d'œuf, et le modèle de la transition M/E en carence serait donc un moyen de cribler de tels signaux.

Ovogenèse et longévité

Dès 1958, le généticien John Maynard Smith rapportait que des mutations entrainant la stérilité des mouches *Drosophila subobscura* rallongeait également leur espérance de vie en comparaison des mouches sauvages (Smith, 1958). Le fait que l'ovogenèse réduise l'espérance de vie des organismes est aujourd'hui un fait bien connu. On parle de « coût de la reproduction », et l'espérance de vie résulte d'un compromis entre l'énergie dépensée pour la reproduction, notamment l'ovogenèse, et le maintien des autres cellules somatiques (Flatt, 2011). Les mécanismes régulant ce compromis sont variables selon les espèces, mais restent mal compris de manière générale (Barnes et al., 2006).

Un autre mécanisme bien connu pour affecter l'espérance de vie est la restriction alimentaire (Partridge et al., 2005b). Chez la drosophile, c'est notamment la réduction de l'activité IIS dans ces conditions qui induit la longévité. En effet, l'ablation des IPCs, les neurones qui sécrètent certains DILPs, mime les effets de la restriction alimentaire sur la longévité (Broughton et al., 2005). Il faut noter qu'en condition de restriction alimentaire, l'ovogenèse est perturbée. Chez les femelles, les rôles respectifs de la restriction alimentaire et de l'ovogenèse ralentie sur la longévité sont donc à déterminer.

Cette question a déjà été adressée chez la drosophile (Mair et al., 2004; Partridge et al., 2005a). Les études montrent que le blocage de l'ovogenèse n'empêche pas les mouches de vivre plus longtemps sous restriction alimentaire, suggérant que la restriction alimentaire et l'ovogenèse ont des rôles respectifs sur la longévité. Cependant, la longévité de mouches stériles et contrôles dans des conditions de restriction alimentaire n'a pas été comparée. Si l'ovogenèse est antagoniste de la longévité dans des conditions de nutrition normale, elle pourrait cependant bien moins l'affecter en condition de restriction alimentaire, puisqu'elle est ralentie.

La carence entraine la dégénérescence des chambres d'œuf vitellogéniques. Il est envisageable que ces grosses quantités d'énergie ainsi relarguées soient en partie réutilisées pour le maintien d'organes autres que les ovaires. Dans ces conditions, une ovogenèse active précédant une période de carence serait alors un facteur de survie durant cette

carence, assurant une réserve d'énergie. Dans le scénario inverse, si l'énergie des chambres en dégénérescence n'est pas réutilisée par d'autres organes, la formation de chambres vitellogéniques précédant une période de carence reste une simple perte d'énergie. Ce point fait alors ressortir le rôle particulier des cellules folliculaires lors de l'établissement de la PMES. Limitant la formation de chambres vitellogéniques qui pourraient être perdues en période de carence, la PMES ferait donc partie intégrante de ces mécanismes régulant le compromis entre survie et reproduction.

Conclusion

L'ovogenèse est un processus qui nécessite une énergie considérable, et qui doit s'adapter en permanence à des paramètres nutritionnels fluctuants. Bien qu'une large variété de mécanismes différents soit mise en œuvre selon les espèces, les grands principes sont conservés, incluant le développement concomitant de structures d'origines somatiques et germinales et une phase de croissance massive.

La gestion de l'énergie est donc cruciale, de manière à maintenir un équilibre entre la survie des organismes et l'intégrité de l'ovogenèse. Chez les métazoaires, la voie de signalisation IIS est remarquablement conservée pour adapter le métabolisme et la croissance des organes en fonction des apports en nutriments. IIS agit de manière systémique, mais ses signaux peuvent être ajustés localement par les tissus périphériques, comme c'est le cas au sein des ovaires. Par ailleurs, la réponse selon les tissus ovariens est variable, mais joue toujours en faveur du maintien de l'ovogenèse.

IIS est une signalisation centrale, qui fait le lien entre les paramètres extrinsèques de nutrition d'une part, et les paramètres intrinsèques de développement d'autre part. L'intégration des paramètres de nutrition dans le programme génétique contrôlant l'ovogénèse implique nombre de communications entre les diverses voies de signalisation, qui doivent ajuster mutuellement leur activité.

Il est donc essentiel de comprendre l'ensemble de ces mécanismes de manière à progresser dans les domaines liés directement à l'ovogenèse. C'est le cas par exemple des cultures d'ovocytes ou de la fécondation *in vitro*, qui ont des applications directes en termes d'écologie, d'agronomie ou de santé publique.

L'ensemble de ce travail aura ainsi permis de comprendre plus en détails les mécanismes régulés par IIS au cours de l'ovogenèse. Il met notamment en valeur le rôle des tissus somatiques, et propose différents niveaux d'intercommunication entre les voies de signalisation ; ces processus participant tous au maintien de l'intégrité des follicules ovariens. Enfin, l'utilisation d'un modèle simple comme la drosophile aura permis de poser les bases pour l'étude de nouveaux aspects de l'ovogenèse, qui pourraient être transposés chez les organismes supérieurs.

Bibliographie

Alic, N., Andrews, T.D., Giannakou, M.E., Papatheodorou, I., Slack, C., Hoddinott, M.P., Cocheme, H.M., Schuster, E.F., Thornton, J.M., and Partridge, L. (2011). Genome-wide dFOXO targets and topology of the transcriptomic response to stress and insulin signalling. Molecular systems biology *7*, 502.

Andersen, D.S., Colombani, J., and Leopold, P. (2013). Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. Trends in cell biology *23*, 336-344.

Arquier, N., Geminard, C., Bourouis, M., Jarretou, G., Honegger, B., Paix, A., and Leopold, P. (2008). Drosophila ALS regulates growth and metabolism through functional interaction with insulin-like peptides. Cell metabolism *7*, 333-338.

Asaoka, M., and Lin, H. (2004). Germline stem cells in the Drosophila ovary descend from pole cells in the anterior region of the embryonic gonad. Development *131*, 5079-5089.

Bai, J., Uehara, Y., and Montell, D.J. (2000). Regulation of invasive cell behavior by taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. Cell *103*, 1047-1058.

Baker, J., Hardy, M.P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A.R., and Efstratiadis, A. (1996). Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. Mol Endocrinol *10*, 903-918.

Barnes, A.I., Boone, J.M., Jacobson, J., Partridge, L., and Chapman, T. (2006). No extension of lifespan by ablation of germ line in Drosophila. Proceedings Biological sciences / The Royal Society *273*, 939-947.

Baxter, R.C. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *278*, E967-976.

Beccari, S., Teixeira, L., and Rorth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during Drosophila oogenesis. Mechanisms of development *111*, 115-123.

Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. Endocrine reviews *30*, 586-623.

Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors. Science *289*, 113-116.

Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. Nature *403*, 676-680.

Bishop, D.L., and King, R.C. (1984). An ultrastructural study of ovarian development in the otu7 mutant of Drosophila melanogaster. Journal of cell science *67*, 87-119.

Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4. Cell *97*, 865-875.

Borghese, L., Fletcher, G., Mathieu, J., Atzberger, A., Eades, W.C., Cagan, R.L., and Rorth, P. (2006). Systematic analysis of the transcriptional switch inducing migration of border cells. Developmental cell *10*, 497-508.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., and Yancopoulos, G.D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. Cell *65*, 663-675.

Bownes, M. (1989). The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of Drosophila vitellogenesis. Journal of insect physiology *35*, 409-413.

Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M., and Edgar, B.A. (2002). Drosophila's insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. Developmental cell *2*, 239-249.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. Current biology : CB *11*, 213-221.

Broughton, S.J., Piper, M.D., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Driege, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leevers, S.J*., et al.* (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in Drosophila from ablation of cells making insulin-like ligands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 3105-3110.

Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. Nature *406*, 411-415.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell *96*, 857-868.

Buceta, J., Herranz, H., Canela-Xandri, O., Reigada, R., Sagues, F., and Milan, M. (2007). Robustness and stability of the gene regulatory network involved in DV boundary formation in the Drosophila wing. PloS one *2*, e602.

Butler, A.A., and Le Roith, D. (2001). Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. Annual review of physiology *63*, 141-164.

Calvi, B.R., Lilly, M.A., and Spradling, A.C. (1998). Cell cycle control of chorion gene amplification. Genes & development *12*, 734-744.

Campbell, L., Trendell, J., and Spears, N. (2013). Identification of cells migrating from the thecal layer of ovarian follicles. Cell and tissue research *353*, 189-194.

Cavaliere, V., Donati, A., Hsouna, A., Hsu, T., and Gargiulo, G. (2005). dAkt kinase controls follicle cell size during Drosophila oogenesis. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *232*, 845-854.

Chell, J.M., and Brand, A.H. (2010). Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. Cell *143*, 1161-1173.

Colombani, J., Andersen, D.S., and Leopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. Science *336*, 582-585.

Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carre, C., Noselli, S., and Leopold, P. (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in Drosophila. Science *310*, 667-670.

Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Leopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls Drosophila growth. Cell *114*, 739-749.

Costrici, N., Lunenfeld, B., Pariente, C., Dor, J., Rabinovici, J., Kanety, H., and Karasik, A. (1994). Induction of aromatase in human granulosa cells by both follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I involves tyrosine phosphorylation. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology *8*, 183-189.

Cummings, M.R., and King, R.C. (1970). Ultrastructural changes in nurse and follicle cells during late stages of oogenesis in Drosophila melanogaster. Z Zellforsch Mikrosk Anat *110*, 1-8.

de Celis, J.F., and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing. Development *124*, 3241-3251.

de Cuevas, M., and Spradling, A.C. (1998). Morphogenesis of the Drosophila fusome and its implications for oocyte specification. Development *125*, 2781-2789.

De Graeve, F.M., Van de Bor, V., Ghiglione, C., Cerezo, D., Jouandin, P., Ueda, R., Shashidhara, L.S., and Noselli, S. (2012). Drosophila apc regulates delamination of invasive epithelial clusters. Developmental biology *368*, 76-85.

de la Cova, C., and Johnston, L.A. (2006). Myc in model organisms: a view from the flyroom. Seminars in cancer biology *16*, 303-312.

del Alamo, D., Rouault, H., and Schweisguth, F. (2011). Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. Current biology : CB *21*, R40-47.

Demeestere, I., Gervy, C., Centner, J., Devreker, F., Englert, Y., and Delbaere, A. (2004). Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro

oocyte maturation, and embryo development in mice. Biology of reproduction *70*, 1664-1669.

Deng, W.M., Althauser, C., and Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in Drosophila follicle cells. Development *128*, 4737-4746.

Drummond-Barbosa, D., and Spradling, A.C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis. Developmental biology *231*, 265-278.

Drummond-Barbosa, D., and Spradling, A.C. (2004). Alpha-endosulfine, a potential regulator of insulin secretion, is required for adult tissue growth control in Drosophila. Developmental biology *266*, 310-321.

Dubeau, L. (1999). The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? Gynecologic oncology *72*, 437-442.

Duchek, P., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis. Science (New York, NY) *291*, 131-133.

Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. Cell *107*, 17-26.

Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. Nature reviews Genetics *7*, 907-916.

Edgar, B.A., and O'Farrell, P.H. (1990). The three postblastoderm cell cycles of Drosophila embryogenesis are regulated in G2 by string. Cell *62*, 469-480.

Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. Cell *105*, 297-306.

Eppig, J.J., Wigglesworth, K., and Pendola, F.L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 2890-2894.

Espelund, U., Bruun, J.M., Richelsen, B., Flyvbjerg, A., and Frystyk, J. (2005). Pro- and mature IGF-II during diet-induced weight loss in obese subjects. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies *153*, 861-869.

Essers, M.A., Weijzen, S., de Vries-Smits, A.M., Saarloos, I., de Ruiter, N.D., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. The EMBO journal *23*, 4802-4812.

Fauser, B.C., and Van Heusden, A.M. (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. Endocrine reviews *18*, 71-106.

Feeley, K.M., and Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. Histopathology *38*, 87-95.

Fernandez-Almonacid, R., and Rosen, O.M. (1987). Structure and ligand specificity of the Drosophila melanogaster insulin receptor. Molecular and cellular biology *7*, 2718-2727.

Firtel, R.A., and Chung, C.Y. (2000). The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology *22*, 603-615.

Flatt, T. (2011). Survival costs of reproduction in Drosophila. Experimental gerontology *46*, 369-375.

Fulga, T.A., and Rorth, P. (2002). Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions. Nature cell biology *4*, 715-719.

Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., and Firtel, R.A. (2002). Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. Cell *109*, 611-623.

Furriols, M., and Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. Current biology : CB *11*, 60-64.

Gancz, D., and Gilboa, L. (2013). Insulin and Target of rapamycin signaling orchestrate the development of ovarian niche-stem cell units in Drosophila. Development *140*, 4145-4154.

Geminard, C., Rulifson, E.J., and Leopold, P. (2009). Remote control of insulin secretion by fat cells in Drosophila. Cell metabolism *10*, 199-207.

Gershman, B., Puig, O., Hang, L., Peitzsch, R.M., Tatar, M., and Garofalo, R.S. (2007). High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in Drosophila: a key role for dFOXO. Physiological genomics *29*, 24-34.

Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballes, F., Medioni, C., Cerezo, D., and Noselli, S. (2002). The Drosophila cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. Development *129*, 5437-5447.

Gilbert, L.I., Serafin, R.B., Watkins, N.L., and Richard, D.S. (1998). Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by Drosophila melanogaster oocytes. Journal of insect physiology *44*, 637-644.

Giudice, L.C. (2001). Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. Journal of the Society for Gynecologic Investigation *8*, S26-29.

Goberdhan, D.C., Paricio, N., Goodman, E.C., Mlodzik, M., and Wilson, C. (1999). Drosophila tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. Genes & development *13*, 3244-3258.

Gonzalez-Reyes, A., Elliott, H., and St Johnston, D. (1995). Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling. Nature *375*, 654-658.

Goode, S., and Perrimon, N. (1997). Inhibition of patterned cell shape change and cell invasion by Discs large during Drosophila oogenesis. Genes & development *11*, 2532-2544.

Gore, M.A., Nayudu, P.L., and Vlaisavljevic, V. (1997). Attaining dominance in vivo: distinguishing dominant from challenger follicles in humans. Hum Reprod *12*, 2741-2747.

Grammont, M., and Irvine, K.D. (2001). fringe and Notch specify polar cell fate during Drosophila oogenesis. Development *128*, 2243-2253.

Grammont, M., and Irvine, K.D. (2002). Organizer activity of the polar cells during Drosophila oogenesis. Development *129*, 5131-5140.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2008). FOXO transcription factors in ageing and cancer. Acta Physiol (Oxf) *192*, 19-28.

Gronke, S., Clarke, D.F., Broughton, S., Andrews, T.D., and Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of Drosophila insulin-like peptides. PLoS genetics *6*, e1000857.

Guigon, C.J., and Magre, S. (2006). Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. Biology of reproduction *74*, 450-458.

Guvakova, M.A. (2007). Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. The international journal of biochemistry & cell biology *39*, 890-909.

Hernandez-Medrano, J.H., Campbell, B.K., and Webb, R. (2012). Nutritional influences on folliculogenesis. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene *47 Suppl 4*, 274-282.

Herranz, H., Perez, L., Martin, F.A., and Milan, M. (2008). A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the Drosophila wing. The EMBO journal *27*, 1633-1645.

Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. Annual review of genetics *43*, 389-410.

Honegger, B., Galic, M., Kohler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E., and Stocker, H. (2008). Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in Drosophila and is essential for starvation resistance. Journal of biology *7*, 10.

Hosaka, T., Biggs, W.H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A.D., Varki, N.M., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 2975-2980.

Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2009). Insulin levels control female germline stem cell maintenance via the niche in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 1117-1121.

Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2011). Insulin signals control the competence of the Drosophila female germline stem cell niche to respond to Notch ligands. Developmental biology *350*, 290-300.

Hsu, H.J., LaFever, L., and Drummond-Barbosa, D. (2008). Diet controls normal and tumorous germline stem cells via insulin-dependent and -independent mechanisms in Drosophila. Developmental biology *313*, 700-712.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., and Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila. Current biology : CB *12*, 1293-1300.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nature cell biology *4*, 648-657.

Jacobs, F.M., van der Heide, L.P., Wijchers, P.J., Burbach, J.P., Hoekman, M.F., and Smidt, M.P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. The Journal of biological chemistry *278*, 35959-35967.

Jang, A.C., Chang, Y.C., Bai, J., and Montell, D. (2009). Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt. Nature cell biology *11*, 569-579.

Jeppesen, J.V., Anderson, R.A., Kelsey, T.W., Christiansen, S.L., Kristensen, S.G., Jayaprakasan, K., Raine-Fenning, N., Campbell, B.K., and Yding Andersen, C. (2013). Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. Molecular human reproduction *19*, 519-527.

Jo, H.S., Kang, K.H., Joe, C.O., and Kim, J.W. (2012). Pten coordinates retinal neurogenesis by regulating Notch signalling. The EMBO journal *31*, 817-828.

John, G.B., Gallardo, T.D., Shirley, L.J., and Castrillon, D.H. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. Developmental biology *321*, 197-204.

Jordan, K.C., Schaeffer, V., Fischer, K.A., Gray, E.E., and Ruohola-Baker, H. (2006). Notch signaling through tramtrack bypasses the mitosis promoting activity of the JNK pathway in the mitotic-to-endocycle transition of Drosophila follicle cells. BMC developmental biology *6*, 16.

Junger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. Journal of biology *2*, 20.

Kiehart, D.P., and Franke, J.D. (2002). Actin dynamics: the arp2/3 complex branches out. Current biology : CB *12*, R557-559.

Kim, J.C., Nordman, J., Xie, F., Kashevsky, H., Eng, T., Li, S., MacAlpine, D.M., and Orr-Weaver, T.L. (2011). Integrative analysis of gene amplification in Drosophila follicle cells: parameters of origin activation and repression. Genes & development *25*, 1384-1398.

King, R.C. (1970). The meiotic behavior of the Drosophila oocyte. International review of cytology *28*, 125-168.

Kirilly, D., and Xie, T. (2007). The Drosophila ovary: an active stem cell community. Cell research *17*, 15-25.

Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Funahashi, Y., Shawber, C.J., Castrillon, D.H., Kollipara, R., DePinho, R.A., Kitajewski, J., and Accili, D. (2007). A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. The Journal of clinical investigation *117*, 2477-2485.

Krupp, J.J., Yaich, L.E., Wessells, R.J., and Bodmer, R. (2005). Identification of genetic loci that interact with cut during Drosophila wing-margin development. Genetics *170*, 1775-1795.

Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nature genetics *15*, 201-204.

LaFever, L., and Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in Drosophila. Science (New York, NY) *309*, 1071-1073.

LaFever, L., Feoktistov, A., Hsu, H.J., and Drummond-Barbosa, D. (2010). Specific roles of Target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the Drosophila ovary. Development *137*, 2117-2126.

Layalle, S., Arquier, N., and Leopold, P. (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in Drosophila. Developmental cell *15*, 568-577.

Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron *22*, 451-461.

Lee, T., and Montell, D.J. (1997). Multiple Ras signals pattern the Drosophila ovarian follicle cells. Developmental biology *185*, 25-33.

Li, Q., He, H., Zhang, Y.L., Li, X.M., Guo, X., Huo, R., Bi, Y., Li, J., Fan, H.Y., and Sha, J. (2013). Phosphoinositide 3-Kinase p110delta Mediates Estrogen- and FSH-Stimulated Ovarian Follicle Growth. Mol Endocrinol *27*, 1468-1482.

Lin, H., and Spradling, A.C. (1993). Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted Drosophila germaria. Developmental biology *159*, 140-152.

Liu, L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., Gunnarsson, D., Selstam, G., Boman, K., and Liu, K. (2007). Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. Development *134*, 199-209.

Lopez-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis. Genes & development *15*, 1393-1405.

Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D., and Jasper, H. (2007). Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. The EMBO journal *26*, 380-390.

Mair, W., Sgro, C.M., Johnson, A.P., Chapman, T., and Partridge, L. (2004). Lifespan extension by dietary restriction in female Drosophila melanogaster is not caused by a reduction in vitellogenesis or ovarian activity. Experimental gerontology *39*, 1011-1019.

Mandinova, A., Lefort, K., Tommasi di Vignano, A., Stonely, W., Ostano, P., Chiorino, G., Iwaki, H., Nakanishi, J., and Dotto, G.P. (2008). The FoxO3a gene is a key negative target of canonical Notch signalling in the keratinocyte UVB response. The EMBO journal *27*, 1243-1254.

Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. Molecular cell *10*, 151-162.

Matsuda, F., Inoue, N., Maeda, A., Cheng, Y., Sai, T., Gonda, H., Goto, Y., Sakamaki, K., and Manabe, N. (2011). Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. The Journal of reproduction and development *57*, 151-158.

Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., and Eppig, J.J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. Science *296*, 2178-2180.

McDonald, J.A., Pinheiro, E.M., Kadlec, L., Schupbach, T., and Montell, D.J. (2006). Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. Developmental biology *296*, 94-103.

McGee, E.A., and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrine reviews *21*, 200-214.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila. Science *302*, 1765-1768.

Micchelli, C.A., Rulifson, E.J., and Blair, S.S. (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of Drosophila: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. Development *124*, 1485-1495.

Miguel-Aliaga, I., Thor, S., and Gould, A.P. (2008). Postmitotic specification of Drosophila insulinergic neurons from pioneer neurons. PLoS biology *6*, e58.

Mirth, C., Truman, J.W., and Riddiford, L.M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in Drosophila melanogaster. Current biology : CB *15*, 1796-1807.

Mohr, O.L. (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. Genetics *4*, 275-282.

Montell, D.J. (2003). Border-cell migration: the race is on. Nature reviews Molecular cell biology *4*, 13-24.

Montell, D.J. (2006). The social lives of migrating cells in Drosophila. Current opinion in genetics & development *16*, 374-383.

Montell, D.J. (2008). Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. Science (New York, NY) *322*, 1502-1505.

Montell, D.J., Rorth, P., and Spradling, A.C. (1992). slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes Drosophila C/EBP. Cell *71*, 51-62.

Morgan, T.H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. Science *32*, 120-122.

Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. Endocrine reviews *22*, 818-835.

Naora, H., and Montell, D.J. (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. Nature reviews Cancer *5*, 355-366.

Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis. The Journal of cell biology *144*, 533-547.

Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., and Obsil, T. (2005). 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. Biochemistry *44*, 11608-11617.

Oldham, J.M., Martyn, J.A., Hua, K.M., MacDonald, N.A., Hodgkinson, S.C., and Bass, J.J. (1999). Nutritional regulation of IGF-II, but not IGF-I, is age dependent in sheep. The Journal of endocrinology *163*, 395-402.

Oldham, S., and Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. Trends in cell biology *13*, 79-85.

Orme, M.H., Alrubaie, S., Bradley, G.L., Walker, C.D., and Leevers, S.J. (2006). Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in Drosophila. Nature cell biology *8*, 1298-1302.

Pajvani, U.B., Shawber, C.J., Samuel, V.T., Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., Kitajewski, J., and Accili, D. (2011). Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. Nature medicine *17*, 961-967.

Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. Reproductive biomedicine online *15*, 326-337.

Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K.D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. Nature *387*, 908-912.

Partridge, L., and Bruning, J.C. (2008). Forkhead transcription factors and ageing. Oncogene *27*, 2351-2363.

Partridge, L., Gems, D., and Withers, D.J. (2005a). Sex and death: what is the connection? Cell *120*, 461-472.

Partridge, L., Pletcher, S.D., and Mair, W. (2005b). Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. Mechanisms of ageing and development *126*, 35-41.

Patino, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., and Kagawa, H. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology *129*, 427-439.

Patti, M.E., and Kahn, C.R. (1998). The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology *9*, 89-109.

Pepling, M.E., and Spradling, A.C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. Developmental biology *234*, 339-351.

Perdigoto, C.N., and Bardin, A.J. (2013). Sending the right signal: Notch and stem cells. Biochimica et biophysica acta *1830*, 2307-2322.

Perez, G.I., Trbovich, A.M., Gosden, R.G., and Tilly, J.L. (2000). Mitochondria and the death of oocytes. Nature *403*, 500-501.

Petruzzelli, L., Herrera, R., Arenas-Garcia, R., Fernandez, R., Birnbaum, M.J., and Rosen, O.M. (1986). Isolation of a Drosophila genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated Drosophila receptor with an anti-peptide antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *83*, 4710-4714.

Pinheiro, E.M., and Montell, D.J. (2004). Requirement for Par-6 and Bazooka in Drosophila border cell migration. Development *131*, 5243-5251.

Pitsouli, C., and Perrimon, N. (2010). Embryonic multipotent progenitors remodel the Drosophila airways during metamorphosis. Development *137*, 3615-3624.

Pitsouli, C., and Perrimon, N. (2013). The homeobox transcription factor cut coordinates patterning and growth during Drosophila airway remodeling. Science signaling *6*, ra12.

Poulton, J.S., Huang, Y.C., Smith, L., Sun, J., Leake, N., Schleede, J., Stevens, L.M., and Deng, W.M. (2011). The microRNA pathway regulates the temporal pattern of Notch signaling in Drosophila follicle cells. Development *138*, 1737-1745.

Prasad, M., and Montell, D.J. (2007). Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. Developmental cell *12*, 997-1005.

Pritchett, T.L., and McCall, K. (2012). Role of the insulin/Tor signaling network in starvation-induced programmed cell death in Drosophila oogenesis. Cell death and differentiation *19*, 1069-1079.

Pritchett, T.L., Tanner, E.A., and McCall, K. (2009). Cracking open cell death in the Drosophila ovary. Apoptosis : an international journal on programmed cell death *14*, 969-979.

Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., and Tjian, R. (2003). Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. Genes & development *17*, 2006-2020.

Puig, O., and Mattila, J. (2011). Understanding Forkhead box class O function: lessons from Drosophila melanogaster. Antioxidants & redox signaling *14*, 635-647.

Puig, O., and Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. Genes & development *19*, 2435-2446.

Rajan, A., and Perrimon, N. (2012). Drosophila cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. Cell *151*, 123-137.

Reber, A., Lehner, C.F., and Jacobs, H.W. (2006). Terminal mitoses require negative regulation of Fzr/Cdh1 by Cyclin A, preventing premature degradation of mitotic cyclins and String/Cdc25. Development *133*, 3201-3211.

Richard, D.S., Gilbert, M., Crum, B., Hollinshead, D.M., Schelble, S., and Scheswohl, D. (2001). Yolk protein endocytosis by oocytes in Drosophila melanogaster: immunofluorescent localization of clathrin, adaptin and the yolk protein receptor. Journal of insect physiology *47*, 715-723.

Richard, D.S., Rybczynski, R., Wilson, T.G., Wang, Y., Wayne, M.L., Zhou, Y., Partridge, L., and Harshman, L.G. (2005). Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in Drosophila melanogaster independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the chico1 insulin signaling mutation is autonomous to the ovary. Journal of insect physiology *51*, 455-464.

Riddiford, L.M. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. Receptor *3*, 203-209.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science (New York, NY) *302*, 1704-1709.

Rintelen, F., Stocker, H., Thomas, G., and Hafen, E. (2001). PDK1 regulates growth through Akt and S6K in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 15020-15025.

Rorth, P. (2002). Initiating and guiding migration: lessons from border cells. Trends in cell biology *12*, 325-331.

Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G.M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W.*, et al.* (1998). Systematic gain-of-function genetics in Drosophila. Development *125*, 1049-1057.

Royzman, I., and Orr-Weaver, T.L. (1998). S phase and differential DNA replication during Drosophila oogenesis. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms *3*, 767-776.

Salih, D.A., and Brunet, A. (2008). FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. Current opinion in cell biology *20*, 126-136.

Sanchez, F., and Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. Biochimica et biophysica acta *1822*, 1896-1912.

Sarraj, M.A., and Drummond, A.E. (2012). Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. Reproduction (Cambridge, England) *143*, 151-163.

Sasaki, A.T., and Firtel, R.A. (2006). Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR. European journal of cell biology *85*, 873-895.

Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T., Campbell, B.K., Driancourt, M.A., Dupont, J., Fortune, J.E., Gilchrist, R.B., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S.*, et al.* (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. Reproduction, fertility, and development *23*, 444-467.

Schaeffer, V., Althauser, C., Shcherbata, H.R., Deng, W.M., and Ruohola-Baker, H. (2004). Notch-dependent Fizzy-related/Hec1/Cdh1 expression is required for the mitotic-to-endocycle transition in Drosophila follicle cells. Current biology : CB *14*, 630-636.

Schiesari, L., Kyriacou, C.P., and Costa, R. (2011). The hormonal and circadian basis for insect photoperiodic timing. FEBS letters *585*, 1450-1460.

Schlegel, A., and Stainier, D.Y. (2007). Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. PLoS genetics *3*, e199.

Schwartz, M.B., Kelly, T.J., Imberski, R.B., and Rubenstein, E.C. (1985). The effects of nutrition and methoprene treatment on ovarian ecdysteroid synthesis in Drosophila melanogaster. Journal of insect physiology *31*, 947-957.

Sekar, N., and Veldhuis, J.D. (2004). Involvement of Sp1 and SREBP-1a in transcriptional activation of the LDL receptor gene by insulin and LH in cultured porcine granulosa-luteal cells. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *287*, E128-135.

Shcherbata, H.R., Althauser, C., Findley, S.D., and Ruohola-Baker, H. (2004). The mitotic-to-endocycle switch in Drosophila follicle cells is executed by Notch-dependent regulation of G1/S, G2/M and M/G1 cell-cycle transitions. Development *131*, 3169-3181.

Siegmund, T., and Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of Drosophila melanogaster. The Journal of comparative neurology *431*, 481-491.

Sigrist, S.J., and Lehner, C.F. (1997). Drosophila fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. Cell *90*, 671-681.

Silver, D.L., Geisbrecht, E.R., and Montell, D.J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in Drosophila. Development *132*, 3483-3492.

Silver, D.L., and Montell, D.J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. Cell *107*, 831-841.

Sirotkin, A.V. (2010). Growth factors controlling ovarian functions. Journal of cellular physiology.

Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., and Partridge, L. (2011). dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in Drosophila. Aging cell *10*, 735-748.

Slaidina, M., Delanoue, R., Gronke, S., Partridge, L., and Leopold, P. (2009). A Drosophila insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states. Developmental cell *17*, 874-884.

Smith, J.M. (1958). Prolongation of the life of Drosophila subobscura by a brief exposure of adults to a high temperature. Nature *181*, 496-497.

Son, W.Y., Das, M., Shalom-Paz, E., and Holzer, H. (2011). Mechanisms of follicle selection and development. Minerva ginecologica *63*, 89-102.

Song, J., Wu, L., Chen, Z., Kohanski, R.A., and Pick, L. (2003). Axons guided by insulin receptor in Drosophila visual system. Science *300*, 502-505.

Spears, N., de Bruin, J.P., and Gosden, R.G. (1996). The establishment of follicular dominance in co-cultured mouse ovarian follicles. Journal of reproduction and fertility *106*, 1-6.

Spradling, A.C. (1993). Germline cysts: communes that work. Cell *72*, 649-651.

Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J., and Elowitz, M.B. (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. Nature *465*, 86-90.

Starz-Gaiano, M., Melani, M., Wang, X., Meinhardt, H., and Montell, D.J. (2008). Feedback inhibition of Jak/STAT signaling by apontic is required to limit an invasive cell population. Developmental cell *14*, 726-738.

Struhl, G., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1993). Intrinsic activity of the lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. Cell *74*, 331-345.

Su, T.T., and O'Farrell, P.H. (1998). Size control: cell proliferation does not equal growth. Current biology : CB *8*, R687-689.

Sun, J., and Deng, W.M. (2005). Notch-dependent downregulation of the homeodomain gene cut is required for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in Drosophila follicle cells. Development *132*, 4299-4308.

Sun, J., and Deng, W.M. (2007). Hindsight mediates the role of notch in suppressing hedgehog signaling and cell proliferation. Developmental cell *12*, 431-442.

Sun, J., Smith, L., Armento, A., and Deng, W.M. (2008). Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling. The Journal of cell biology *182*, 885-896.

Szafranski, P., and Goode, S. (2007). Basolateral junctions are sufficient to suppress epithelial invasion during Drosophila oogenesis. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *236*, 364-373.

Tamori, Y., and Deng, W.M. (2013). Tissue repair through cell competition and compensatory cellular hypertrophy in postmitotic epithelia. Developmental cell *25*, 350-363.

Tanentzapf, G., and Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. Nature cell biology *5*, 46-52.

Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., and Garofalo, R.S. (2001). A mutant Drosophila insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. Science *292*, 107-110.

Teleman, A.A., Hietakangas, V., Sayadian, A.C., and Cohen, S.M. (2008). Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in Drosophila. Cell metabolism *7*, 21-32.

Thomas, H.E., Stunnenberg, H.G., and Stewart, A.F. (1993). Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. Nature *362*, 471-475.

Tilly, J.L., and Kolesnick, R.N. (1999). Sphingolipid signaling in gonadal development and function. Chemistry and physics of lipids *102*, 149-155.

Tsai, C.C., and Yen, S.S. (1971). The effect of ethinyl estradiol administration during early follicular phase of the cycle on the gonadotropin levels and ovarian function. The Journal of clinical endocrinology and metabolism *33*, 917-923.

Tu, M.P., Yin, C.M., and Tatar, M. (2002). Impaired ovarian ecdysone synthesis of Drosophila melanogaster insulin receptor mutants. Aging cell *1*, 158-160.

Tzivion, G., Dobson, M., and Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. Biochimica et biophysica acta *1813*, 1938-1945.

Uhlenhaut, N.H., and Treier, M. (2011). Forkhead transcription factors in ovarian function. Reproduction (Cambridge, England) *142*, 489-495.

Vachias, C., Couderc, J.L., and Grammont, M. (2010). A two-step Notch-dependant mechanism controls the selection of the polar cell pair in Drosophila oogenesis. Development *137*, 2703-2711.

Van de Bor, V., Zimniak, G., Cerezo, D., Schaub, S., and Noselli, S. (2011). Asymmetric localisation of cytokine mRNA is essential for JAK/STAT activation during cell invasiveness. Development *138*, 1383-1393.

Vassin, H., Vielmetter, J., and Campos-Ortega, J.A. (1985). Genetic interactions in early neurogenesis of Drosophila melanogaster. Journal of neurogenetics *2*, 291-308.

Verheyen, E.M., and Cooley, L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. Development *120*, 717-728.

Wang, X., Bo, J., Bridges, T., Dugan, K.D., Pan, T.C., Chodosh, L.A., and Montell, D.J. (2006). Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the Drosophila ovary. Developmental cell *10*, 483-495.

Wang, X., He, L., Wu, Y.I., Hahn, K.M., and Montell, D.J. (2010). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. Nature cell biology *12*, 591-597.

Wang, X., and Proud, C.G. (2009). Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. Trends in cell biology *19*, 260-267.

Wang, Y., and Riechmann, V. (2007). The role of the actomyosin cytoskeleton in coordination of tissue growth during Drosophila oogenesis. Current biology : CB *17*, 1349-1355.

Webb, R., and Campbell, B.K. (2007). Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. Society of Reproduction and Fertility supplement *64*, 141-163.

Webb, R., Garnsworthy, P.C., Campbell, B.K., and Hunter, M.G. (2007). Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. Theriogenology *68 Suppl 1*, S22-29.

Werz, C., Kohler, K., Hafen, E., and Stocker, H. (2009). The Drosophila SH2B family adaptor Lnk acts in parallel to chico in the insulin signaling pathway. PLoS genetics *5*, e1000596.

Willecke, M., Toggweiler, J., and Basler, K. (2011). Loss of PI3K blocks cell-cycle progression in a Drosophila tumor model. Oncogene *30*, 4067-4074.

Xu, J., and Gridley, T. (2012). Notch Signaling during Oogenesis in Drosophila melanogaster. Genetics research international *2012*, 648207.

Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. Development *117*, 1223-1237.

Yang, C.H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2008). Drosophila egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. Science *319*, 1679-1683.

Yang, S.A., Wang, W.D., Chen, C.T., Tseng, C.Y., Chen, Y.N., and Hsu, H.J. (2013). FOXO/Fringe is necessary for maintenance of the germline stem cell niche in response to insulin insufficiency. Developmental biology.

Yenush, L., Fernandez, R., Myers, M.G., Jr., Grammer, T.C., Sun, X.J., Blenis, J., Pierce, J.H., Schlessinger, J., and White, M.F. (1996). The Drosophila insulin receptor activates multiple signaling pathways but requires insulin receptor substrate proteins for DNA synthesis. Molecular and cellular biology *16*, 2509-2517.

Yoon, W.H., Meinhardt, H., and Montell, D.J. (2011). miRNA-mediated feedback inhibition of JAK/STAT morphogen signalling establishes a cell fate threshold. Nature cell biology *13*, 1062-1069.

Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. Development *121*, 2265-2278.

Zeng, X., Chauhan, C., and Hou, S.X. (2010). Characterization of midgut stem cell- and enteroblast-specific Gal4 lines in drosophila. Genesis *48*, 607-611.

Zhai, Z., Ha, N., Papagiannouli, F., Hamacher-Brady, A., Brady, N., Sorge, S., Bezdan, D., and Lohmann, I. (2012). Antagonistic regulation of apoptosis and differentiation by the Cut transcription factor represents a tumor-suppressing mechanism in Drosophila. PLoS genetics *8*, e1002582.

Zhang, Y., and Kalderon, D. (2000). Regulation of cell proliferation and patterning in Drosophila oogenesis by Hedgehog signaling. Development *127*, 2165-2176.

Zhou, J., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., and Bondy, C. (1997). Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. Mol Endocrinol *11*, 1924-1933.

Annexes

Annexe 1

Drosophila apc regulates delamination of invasive epithelial clusters

Developmental Biology 368 (2012) 76–85

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Developmental Biology

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

Drosophila apc regulates delamination of invasive epithelial clusters

F.M. De Graeve [a], V. Van de Bor [a], C. Ghiglione [a], D. Cerezo [a], P. Jouandin [a], R. Ueda [c], L.S. Shashidhara [b], S. Noselli [a,*]

[a] Institut de Biologie Valrose, Université de Nice Sophia Antipolis, UMR CNRS 7277, UMR Inserm 1091, 28 Avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 02, France
[b] Indian Institute of Science Education and Research (IISER) Pune, 411021, India
[c] Genetic Strains Research Center, National Institute of Genetics, Mishima-shi, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 March 2011
Received in revised form
9 May 2012
Accepted 14 May 2012
Available online 22 May 2012

Keywords:
Border cell delamination
Apc
β-catenin/Armadillo
DE-cadherin

ABSTRACT

Border Cells in the *Drosophila* ovaries are a useful genetic model for understanding the molecular events underlying epithelial cell motility. During stage 9 of egg chamber development they detach from neighboring stretched cells and migrate between the nurse cells to reach the oocyte. *RNAi* screening allowed us to identify the *dapc1* gene as being critical in this process. Clonal and live analysis showed a requirement of *dapc1* in both outer border cells and contacting stretched cells for delamination. This mutant phenotype was rescued by *dapc1* or *dapc2* expression. Loss of *dapc1* function was associated with an abnormal lasting accumulation of β-catenin/Armadillo and E-cadherin at the boundary between migrating border and stretched cells. Moreover, *β-catenin/armadillo* or *E-cadherin* downregulation rescued the *dapc1* loss of function phenotype. Altogether these results indicate that *Drosophila* Apc1 is required for dynamic remodeling of β-catenin/Armadillo and E-cadherin adhesive complexes between outer border cells and stretched cells regulating proper delamination and invasion of migrating epithelial clusters.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cell motility is essential during embryonic development as well as throughout adult life for proper organogenesis, wound-healing and immune system function (Bouma et al., 2009). However, cell motility can be detrimental when it contributes to cancer cell spreading. Understanding the molecular basis of cell migration remains a challenging question because of the difficulty to reproduce *in vitro* interactions between migrating cells and their environment.

Border Cell (BC) migration is a powerful *in vivo* model of cell invasion taking place in the Drosophila ovary (reviewed in Rorth, 2002; Ribeiro et al., 2003; Starz-Gaiano and Montell, 2004; Montell, 2006). *Drosophila* ovaries are made of developing egg chambers composed by 16 germline cells (15 nurse cells and 1 oocyte located posteriorly), surrounded by a monolayer of somatic, epithelial follicle cells (Spradling, 1993). About fifty anterior follicle cells called Stretched Cells (SCs) spread into a thin, flat layer covering the nurse cells (NC). At the very anterior tip, the Border Cells round up and form a cohesive cluster composed by two central non motile cells, known as Polar Cells (PCs), and six to eight surrounding outer Border Cells (oBCs) (Montell et al., 1992; Han et al., 2000; Van de Bor et al., 2011). The BC cluster detaches from the neighboring SC and migrate through the NC towards the oocyte, contributing to the formation of the micropyle.

Throughout their migration, oBC and PC form a cohesive cluster whose migration depends on interactions with the NC, involving adhesion remodeling. One major actor of cell–cell and cell–substrate interactions involved in this process is the E-cadherin/$\beta-$catenin adhesion complex (Halbleib and Nelson, 2006). Hence, loss of Drosophila E-cadherin (DE-cadherin) or $\beta-$catenin/Armadillo (Arm) function in either BC or NC affects BC migration (Peifer, 1993; Oda et al., 1997; Niewiadomska et al., 1999; Pacquelet et al., 2003; Pacquelet and Rorth, 2005). However, it remains unclear as to how this complex is regulated during detachment of oBC from the epithelium, preceding cell invasion.

In order to identify new factors regulating BC migration and/or delamination, we performed an *in vivo* directed *RNAi* screen (unpublished results). Among different candidates, we isolated *dapc1* as a new gene regulating BC delamination. Both mammals and *Drosophila* carry 2 *apc* genes: *apc1* and *apc2* (*dapc1* and *dapc2* in *Drosophila*) which can be partially redundant in different tissues (Polakis, 1997; Ahmed et al., 1998; van Es et al., 2001; Ahmed et al., 2002; Akong et al., 2002a; Akong et al., 2002b; Bienz, 2002). Interestingly, APC molecules are known to provide a scaffold for a destruction complex targeting β-catenin/Arm thereby regulating

* Corresponding author. Fax: +33 4 92 07 64 04.
E-mail address: Stephane.Noselli@unice.fr (S. Noselli).

0012-1606/$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.017

cell adhesion (Munemitsu et al., 1995; Rubinfeld et al., 1996; Hayashi et al., 1997; Harris and Nelson, 2010).

Here we show that a loss of function for *dapc1* or both *dapc1* and *dapc2* (*dapc*) in oBC and adjacent follicle cells impaired BC delamination. This mutant phenotype can be rescued upon overexpression of either *dapc1* or *dapc2*. Interestingly, impaired delamination was associated to persistent β-catenin/Arm and DE-cadherin accumulation at the boundary between mutant oBC and neighboring follicle cells. Consistently, down regulation of endogenous *β-catenin/arm* or *DE-cadherin* rescued the *dapc1* mutant phenotype. These results indicate that *Drosophila* Apc1 controls the stability of cortical β-catenin/Arm and DE-cadherin, allowing oBC to detach from the follicular epithelium and migrate.

Materials and methods

Drosophila stocks and genetics

A description of the genetic markers and chromosomes can be found at Flybase. W^{1118} served as the control strain. Flies were cultured under standard conditions at 25 °C, unless otherwise specified. The $dapc1^{Q8}$ fly line was given by Eric Wieschaus (Princeton University) (Ahmed et al., 1998) and recombined to generate the *FRT-82B*, $dapc1^{Q8}$/*TM3*, *Sb* fly line. The *FRT-82B*, $dapc2^{33}$/*TM6*, the *FRT-82B*, $dapc2^{33}$, $dapc1^{Q8}$/*TM6* and *UAS-dapc1* were given by Yashi Ahmed (Dartmouth Medical School) (Takacs et al., 2008). *P*[*endoP-EGFP-APC2-FL*] *and P*[*endoP-EGFP-APC2-Δ–C30*] were given by Brooke McCartney (Carnegie Mellon University) (Zhou et al., 2011).

The *Upd-Gal4*, the *Slbo-Gal4*, *UAS-GFP/Cyo*, the c^{306}-*Gal4* and the cb^{41}-*Gal4* lines were given by Denise Montell (Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore) (McDonald et al., 2006; Pinheiro and Montell, 2004). The cb^{41}-*Gal4* flies were crossed to *UAS-EGFP* flies in order to generate the *UAS-EGFP*; cb^{41}-*Gal4* fly line.

Upd-Gal4; *Slbo-Gal4*, *UAS-GFP/Cyo* are from Ghiglione et al. (2008);

The MARCM markers *yw tubGal4 hsFLP 122 UAS-nucGFP-myc;FRT82B CD21* y^+ *tubG80.LL3/TM6* are from Ribeiro et al. (2010).

UAS-dicer-2 (Id 60009), UAS-DE-cadherin.RNAi (Id 8024), UAS-arm.RNAi (Id 7767) and UAS-$\alpha-$catenin.RNAi (Id 20123) were obtained from the Vienna Drosophila Ressource Center (VDRC).

FRT-82B (Xu and Rubin, 1993); *y*[*1*] *arm*[*1*]/*FM7c* (Peifer et al., 1991);

P{*w*[+*mC*]=*UAS-arm.S10*}*C*, *y*[*1*] *w*[*1118*] (Pai et al., 1997); *y*[*1*] *w*[*1118*]; *P*{*w*[+*mC*]=*UAS-arm.S2*}*A1* (Pai et al., 1997); *w*[∗]; *P*{*w*[+*mC*]=*UAS-Apc2.GFP*}*3/TM3*, *Sb*[*1*] (Akong et al., 2002a; Akong et al., 2002b); *P*{*Gal4-Hsp70.PB*}*2* (Brand et al., 1994) were obtained from Bloomington.

RNAi screen

The *UAS-RNAi* fly collection was obtained from the National Institute of Genetics Fly Stock Center (http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp). *Upd-Gal4*; *Slbo-Gal4*, *UAS-GFP* virgin females were crossed to *UAS-RNAi* males. The *Upd-Gal4*; *Slbo-Gal4*, *UAS-GFP*/*UAS-RNAi* females of the F1 generation were put together with some sibling males for two days at 30 °C before dissection and analysis of the stage 10 egg chambers. We considered the open reading frame towards which the *RNAi* construct was directed as potentially being important when abnormal BC migration could be seen in more than 25% of the egg chambers.

The *UAS-RNAi* constructs targeting *dapc1* and *dapc2* from the National Institute of Genetics Fly Stock Center might target 16 other open reading frames in addition to the *dapc* genes. We confirmed the screening results (Fig. 1) using the following *UAS-RNAi* fly lines from VDRC: Id 51468 (targets *dapc1*, no off-target) and Id 11854 (targets *dapc2*, no off-target).

MARCM clonal analysis

Homozygous $dapc2^{33}$, $dapc1^{Q8}$ or $dapc2^{33}$ or $dapc1^{Q8}$ mosaic clones were generated using the FLP/FRT system (Xu and Rubin, 1993). Mosaic clones were positively marked using the MARCM system (Lee and Luo, 2001). Flipase expression was driven by the *heat-shock* promoter. *yw tubGal4 hsFLP 122 UAS-nucGFP-myc;FRT82B CD21* y^+ *tubG80.LL3/TM6* flies were mated to *FRT-82B*, $dapc1^{Q8}$/*TM3* flies at 25 °C. The females of the genotype: *yw tubGal4 hsFLP 122 UAS-nucGFPmyc;FRT82B CD21* y^+ *tubG80.LL3/FRT82B*, $apc1^{Q8}$ were kept with some sibling males at 30 °C for four days with a daily one hour heat shock induction at 37 °C, before dissection. Same protocol was used for generating MARCM $dapc2^{33}$ and $dapc2^{33}$, $dapc1^{Q8}$ clones.

Statistical analysis were made using Kolmogorov–Smirnov test.

Immunostaining

Ovary dissection, fixation and antibody staining were performed as described by Ghiglione et al. (2002). For immunostaining, the following primary antibodies were used: Rabbit anti-Slbo antibodies were generated against the peptide ranging from aminoacids 105 to 237 fused to the GST epitope. Antibodies were immunopurified against the His tagged Slbo protein using Affi-Gel (Bio-Rad Laboratories). Other antibodies used in this study: Mouse anti-Armadillo [N27A1, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)]; mouse anti-Eya [10H6, 1:100; DSHB]; rat anti-DE-cadherin [DCAD2, 1:10 DSHB]; goat anti-dApc1 [dD-17, 1:10 Santa Cruz Biotechnology]; rabbit anti-dApc1 [1:1000; (Hayashi et al., 1997)]; guinea-pig anti-dApc2 [1:12000; (Takacs et al., 2008)]; rat anti-dApc2 [1:1000; (McCartney et al., 2006)]; mouse anti-β-tubulin coupled to FITC [1:100 SIGMA]. Secondary antibodies were from Molecular Probes, used at 1:400 and conjugated to Alexa-Fluor-546, CY5 or CY3. DAPI has been used at 5 μg/ml. Confocal images were taken using a Zeiss LSM 510 META confocal microscope using X40 and 1.3 NA oil immersion objectives.

Egg chamber culture and live imaging

Drosophila ovaries were dissected in Schneider's insect medium (Biowest) supplemented with 15% of heat inactivated fetal bovine serum (Biowest), 0.2 mg/ml insulin (19278 Sigma) and 5 ng/ml FM4-64 (T13320 Invitrogen Molecular Probes) and transferred to labtek chambers (155380 Nunc) coated with Poly-D-Lysine 2 mg/ml (354210 BD Biosciences) for 1 h at room temperature, and filled with 500 μl of the same medium. Images were acquired at 25 °C every 5 min, for 5 h 45 min, using a wide field Deltavision microscope (Applied Precision, D.V 3.0 System, 1 × 70 olympus microscope and CH350 camera) and deconvolved using SoftWorx.

Movie analysis

Movies were analyzed using image J and Fiji softwares. To quantify the average speed of cluster migration, images were first aligned to reduce errors from egg chamber movement sometimes occurring during the movie. We then tracked the cluster in the *X/Y* axis using a manual tracking plugin for ImageJ. (Movies S1–S4)

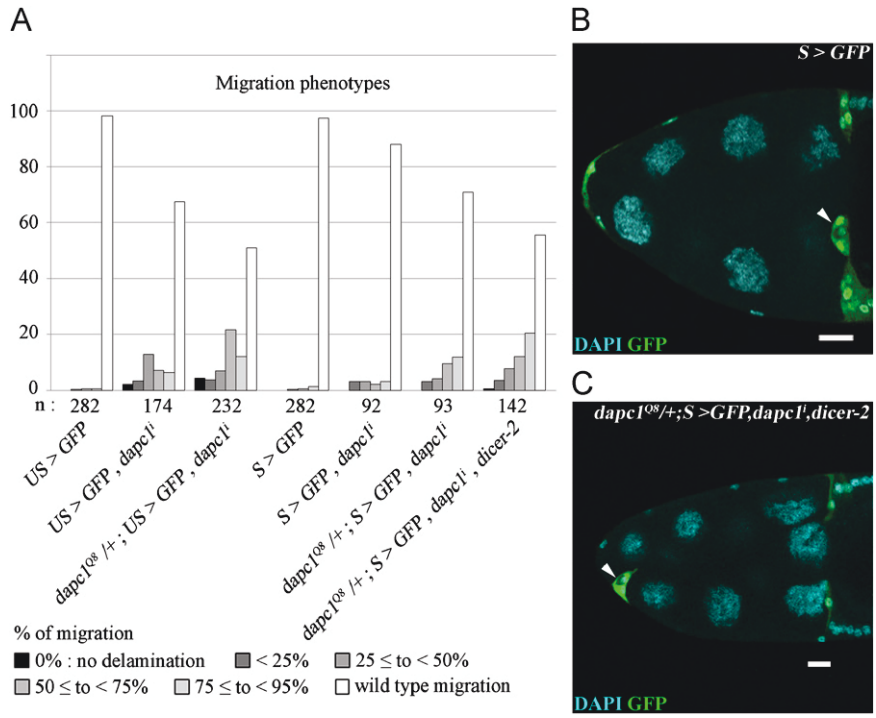


Fig. 1. *RNAi* downregulation of *dapc1* in BCs interferes with cluster migration. (A): Quantification of BC migration defects in egg chambers heterozygous or not for *dapc1*^{Q8} loss of function allele in which different transgenes can be expressed in the PC (U) and the oBC and adjacent SC (S), or in the oBC and adjacent SC (S) alone. The transgenes of interest are the *GFP*, that allows tracking of the cluster (white arrowheads), *dapc1*^{i}: the double stranded RNA construct targeting *dapc1*, and *dicer-2* that allows the enhancement of the *RNAi* process. Indicated are the percentages of BC that reached the oocyte (white), that did not delaminate (black), that migrated part of the distance to the oocyte (light gray to dark gray) in egg chambers at stage 10 of development. *n*: number of examined egg chambers. (B): Control stage 10 egg chamber expressing *GFP* in the oBC. Note that the BC cluster has reached the oocyte (white arrowhead). (C) Stage 10 egg chamber heterozygous for *dapc1* mutant allele expressing *GFP* together with *dicer-2* and *dapc1*^{i} in the oBC. Note that the mutant BC cluster did not delaminate (white arrowhead). Egg chambers are stained for GFP (green) and DAPI (blue) to localize the nuclei. (B)–(C): White bar is 20 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Supplementary material related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.017.

Results

Drosophila apc1 downregulation impairs border cell migration

We used an *in vivo* inducible *RNAi* strategy to screen for new genes involved in BC migration. *UAS-RNAi* transgenic flies from the NIG-FLY stock center were individually crossed to the "US" flies, carrying *unpaired Gal4* (*U*) and *slow border cells Gal4* (*S*) drivers, allowing respective expression in the PC and in the oBC plus a few adjacent SC. The line also carries a *UAS-GFP* transgene allowing direct BC visualization (Pinheiro and Montell, 2004).

We classified the migration abnormalities in different groups: absence of delamination, incomplete migration or normal migration. Crosses leading to abnormal BC delamination and/or migration in 25% or more of stage 10 egg chambers were selected for further analysis.

Among different candidates, the *RNAi* construct targeting *CG1451* interfered with BC migration. We confirmed these results by using *RNAi* transgenic flies from the VDRC collection (Fig. 1; see Materials and methods). *CG1451* encodes for the *Drosophila* Adenomatous polyposis coli protein 1 (dApc1). These migration defects were also observed using the *c*^{306}*-Gal4* driver that is expressed in BC and anterior SC (Manseau et al., 1997) (data not shown). Lastly, this phenotype persisted when *dapc1-RNAi* (*dapc1*^{i}) was expressed exclusively in oBC and adjacent SC using the *slow border cells Gal4* driver alone (Fig. 1A). Interestingly, we observed that the BC cluster was sometimes unable to delaminate. When delaminating, it followed the wild type pathway crawling through the NC but often harbored a delay in migration. The *dapc1*^{Q8} allele is a loss of function allele leading to the synthesis of a protein deleted from all the β-catenin/Arm binding sites (Ahmed et al., 1998). Interestingly, when *dapc1*^{i} was expressed in a *dapc1*^{Q8} heterozygous context we observed an enhancement of BC migration defects. The phenotype was further enhanced when we concomitantly expressed *dicer-2* in order to improve the *RNAi* efficiency (Fig. 1) (Bernstein et al., 2001).

We next determined dApc1 and dApc2 expression pattern in the egg chamber using antibodies and a GFP reporter line (Figs. S1 and S2) (see Materials and Methods). Drosophila Apc1 and Apc2 are ubiquitously expressed in the egg chamber at all stages of development. Both proteins are found in the cytoplasm and are clearly enriched at the cell cortex. Interestingly, we noticed a stronger staining at the junction between BC cluster and surrounding cells. Altogether, these results suggest that *dapc1* is required in somatic cells for cluster migration.

Loss of dapc1, but not dapc2 function both in BC and contacting SC interferes with cluster delamination

In order to characterize in more details the migration phenotype, we generated *dapc* mutant clones. In *Drosophila*, *dapc1* and *dapc2* act redundantly, except in the *Drosophila* compound eye neurons (Ahmed et al., 1998). We therefore generated MARCM clones (McGuire et al., 2003) mutant for *dapc1* or *dapc2* or *dapc1* and *dapc2* (*dapc*), using *dapc2*^{33} and *dapc1*^{Q8} loss of function alleles (Benchabane et al., 2008; Takacs et al., 2008). To distinguish the different FC populations, we used Eya and Slbo molecular markers. Indeed, the SC express Eya but not Slbo, the PC express Slbo but not Eya and the oBC express both Eya and Slbo (Fig. 2A–B′) (Bai and Montell, 2002; Montell et al., 1992).

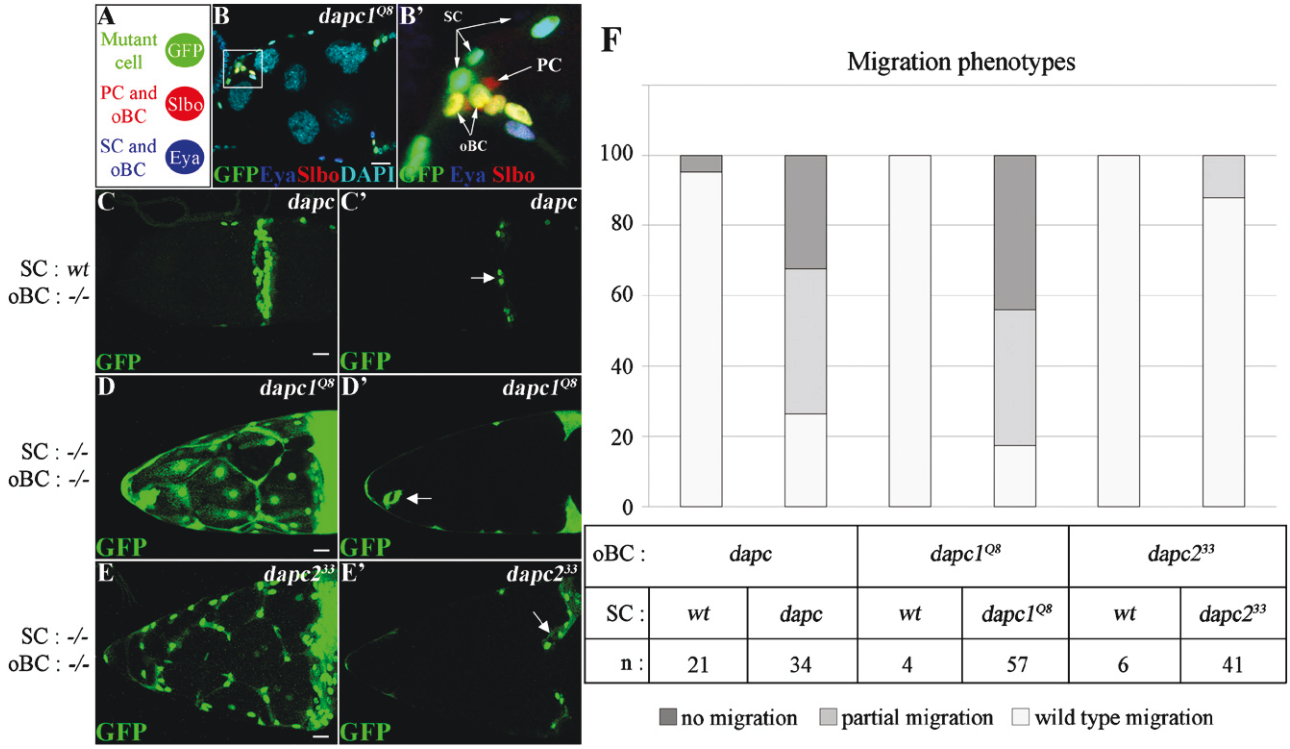


Fig. 2. Loss of *dapc1*, but not *dapc2*, function in SC and oBC interferes with BC migration. (A): The Eya and Slbo double immunostaining allows to discriminate the SC characterized by the sole expression of Eya from the PC characterized by the sole expression of Slbo and the oBC expressing both Eya and Slbo. Mutant cells are GFP positive. (B): Stage 10 *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chamber stained for GFP (green), DAPI (light blue) to mark the nuclei, Eya (dark blue) and Slbo (red). (B′): Magnified view of the BC cluster seen in B (white square). (C–E′): stage 10 *dapc* (C–C′); *dapc1* (D–D′) and *dapc2* (E–E′) mutant MARCM mosaic egg chambers stained for GFP (green). C, D, E are sum of confocal planes, C′, D′, E′ are single confocal planes. White arrows point to the mutant clusters. (B–E): White bar is 20 μm. (F): Quantification of BC migration defects in stage 10 *dapc*, *dapc1* or *dapc2* mutant MARCM mosaic egg chambers in which most of the SC are wild type or mutant and all the oBC are mutant. Indicated are absence of delamination (dark gray), partial migration (gray) or wild type migration (light gray). *n*: number of examined egg chambers. Note that in *dapc* and *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chambers, clusters that do not delaminate from the apical pole are always associated to mutant SC. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

When only oBC cells were mutant for *dapc1*^{Q8} or *dapc*, BC cluster migrated normally in 95% of the egg chambers. In contrast, when both oBC and adjacent SC were mutant, BC cluster remained at the anterior pole in about 40% of the egg chambers, failed to reach the oocyte in about 40% of the egg chambers and showed the right migration timing in only 20% of the egg chambers (Fig. 2C–F).

Loss of *dapc2* function did not generate significant migration defects (Fig. 2E–F). Unfortunately, no egg chamber in which the SC were mutant and the oBC wild type could be observed. Hence, in order to determine whether *dapc1* might be required in SC only or both in SC and oBC, we turned back to the *UAS-RNAi* approach and used the *cb*^{41}*-Gal4* driver to randomly downregulate *dapc1* expression in FC except BC (McDonald et al., 2006). In order to enhance the *RNAi* efficiency, we concomitantly expressed *dicer-2* (Bernstein et al., 2001). In 28 egg chambers in which *dapc1* expression was downregulated in SC only, we never detected BC cluster migration defects (data not shown). Hence, lack of *dapc1* but not *dapc2* in both SC and oBC prevents BC cluster migration. These results suggest that *dapc1* might be involved in adhesive junction remodeling between oBC and SC, a process which is essential to BC cluster delamination.

Both dapc1 and dapc2 overexpression can rescue dapc loss of function phenotype

To understand better this cluster migration defect, we performed rescue experiments of the *dapc1* mutant phenotype by expressing dApc1 wild type protein (Ahmed et al., 2002), specifically in the mutant cells. Immunohistochemistry revealed that dApc1 was clearly overexpressed in the rescue experiments (Fig. 3B and Fig. S1 F).

In order to quantify the rescue efficiency, we focused on egg chambers in which most of the SC and all of the oBC were mutant. Expression of dApc1 significantly rescued the *dapc1* mutant phenotype since BC cluster reached the oocyte in 51% of the egg chambers (compared to 20% in mutant egg chambers Fig. 3A and B). We next assessed whether dApc2 overexpression was able to rescue the *dapc1* mutant phenotype and whether this putative property would be linked to its subcellular localization. We therefore generated MARCM *dapc1* mutant clones expressing an EGFP tagged dApc2 full length protein (EGFP-dApc2-FL), that localizes to the cell cortex (Fig. 3E–E′) or a deleted dApc2 protein lacking a 30 amino acid C-terminal domain: EGFP-dApc2-ΔC30, that remains in the cytoplasm and no longer accumulates at the cell cortex (Fig. 3F–F′) (Zhou et al., 2011). Both *EGFP tagged dapc2* transgenes are under the control of the *dapc2* promoter. Interestingly and in contrast to EGFP-dApc2-ΔC30, the EGFP-dApc2-FL generated a partial rescue that is statistically significant (Fig. 3A and C). We concluded that the difference in the rescuing efficiencies between the two dApc2 proteins resulted from their intracellular localization. In light of these results it is interesting to note that when overexpressed, dApc1 localizes not only at the cell cortex (Fig. 3B), but is also clearly present in the cytoplasm (Fig. 3D–D″). Since *dapc1* overexpression did not notably interfere with BC migration (Fig. 4 and data not shown), this latter localization might explain the absence of total rescue. Altogether, these results indicate that the *dapc1* mutant BC migration defect is rescued by dApc1 or cortical dApc2.

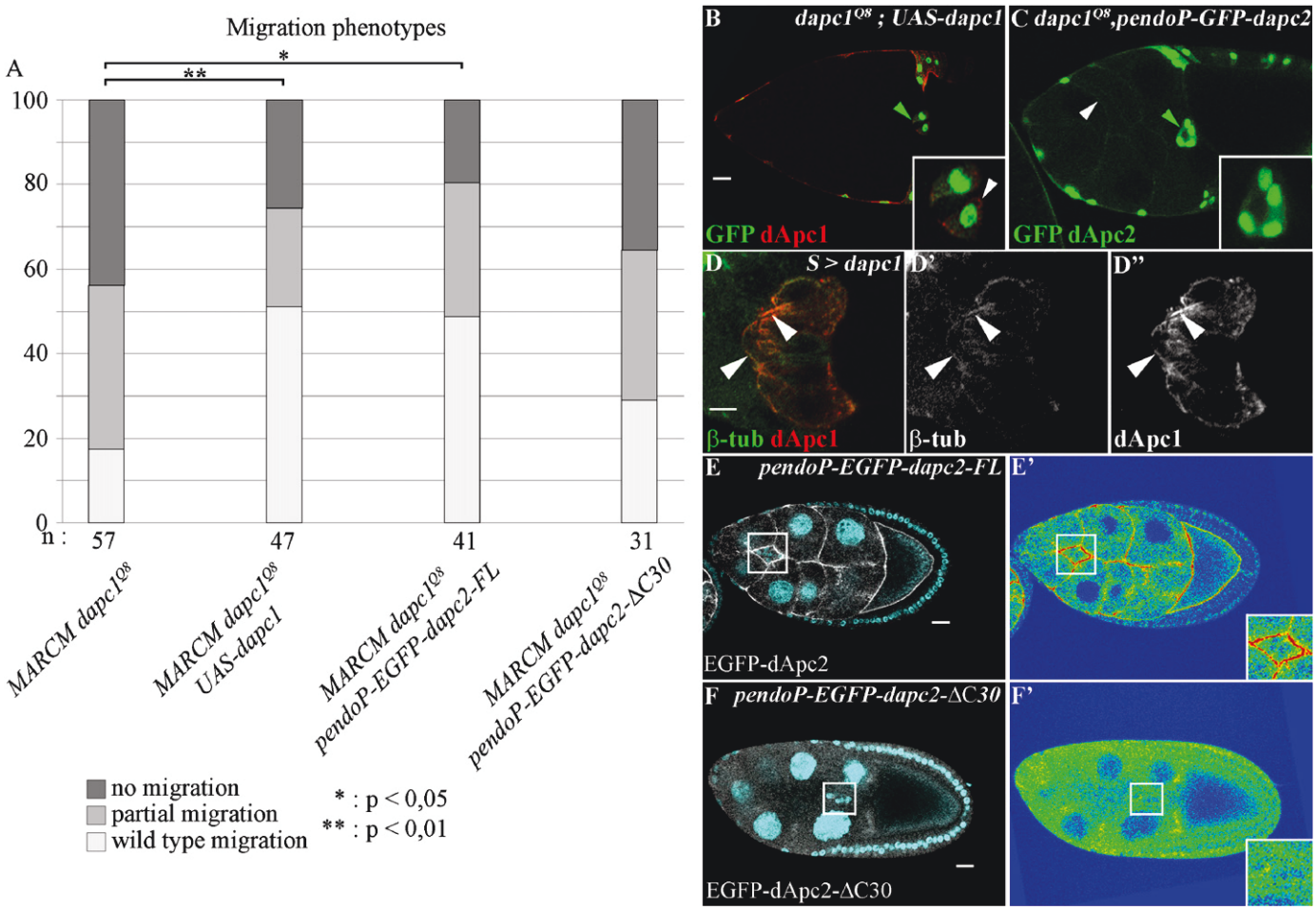


Fig. 3. *dapc1* or *dapc2* overexpression rescues *dapc1* mutant phenotype. (A): Quantification of BC migration defects in stage 10 *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chambers harboring additional transgenes. These are the *dapc1* transgene under the control of a UAS promoter or *EGFP-dapc2* alleles under the control of *dapc2* promoter [*pendoP*] encoding either the full length dApc2 [*EGFP-dapc2-FL*] or a truncated molecule [*EGFP-dapc2-ΔC30*]. Most of the SC and all the oBC are mutant. Indicated are the percentages of BC clusters that did not delaminate (dark gray), that migrated partially (gray) or reached the oocyte (light gray). *n*: number of examined egg chambers. (B–C): Stage 10 *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chambers harboring either a *UAS-dapc1* transgene (B) or a *EGFP-dapc2-FL* transgene under the control of the *dapc2* promoter (C). Egg chambers are stained for dApc1 (red in B) and GFP (green) to mark homozygous mutant clones (B–C) and GFP tagged-dApc2 (C). Insets show magnification of the BC cluster that reached the oocyte (green arrowhead). Small white arrowheads point to cortical dApc1 (B) and cortical dApc2 (C). (D–D''): BC cluster expressing a *UAS-dapc1* transgene in the oBC. Cells are stained for *β*-tubulin (green) and dApc1 (red). Note in D that both stainings partially overlap indicating that both proteins can colocalize (arrowheads). Thus when overexpressed, dApc1 localizes not only at the cell cortex but also in the cytoplasm. (E–F′): Stage 9 egg chambers expressing, under the control of the *dapc2* promoter, either EGFP-dApc2-FL (E–E′) or EGFP-dApc2-ΔC30 (F–F′). Egg chambers are stained for EGFP-dApc2. E′ and F′ are rainbow representations of E and F, respectively. This representation allows the distinction of EGFP-dApc2 levels that can be strong (red), medium (yellow) or low (blue). Insets show magnification of the BC clusters. Note that the full length EGFP-dApc2 is mostly cortical whereas EGFP-dApc2 ΔC30 is diffused in the cytoplasm. This latter protein allows to clearly see *dapc2* expression in FC. White bars are 20 μm in B, C, E and F and 5 μm in D. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

dapc1 is crucial for BC delamination

Loss of *dapc1* function in oBC and contacting SC leads to BC delamination defects as well as migration delays. The migration delay phenotype could be a consequence of late delamination, or a direct effect of the lack of dApc1 during the migration process. To discriminate between these two hypotheses, we performed live imaging of egg chambers in which we knocked down *dapc1* using the *RNAi* approach or in which BC and contacting SC were mutant for *dapc1* function using the MARCM approach (supplemental movies). Because we observed some variability in the speed rate of the BC depending on the genetic background, we systematically associated the corresponding control to any experiment. In control egg chambers, BC delaminated early to mid stage 9 (Fig. 4A). In contrast, loss of *dapc1* function in oBC and contacting SC clearly delayed the timing of delamination. Indeed in 8 *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chambers, 3 mutant clusters stayed at the anterior pole, 3 delaminated at late stage 9 and 2 delaminated during the first half of stage 9 (Fig. 4A). Similar observations were seen when using the *RNAi* approach. In this latter case, 2 clusters remained at the anterior pole, one delaminated at late stage 9 and no cluster delaminated during early stage 9 (Fig. 4A). These results confirmed that *dapc1* function is required in adjacent SC and BC for proper delamination to occur. When the mutant BC cluster was able to delaminate and move toward the oocyte, we measured its average speed (Fig. 4B). Interestingly, the reduction of *dapc1* function did not significantly affect velocity compared to the controls. Hence, migration delays observed are likely to be due to late cluster delamination. These results therefore suggest that *dapc1* controls delamination rather than the dynamics/velocity of BC migration.

dapc1 down regulates cortical β-catenin/Arm

One of the Apc protein partner is *β*-catenin/Arm, a remarkably multifunctional protein serving both in epithelial cell adherens junctions together with DE-cadherin and when complexed with

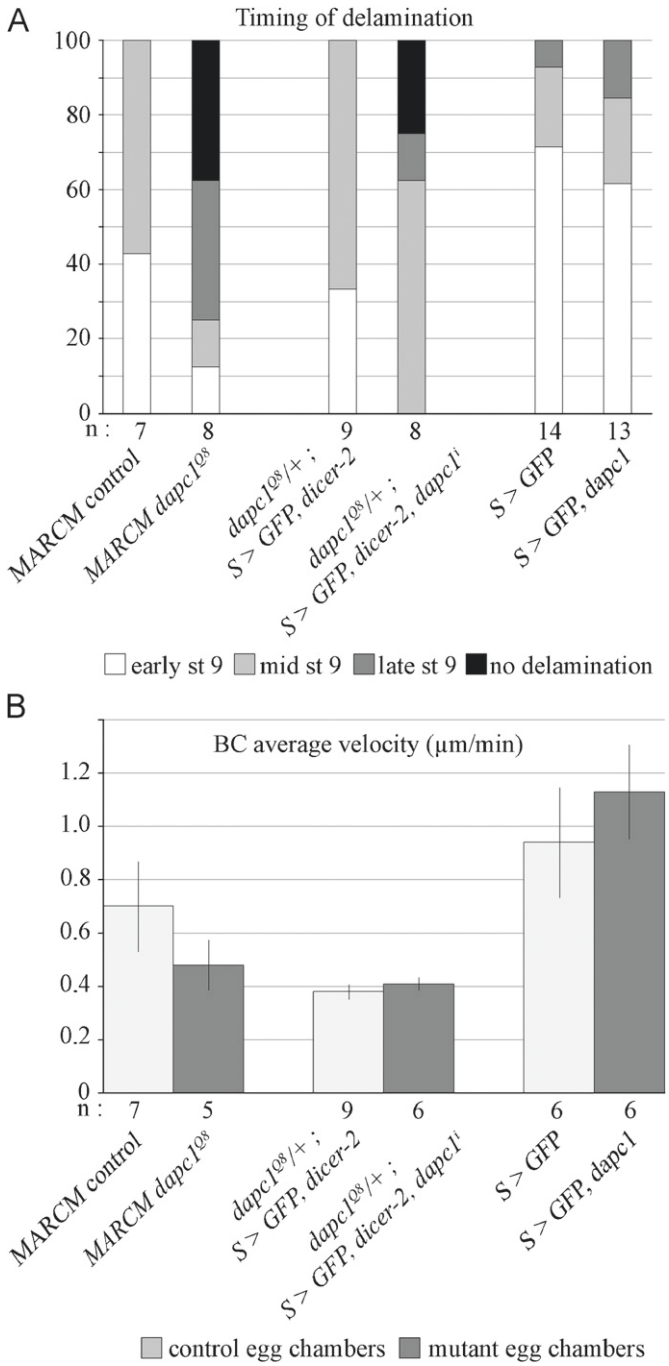


Fig. 4. Loss of *dapc1* function in SC and oBC delays cluster delamination but does not affect BC migration. (A) Live imaging was performed on control or *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chambers in which all oBC and contacting SC were mutant. Live imaging was also performed on egg chambers heterozygous or not for *dapc1* mutant allele and expressing different transgenes allowing the expression of *GFP*, *dapc1*^{i}, *dicer-2* or *dapc1* in oBC and adjacent SC. Data was analyzed to determine the timing of cluster delamination that could be early stage 9 (white), mid stage 9 (light gray), late stage 9 (dark gray), or unsuccessful (black). *n*: number of movies analyzed. (B): Live imaging data were analyzed to determine the average velocity (µm per minute) of the different clusters when they had delaminated. *n*: number of movies analyzed.

the DNA-binding protein T-cell factor (TCF), as a transcriptional activator in the evolutionarily conserved Wnt/Wingless signal transduction pathway (reviewed in Willert and Nusse, 1998). In order to better understand the molecular function of *dapc1* during delamination we analyzed the expression of β-catenin/Arm and some of its partners involved in cell adhesion.

In wild type stage 8 egg chambers, BC are still part of the follicular epithelium surrounding the NC (data not shown). At early stage 9, the oBC adhesions with neighboring SC have to be remodeled to allow the cluster to delaminate and migrate toward the oocyte. As can be seen in Fig. 5, in a delaminating cluster, β-catenin/Arm strongly accumulates at the boundary of oBC with PC (Fig. 5A–A‴). In comparison, β-catenin/Arm staining is much reduced at the interface between the oBC and between the oBC and NC or SC (Fig. 5A–A‴). Such staining reflects adhesiveness strength between cells. Indeed, cellular interactions need to be strong between oBC and PC to insure the cluster cohesion and to be more loose and dynamic between oBC and other cell types to allow detachment from SC and migration.

Interestingly, in *dapc* and *dapc1* loss of function conditions, instead of decreasing prior to delamination, β-catenin/Arm and DE-cadherin stainings remained important at the boundary between oBC (Fig. 5B–C‴), but also at the boundary between oBC and SC (Fig. 5B–C‴) and in between SC (Fig. 5B–B‴). Loss of *dapc* function in SC also interferes with their spreading (data not shown). This steady staining was not observed at the interface of a mutant oBC with a wild type SC (Fig. 5D–D‴, pink arrowheads) or a wild type oBC with a mutant SC (Fig. 5E–E‴, pink arrowheads), nor was it observed at the interface of *dapc2* mutant oBC and SC (Fig. S2 F–F‴). Remarkably, (Fig. 5) persistence of β-catenin/Arm and DE-cadherin staining, reflecting maintenance of cell adhesiveness in *dapc1* mutant conditions, is apparent only when mutant BC contact mutant SC which is consistent with our genetic analysis (Figs. 2 and 3).

Together, these results suggest that dApc1 favors dismantling of β-catenin/Arm and DE-cadherin containing adhesion complexes thereby influencing epithelial FC adhesion and BC detachment from SC.

Modulation of β-catenin/Arm and DE-cadherin levels is independent of Wg and can rescue dapc1 phenotype

We next wondered whether *dapc* function was dependent on Wg signaling and tested whether Wg gain of function in oBC might influence BC migration. We used the activated *armS10* allele, which lacks a GSK-3β phosphorylation site (aa 34–87) controlling protein degradation after phosphorylation. As a result, ArmS10 escapes normal negative regulatory cues and it accumulates at the membrane, in the cytoplasm and nucleus of all cells regardless of whether they receive or not the Wg signal. Even though ArmS10 is constitutively active in Wg signaling, it is also functional in adherens junctions. Nevertheless, when overexpressed in oBC, ArmS10 did not influence BC migration (Pai et al., 1997; Loureiro et al., 2001 and data not shown) indicating that BC migration is not influenced by Wg signaling.

In order to confirm the importance of β-catenin/Arm and DE-cadherin in *dapc* and *dapc1* mutant phenotypes, we first down-regulated β-catenin/Arm and DE-cadherin levels in the mutant cells. Lowering β-catenin/Arm levels by using a *RNAi* construct significantly rescued both *dapc* and *dapc1* mutant phenotypes ($p < 0.01$) (Fig. 6A and B). Indeed, 69% of *dapc* mutant and 75% of *dapc1* mutant oBC migrated normally to the oocyte (as compared to 26.5% of *dapc* mutant and 17.5% *dapc1* mutant oBC in which *β-catenin/arm* expression is not down regulated). Although not as efficient, *DE-cadherin* downregulation also partially rescued *dapc1* mutant phenotype (Fig. S3). Surprisingly overexpression of *β-catenin/arm* in mutant cells also generated a partial rescue. This rescue appears qualitatively different from the rescue generated by downregulation of *β-catenin/arm*. Indeed although 90% of the clusters are able to delaminate when overexpressing β-catenin/Arm, only 22% of *dapc1* and 50% of *dapc* mutant clusters are able to reach the oocyte in time (as compared to 75% of the *dapc1* mutant and 69% of *dapc* mutant clusters in which we knocked

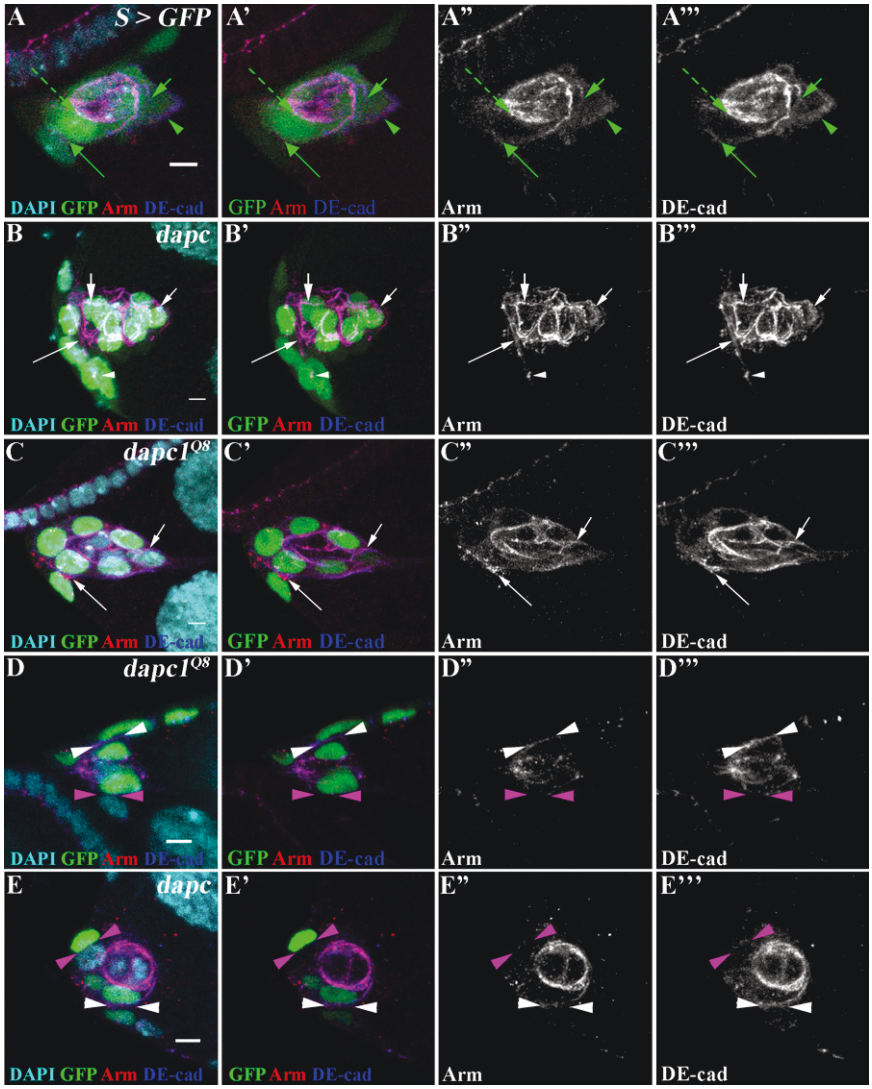


Fig. 5. *dapc* is essential for dismantling β-catenin/Arm–DE-cadherin containing adhesion complexes between oBC and neighboring SC. (A–A‴): Early stage 9 egg chamber expressing *GFP* in oBC and adjacent SC stained for GFP (green), DAPI (light blue) to mark the nuclei, β-catenin/Arm (red) and DE-cadherin (dark blue). Note that β-catenin/Arm and DE-cadherin stainings are stronger at the interface of oBC with PC (long dashed green arrow) compared to the interface of oBC with oBC (small green arrow), NC (green arrowhead) and SC (long green arrow). This staining reflects oBC adhesion strength with its environment. (B–E‴): BC of stage 10 *dapc* (B–B‴) and *dapc1* (C–C‴) mutant MARCM mosaic egg chambers or stage 9 *dapc1* (D–D‴) and *dapc* (E–E‴) mutant MARCM mosaic egg chamber, stained as in A. Note that loss of *dapc* or *dapc1* function both in oBC and contacting SC leads to DE-cadherin and β-catenin/Arm abnormal persistence at their interface (long white arrow). DE-cadherin and β-catenin/Arm abnormal accumulation can also be seen at the interface of mutant SC (white arrowhead) or mutant oBC (small white arrow). In the early stage 9 delaminating cluster (D–E), β-catenin/Arm and DE-cadherin stainings are weaker at the interface of mutant oBC with wild type SC (D, pink arrowheads) or wild type oBC with mutant SC (E, pink arrowheads) compared to the interface of mutant oBC with mutant SC (D–E, white arrowheads). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

down *β-catenin/arm*). Interestingly and in contrast to wild type β-catenin/Arm, the overexpression of ArmS10 did not rescue the *dapc1* mutant phenotype (see discussion).

Finally we determined the role of α-catenin, another component of the adherens junction, on BC migration. The α-catenin proteins link the DE-cadherin-β-catenin/Arm complexes to the actin cytoskeleton which is essential for cell adhesion (Hirano et al., 1987; Nagafuchi et al., 1994). Downregulation of α-catenin levels in the anterior FC, using the *RNAi* approach, strongly interfered with the egg chamber development when the flies were raised at 30 °C. At 25 °C however, *α-catenin* downregulation interfered with BC migration in 37% of the egg chambers (Fig. S4 A and B, white arrow). At this temperature, *dapc1* downregulation did not impair BC migration (Fig. S4 A and C, white arrow). But interestingly the *α-catenin*^{i} phenotype was enhanced when *dapc1* was concomitantly downregulated and the BC delamination process was strongly affected (Fig. S4 A and D, white arrow).

These experiments suggest that α-catenin, β-catenin and DE-cadherin are regulated by dApc1 for proper BC delamination (Fig. 7). This mechanism does not depend on Wg signaling.

Discussion

Cell migration is a dynamic process involving multiple cell–cell and cell–substrate interactions. It is therefore important to better characterize the molecular mechanisms underlying cell adhesion during all stages of cell invasion. BC migration represents a powerful *in vivo* model, as cells become motile through a multistep process involving cluster assembly and cohesion, delamination from the follicular epithelium, and labile interactions with nurse cells throughout migration. All these processes require the dynamic remodeling of DE-cadherin and β-catenin/Arm during adhesion. Indeed, an artificial DE-cadherin-β-catenin/Arm fusion

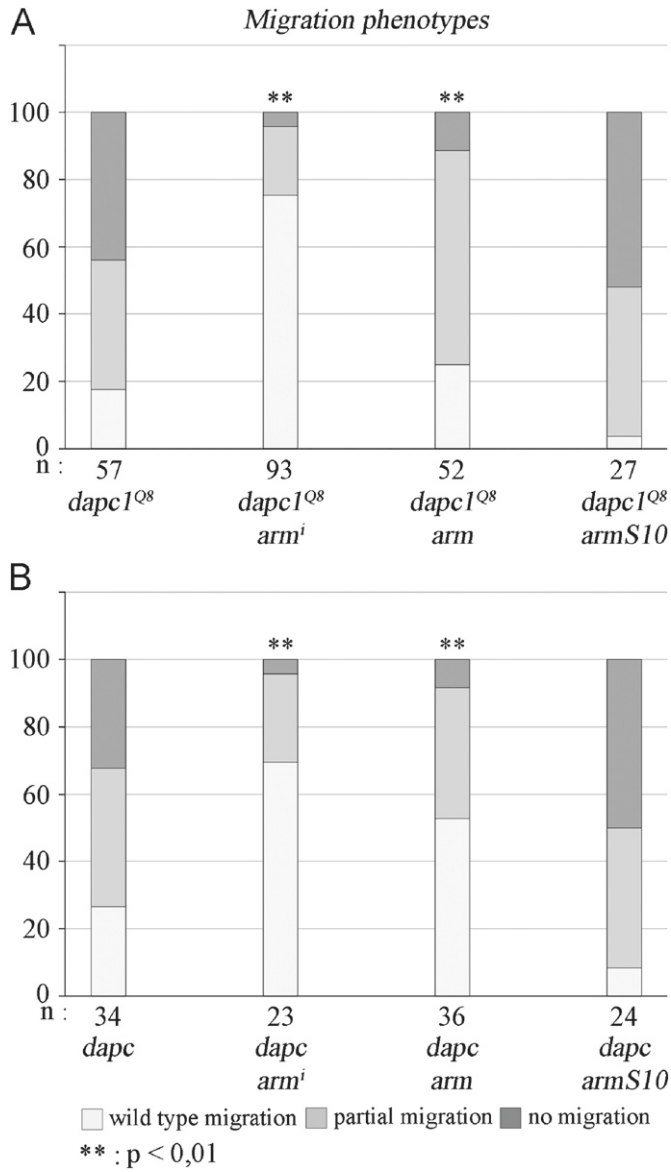


Fig. 6. β-catenin/Arm levels modulate the *dapc* and *dapc1* loss of function phenotypes. Quantification of BC migration defects in stage 10 *dapc* or *dapc1* mutant MARCM mosaic egg chambers in which β-catenin/Arm levels are either lowered in the mutant cells by the use of *UAS-arm*^{i} transgene allowing the expression of a double stranded *RNAi* construct targeting *β-catenin/arm* expression or enhanced by overexpressing a wild type or an activated form of *β-catenin/arm*, respectively *arm* and *arm-S10*, under the control of a *UAS* promoter. Most of the SC and all the oBC are mutant. Indicated are the percentage of BC that did not delaminate (dark gray), that migrated partially (gray) or reached the oocyte (light gray). *n*: number of examined egg chambers. Note that *β-catenin/arm* up- and down regulation significantly rescued the *dapc* and *dapc1* mutant phenotype.

protein can act as a strong dominant negative preventing BC migration (Pacquelet and Rorth, 2005).

Several mechanisms can regulate DE-cadherin–β-catenin/Arm interactions. In cell culture systems, Apc proteins have been shown to be able to compete with E-cadherin for β-catenin/Arm binding. As a result, β-catenin/Arm is continuously incorporated into and released from adherens junctions. Hence β-catenin/Arm exchange is strongly affected in cells containing mutations in the *apc* gene (Hulsken et al., 1994a; Hulsken et al., 1994b; Klingelhofer et al., 2003). Nevertheless, little is known about the molecular events involved in cell delamination and about the role of Apc in this process. In order to better understand how cell–cell and cell–substrate interactions control BC migration, we performed an *RNAi*-based genetic screen and identified *dapc1* as a key regulator of BC delamination.

Drosophila Apc1 regulates adhesion between BC and SC allowing BC delamination

Our results show that dApc1 regulates BC delamination through DE-cadherin–β-catenin/Arm remodeling at the interface between oBC and SC. Indeed, loss of *dapc1* function in oBC and adjacent SC led to abnormal persistence of DE-cadherin and β-catenin/Arm proteins at their boundary preventing them to detach from neighboring cells. Down regulation of *β-catenin/arm* or *DE-cadherin* rescued the *dapc1* mutant phenotype indicating that loss of *dapc1* function indeed increases adhesion strength between oBC and adjacent SC. Our results fit with a model (Fig. 7) in which dApc1 regulates BC–SC adhesion acting at two levels. First, dApc1 competes with DE-cadherin for β-catenin/Arm binding, hence regulating the interaction between DE-cadherin and β-catenin/Arm and thereby adhesion remodeling. Second, dApc1 also favors β-catenin/Arm degradation, thereby controlling the level of proteins involved in adhesion. Altogether, this allows dApc1 to regulate negatively global adhesion strength in between oBC and SC and control BC delamination (Fig. 7A).

In the absence of dApc1, the half-life of β-catenin/Arm is sustained, its interaction with DE-cadherin is favored and as a consequence cells display at their surface a higher number of stable adhesions (Fig. 7B). The *dapc1* over-adhesive phenotype can be rescued by lowering β-catenin/Arm levels, rendering delamination again possible (Fig. 7C). Surprisingly, overexpression of β-catenin/Arm in *dapc1* mutant cells also generated a partial rescue of the *dapc1* mutant phenotype. Although most of the BC clusters did not reach the oocyte in time, some mutant clusters were able to delaminate. Overexpression of β-catenin/Arm probably bypasses the need of dApc. Indeed excess of β-catenin/Arm molecules generates inter-molecular competition for DE-cadherin binding, rescuing partially BC delamination. In contrast to wild type β-catenin/Arm, the overexpression of ArmS10 did not rescue the *dapc* mutant phenotype. ArmS10 lacks a sequence (aa 34–87) that contains a consensus GSK-3β phosphorylation site leading to the degradation of wild type β-catenin/Arm protein after phosphorylation. This suggests that β-catenin/Arm phosphorylation by GSK3-β kinase is required for BC delamination (Kim and Kimmel, 2000). Our results are consistent with previous data obtained in HUVECs showing the presence of Apc and β-catenin/Arm containing complexes that are phosphorylated by GSK3β/CKI, favoring their degradation (Harris and Nelson, 2010).

The *dapc* mutant phenotype requires loss of *dapc* both in oBC and adjacent SC. Indeed, when mutant BCs interact with wild type SCs, or *vice-versa*, abnormal accumulation of β-catenin/Arm and DE-cadherin is no longer detectable in between the mutant and wild type cells and BC delaminate, migrate and reach the oocyte normally. This suggests that in the absence of *dapc*, DE-cadherin from the mutant cell can still establish a functional interaction with DE-cadherin from the wild type cell. The remodeling of β-catenin/Arm–DE-cadherin in the wild type cell is probably sufficient to allow the release of the mutant cell.

Live imaging of migrating BC clusters revealed that oBC change their position within the cluster throughout migration (Prasad and Montell, 2007). Loss of *dapc* function led to persistent β-catenin/Arm and DE-cadherin at cell boundaries (oBC–oBC and oBC–SC interfaces), therefore potentially increasing cluster stiffness. However, we did not observe any defect in mutant oBC tumbling or cluster velocity, suggesting that dApc1 is not essential for regulating inter-oBCs interactions during migration.

Several models from cell culture to mouse have been used to study Apc function. Wild type Apc acts as a scaffold for many

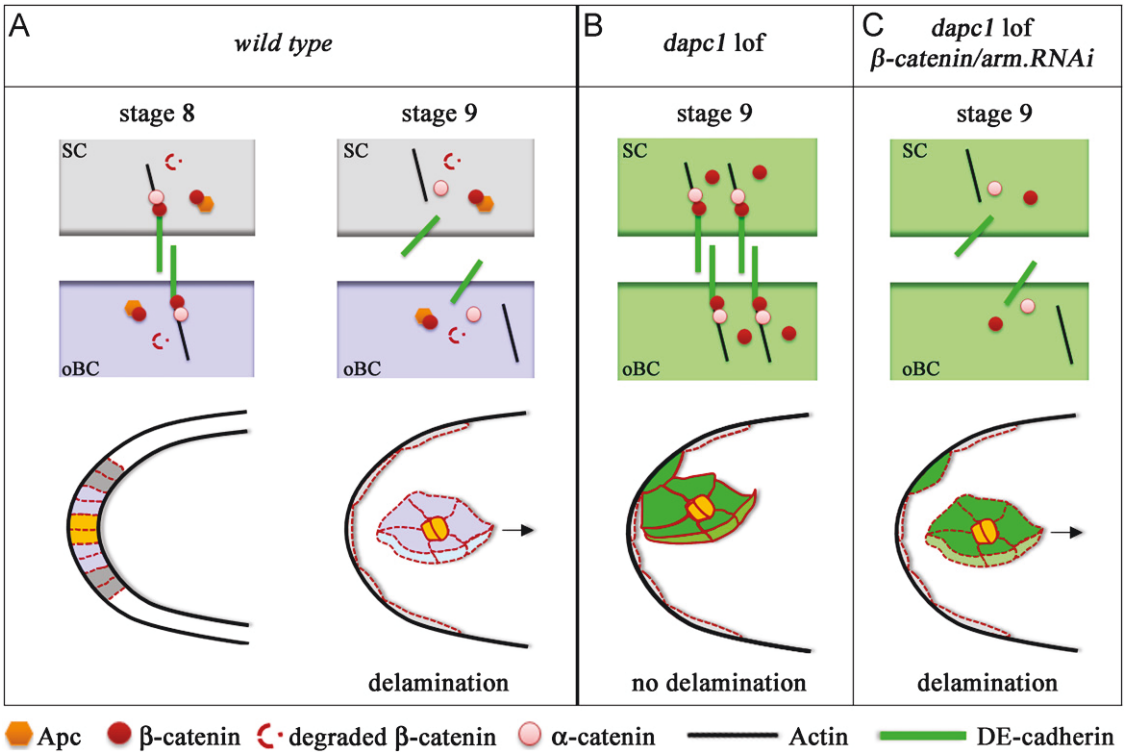


Fig. 7. Model for *dapc1* function. (A): In wild type cells, cortical dApc1 competes with DE-cadherin for β-catenin/Arm binding and targets β-catenin/Arm for destruction. Thereby dApc1 regulates adhesion strenght between oBC and SC, allowing BC delamination early stage 9. It remains to be determined what and how signaling pathways regulate dApc1 and its partners. (B): The absence of dApc1 has two consequences: β-catenin/Arm accumulates abnormally at the cell cortex and this favors its interaction with DE-cadherin. These two events stabilize BC–SC adhesion which delays or prevents BC delamination. (C): In such a *dapc1* mutant context, lowering β-catenin/Arm accumulation reduces the number of functional DE-cadherin adhesion complexes in between SC and oBC, reducing thereby the adhesion strength and allowing BC cluster delamination.

proteins including F-actin, microtubules, β-catenin/Arm, and regulates multiple biological processes independent of Wg signaling, such as chromosomal segregation, cell adhesion, cell migration and recently apical cell extrusion (reviewed in Aoki and Taketo, 2007; Kroboth et al., 2007; Marshall et al., 2011). Our results show that BC migration provides a new powerful model, out of Wg influence, unraveling mechanisms regulating collective cell migration *in vivo* with important implications for wound healing and tumor metastasis.

Acknowledgments

We thank Drs. Y. Ahmed, B. McCartney, D. Montell, E. Wieschaus, the Bloomington Stock Center, the NIG-Fly stock center, the Vienna *Drosophila RNAi* Center, and the Developmental Studies Hybridoma Bank for reagents. Special thanks to the lab members and Florence Besse for critical reading of the manuscript, Sébastien Schaub for statistical analysis and Maëlle Ogier for movie analysis. This work was supported by grants from the Center National de la Recherche Scientifique, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Indo-French Center for Promotion of Advanced Research, the Association pour la Recherche Contre le Cancer, the European Molecular Biology Organization Young Investigator Program and the Agence Nationale de la Recherche.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.017.

References

Ahmed, Y., Hayashi, S., Levine, A., Wieschaus, E., 1998. Regulation of armadillo by a Drosophila APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development. Cell 93, 1171–1182.
Ahmed, Y., Nouri, A., Wieschaus, E., 2002. Drosophila Apc1 and Apc2 regulate Wingless transduction throughout development. Development 129, 1751–1762.
Akong, K., Grevengoed, E.E., Price, M.H., McCartney, B.M., Hayden, M.A., DeNofrio, J.C., Peifer, M., 2002a. Drosophila APC2 and APC1 play overlapping roles in wingless signaling in the embryo and imaginal discs. Dev. Biol. 250, 91–100.
Akong, K., McCartney, B.M., Peifer, M., 2002b. Drosophila APC2 and APC1 have overlapping roles in the larval brain despite their distinct intracellular localizations. Dev. Biol. 250, 71–90.
Aoki, K., Taketo, M.M., 2007. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. J. Cell Sci. 120, 3327–3335.
Bai, J., Montell, D., 2002. Eyes absent, a key repressor of polar cell fate during Drosophila oogenesis. Development 129, 5377–5388.
Benchabane, H., Hughes, E.G., Takacs, C.M., Baird, J.R., Ahmed, Y., 2008. Adenomatous polyposis coli is present near the minimal level required for accurate graded responses to the Wingless morphogen. Development 135, 963–971.
Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409, 363–366.
Bienz, M., 2002. The subcellular destinations of APC proteins. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 328–338.
Bouma, G., Burns, S.O., Thrasher, A.J., 2009. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. Immunobiology 214, 778–790.
Brand, A.H., Manoukian, A.S., Perrimon, N., 1994. Ectopic expression in Drosophila. Methods Cell Biol. 44, 635–654.
Ghiglione, C., Devergne, O., Cerezo, D., Noselli, S., 2008. Drosophila RalA is essential for the maintenance of Jak/Stat signalling in ovarian follicles. EMBO Rep. 9, 676–682.
Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballes, F., Medioni, C., Cerezo, D., Noselli, S., 2002. The Drosophila cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. Development 129, 5437–5447.
Halbleib, J.M., Nelson, W.J., 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes Dev. 20, 3199–3214.
Han, D.D., Stein, D., Stevens, L.M., 2000. Investigating the function of follicular subpopulations during Drosophila oogenesis through hormone-dependent enhancer-targeted cell ablation. Development 127, 573–583.

Harris, E.S., Nelson, W.J., 2010. Adenomatous polyposis coli regulates endothelial cell migration independent of roles in beta-catenin signaling and cell-cell adhesion. Mol. Biol. Cell 21, 2611–2623.
Hayashi, S., Rubinfeld, B., Souza, B., Polakis, P., Wieschaus, E., Levine, A.J., 1997. A Drosophila homolog of the tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli down-regulates beta-catenin but its zygotic expression is not essential for the regulation of Armadillo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 242–247.
Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A., Takeichi, M., 1987. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. J. Cell Biol. 105, 2501–2510.
Hulsken, J., Behrens, J., Birchmeier, W., 1994a. Tumor-suppressor gene products in cell contacts: the cadherin-APC-armadillo connection. Curr. Opin. Cell Biol. 6, 711–716.
Hulsken, J., Birchmeier, W., Behrens, J., 1994b. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J. Cell Biol. 127, 2061–2069.
Kim, L., Kimmel, A.R., 2000. GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 508–514.
Klingelhofer, J., Troyanovsky, R.B., Laur, O.Y., Troyanovsky, S., 2003. Exchange of catenins in cadherin-catenin complex. Oncogene 22, 1181–1188.
Kroboth, K., Newton, I.P., Kita, K., Dikovskaya, D., Zumbrunn, J., Waterman-Storer, C.M., Nathke, I.S., 2007. Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. Mol. Biol. Cell 18, 910–918.
Lee, T., Luo, L., 2001. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. Trends Neurosci. 24, 251–254.
Loureiro, J.J., Akong, K., Cayirlioglu, P., Baltus, A.E., DiAntonio, A., Peifer, M., 2001. Activated armadillo/beta-catenin does not play a general role in cell migration and process extension in Drosophila. Dev. Biol. 235, 33–44.
Manseau, L., Baradaran, A., Brower, D., Budhu, A., Elefant, F., Phan, H., Philp, A.V., Yang, M., Glover, D., Kaiser, K., Palter, K., Selleck, S., 1997. GAL4 enhancer traps expressed in the embryo, larval brain, imaginal discs, and ovary of Drosophila. Dev. Dyn. 209, 310–322.
Marshall, T.W., Lloyd, I.E., Delalande, J.M., Nathke, I., Rosenblatt, J., 2011. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli controls the direction in which a cell extrudes from an epithelium. Mol. Biol. Cell 22, 3962–3970.
McCartney, B.M., Price, M.H., Webb, R.L., Hayden, M.A., Holot, L.M., Zhou, M., Bejsovec, A., Peifer, M., 2006. Testing hypotheses for the functions of APC family proteins using null and truncation alleles in Drosophila. Development 133, 2407–2418.
McDonald, J.A., Pinheiro, E.M., Kadlec, L., Schupbach, T., Montell, D.J., 2006. Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. Dev. Biol. 296, 94–103.
McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., Davis, R.L., 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila. Science 302, 1765–1768.
Montell, D.J., 2006. The social lives of migrating cells in Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev. 16, 374–383.
Montell, D.J., Rorth, P., Spradling, A.C., 1992. slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes Drosophila C/EBP. Cell 71, 51–62.
Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., Polakis, P., 1995. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3046–3050.
Nagafuchi, A., Ishihara, S., Tsukita, S., 1994. The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. J. Cell Biol. 127, 235–245.
Niewiadomska, P., Godt, D., Tepass, U., 1999. DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis. J. Cell Biol. 144, 533–547.
Oda, H., Uemura, T., Takeichi, M., 1997. Phenotypic analysis of null mutants for DE-cadherin and Armadillo in Drosophila ovaries reveals distinct aspects of their functions in cell adhesion and cytoskeletal organization. Genes Cells 2, 29–40.
Pacquelet, A., Lin, L., Rorth, P., 2003. Binding site for p120/delta-catenin is not required for Drosophila E-cadherin function *in vivo*. J. Cell Biol. 160, 313–319.
Pacquelet, A., Rorth, P., 2005. Regulatory mechanisms required for DE-cadherin function in cell migration and other types of adhesion. J. Cell Biol. 170, 803–812.
Pai, L.M., Orsulic, S., Bejsovec, A., Peifer, M., 1997. Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in Drosophila. Development 124, 2255–2266.
Peifer, M., 1993. The product of the Drosophila segment polarity gene armadillo is part of a multi-protein complex resembling the vertebrate adherens junction. J. Cell Sci. 105 (Pt 4), 993–1000.
Peifer, M., Rauskolb, C., Williams, M., Riggleman, B., Wieschaus, E., 1991. The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. Development 111, 1029–1043.
Pinheiro, E.M., Montell, D.J., 2004. Requirement for Par-6 and Bazooka in Drosophila border cell migration. Development 131, 5243–5251.
Polakis, P., 1997. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochim. Biophys. Acta 1332, F127–147.
Prasad, M., Montell, D.J., 2007. Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. Dev. Cell 12, 997–1005.
Ribeiro, C., Petit, V., Affolter, M., 2003. Signaling systems, guided cell migration, and organogenesis: insights from genetic studies in Drosophila. Dev. Biol. 260, 1–8.
Ribeiro, P.S., Josue, F., Wepf, A., Wehr, M.C., Rinner, O., Kelly, G., Tapon, N., Gstaiger, M., 2010. Combined functional genomic and proteomic approaches identify a PP2A complex as a negative regulator of Hippo signaling. Mol. Cell 39, 521–534.
Rorth, P., 2002. Initiating and guiding migration: lessons from border cells. Trends Cell Biol. 12, 325–331.
Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., Polakis, P., 1996. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. Science 272, 1023–1026.
Spradling, A.C., 1993. Germline cysts: communes that work. Cell 72, 649–651.
Starz-Gaiano, M., Montell, D.J., 2004. Genes that drive invasion and migration in Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev. 14, 86–91.
Takacs, C.M., Baird, J.R., Hughes, E.G., Kent, S.S., Benchabane, H., Paik, R., Ahmed, Y., 2008. Dual positive and negative regulation of wingless signaling by adenomatous polyposis coli. Science 319, 333–336.
Van de Bor, V., Zimniak, G., Cerezo, D., Schaub, S., Noselli, S., 2011. Asymmetric localisation of cytokine mRNA is essential for JAK/STAT activation during cell invasiveness. Development 138, 1383–1393.
van Es, J.H., Giles, R.H., Clevers, H.C., 2001. The many faces of the tumor suppressor gene APC. Exp Cell Res 264, 126–134.
Willert, K., Nusse, R., 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. Curr. Opin. Genet. Dev. 8, 95–102.
Xu, T., Rubin, G.M., 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. Development 117, 1223–1237.
Zhou, M.N., Kunttas-Tatli, E., Zimmerman, S., Zhouzheng, F., McCartney, B.M., 2011. Cortical localization of APC2 plays a role in actin organization but not in Wnt signaling in Drosophila. J. Cell Sci. 124, 1589–1600.

Annexe 2

The *Drosophila* large Maf factor Traffic Jam is an essential factor controlling follicle cell growth and differentiation

The *Drosophila* large Maf factor Traffic Jam is an essential factor controlling follicle cell growth and differentiation

Christian Ghiglione [1, 3], Patrick Jouandin [1], Julie Soltys, Daphné Chobert, Delphine Cérézo [1], Fabienne De Graeve [1], Ryu Ueda [2], and Stéphane Noselli [1, 3]

[1] Institut de Biologie Valrose, Université de Nice Sophia-Antipolis, CNRS 7277/Inserm 1091, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France

[2] Genetic Strains Research Center, National Institute of Genetics, Mishima-shi, Japan

[3] Correspondence should be addressed to C.G. and S.N. (e-mail: ghiglion@unice.fr; noselli@unice.fr)

Running title: Traffic Jam controls follicle cell differentiation

SUMMARY

During *Drosophila* oogenesis, several important processes including proliferation, differentiation and migration, are finely coordinated to allow the maturation of the egg chambers. The different stages of egg chamber development are controlled by specific, mostly independent pathways including Notch, Jak/Stat, EGF and FGF/PVR. Here, we identify the large Maf factor *traffic jam* (*tj*) as an essential gene required in follicle cells for a number of key processes underlying egg chamber development. *tj* mutations block polar cell differentiation, border cell migration as well as anterior-posterior polarization of the oocyte. In addition, we show that *tj* controls signalling downstream of Notch to regulate the entry of follicle cells into the Mitotic-to-Endocycle switch. Altogether, our results indicate that *tj* is an early differentiation factor controlling major aspects of egg chamber development and morphogenesis.

Key words: Traffic Jam, Cell Differentiation, Follicle Cells, Oogenesis, *Drosophila melanogaster*

INTRODUCTION

The *Drosophila* follicular epithelium provides an excellent model system to study temporal regulation of cell proliferation, differentiation and cell migration. Egg chambers are made of germline cells (15 nurse cells and 1 oocyte) surrounded by epithelial somatic follicle cells (FC) undergoing mitotic divisions up to stage 6. The FC then undergo a marked switch of cell-cycle programs from mitotic to endoreplication cycles (M/E switch) during stages 7-10A, in which cells duplicate their genomic DNA without cell division (Deng et al., 2001; Lopez-Schier and St Johnston, 2001). The M/E switch is triggered by the Notch signaling pathway, an evolutionary conserved cascade involved in many aspects of oogenesis including polar cell (PC) specification, FC proliferation and differentiation, border cell migration and establishment of egg chamber polarity (reviewed by Xu and Gridley, 2012).

During early stages, two pairs of PC, which are specialized FC, are specified at each pole of the egg chamber and have been shown to be crucial for its patterning (Grammont and Irvine, 2002; Xi et al., 2003). PC secrete the Unpaired ligand whose gradient of concentration activates the Jak/Stat cascade in neighbouring FC (Devergne et al., 2007; Van de Bor et al., 2011). Anteriorly, this leads to the recruitment of approximately six outer border cells (oBC) that will surround the two PC to form the Border Cell (BC) cluster. At stage 9, this cluster will delaminate from the FC and become migratory (reviewed by Rorth, 2002 and Montell, 2003).

We identified the large Maf factor Traffic Jam (TJ) as a novel factor essential for BC formation and migration, FC differentiation and mitosis. We show that *tj* is required in PC, for oBC recruitment, terminal FC differentiation and anterior-posterior polarization of the oocyte. In addition to its role in BC, *tj* is required for the M/E switch since *tj* mutant main body FC are maintained in an immature state and continue proliferating without further differentiation. This phenotype is shown to be due to misregulation of Notch target genes Hnt and Cut.

Altogether, our data reveal TJ as a major factor involved in several key processes underlying egg chamber maturation and FC differentiation.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of *tj* as a novel gene controlling BC migration

To isolate new genes involved in BC migration, we undertook a genome-wide *in vivo* screen using UAS-RNAi lines from the National Institute of Genetics, Japan (see Materials and Methods; De Graeve et al., 2012). RNAi lines were individually crossed to a strain (*USG>*) carrying both *upd-Gal4* (*UPD>*) and *slbo-Gal4* (*SLBO>*) drivers, allowing expression of the *UAS-RNAi* constructs in both PC and oBC, respectively (Ghiglione et al., 2008). A *UAS-GFP* transgene is also present to visualize the BC (Fig.1A).

Among the candidates identified by this screen, the RNAi construct targeting the CG10034 gene showed strong BC migration defects. CG10034 encodes for Traffic Jam (TJ), the *Drosophila* orthologue of the atypic basic leucine zipper transcription factors c-Maf and mafB/Kreisler in vertebrates (Li et al., 2003). *USG>tj-RNAi* stage-10 egg chambers showed strong migration defects, with 96% of BC clusters not migrating or only partially (Fig.1B,M). To confirm that *tj-RNAi* silencing reflects a specific *tj* loss-of-function phenotype, we used the FLP/FRT system (Xu and Rubin, 1993) to generate mosaic clones mutant for tj^{Z4735}, an amorphic loss-of-function allele for *tj*. Consistently, mosaic BC clusters containing tj^{Z4735} mutant oBC also failed to migrate (Fig.1E), indicating that Tj is a novel gene involved in BC migration.

_tj_ is required in PC for oBC recruitment and terminal FC differentiation

Tj has been shown to be expressed throughout oogenesis in FC contacting germline cells (Li et al., 2003). We also found that TJ is expressed in a dynamic expression pattern both in oBC and PC (Fig.S1).

To precisely define the cells requiring *tj* function for BC migration, we analysed *SLBO>tj-RNAi* egg chambers and found moderate BC migration defects after *tj* silencing in oBC specifically (Fig.1C,M).

Silencing of *tj* in oBC solely led to weaker BC migration, suggesting a possible important function of *tj* in PC for this process. Interestingly, expressing *tj-RNAi* in PC specifically (*UPD>tj-RNAi*) strongly affected oBC recruitment and migration, similarly to what we observed using *USG>* (Fig.1D,M). Furthermore, we observed an absence of oBC recruitment and migration in mosaic egg chambers in which PC were mutant for tj^{Z4735} (Fig.1F).

PC are essential anteriorly for recruiting the oBC that assemble into a mature BC cluster, and posteriorly to allow posterior FC differentiation. PC secrete a gradient

of Unpaired (Upd) ligand activating Jak/Stat signaling and differentiation of terminal FC (Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002; Ghiglione et al., 2002; McGregor et al., 2002). We showed that *UPD>tj-RNAi* egg chambers had a strongly reduced activation of the Jak/Stat pathway (Bach et al., 2007), as monitored by the *10xStatGFP* reporter line (Fig.1G,H). In addition, *UPD>tj-RNAi* egg chambers showed reduced expression of the Upd protein (Fig.1I,J).

After their specification, posterior FC signal back to the oocyte for anterior-posterior polarization (Xi et al., 2003). When polarity is normal, the Staufen protein forms a posterior crescent in the oocyte (Fig.1K). Strikingly, in *UPD>tj-RNAi* egg chambers, Staufen is mislocalized and found more centrally (Fig.1L), indicating anterior-posterior polarization defects.

tj controls the mitotic-to-endocycle switch

FC divide mitotically from stage 2 to stage 6, and then switch from the mitotic cycle to the endocycle (M/E switch; Klusza and Deng, 2011). Interestingly, tj^{Z4735} mutant FC have smaller nuclei and show a reduced size as compared to their neighbouring wild-type cells (Figs 2A,4A), indicative of a failure in the M/E switch.

To confirm that tj^{Z4735} mutant FC are blocked in the mitotic cycle, we stained mosaic egg chambers for the mitotic markers Phosphorylated Histone H3 (PH3), Cyclin B and String-lacZ. Although in wild-type egg chambers these three markers are only detected up to stage 6, they were still present after stage 6 in tj^{Z4735} mutant clones (Fig.2B-D).

Hedgehog (Hh) signaling is involved in FC proliferation during mitotic cycle and is downregulated in cells entering the endocycle (Zhang and Kalderon, 2000). We analysed the temporal pattern of Hh signaling by looking at the expression of Patched-lacZ, a Hh activity reporter, and Ci-155, the Hh nuclear effector. After stage 6, tj^{Z4735} mutant FC showed higher levels of both Patched-lacZ and Ci-155, compared to their wild-type counterpart (Fig.2E,F), suggesting that TJ controls proliferation and is required to downregulate Hh signaling in FC during the M/E switch.

tj controls signaling downstream of Notch

At stage 6, germline cells express the Delta ligand which activates Notch signaling in FC. This activation leads to the downregulation of Hh signaling by the

transcription factor Hnt, which in turn represses *cut* expression promoting the M/E switch (Lopez-Schier and St Johnston, 2001; Deng et al., 2001; Sun and Deng, 2005 and 2007).

To determine whether the M/E switch phenotype of tj^{Z4735} mutant cells is a consequence of disrupted Notch signaling, we stained mosaic egg chambers with antibodies against the Notch receptor which localizes to the apical side of FC. In control egg chambers, Notch staining is decreased at mid-oogenesis following its activation by Delta, but this decrease is delayed in tj^{Z4735} mutant cells (Fig.3A,B). We then tested a possible modulation of Notch activity by looking at the expression of the Gbe-Su(H)-lacZ, a direct Notch reporter, but we did not find a reduction of this reporter in tj^{Z4735} mutant FC as compared to the adjacent wild-type FC (Fig.3C).

Next, we stained tj^{Z4735} mosaic egg chambers with antibodies specific for Hnt and Cut. Hnt, a target of Notch pathway, is upregulated at stages 6–7 in the entire follicle epithelium (Sun and Deng, 2007). In tj^{Z4735} mutant FC, Hnt expression was not detected during mid-oogenesis (Fig.3D). Furthermore, in tj^{Z4735} mutant FC, Cut, whose expression is repressed in all FC through the activity of Hnt (Sun and Deng, 2005 and 2007), was maintained during mid-oogenesis (Fig.3E).

During the M/E switch, Cut downregulation is required for upregulation of Fzr at around stage 6/7, which contributes to the degradation of mitotic cyclins (Schaeffer et al., 2004; Sun and Deng, 2005). In tj^{Z4735} mutant FC, Fzr-lacZ expression was not detected during mid-oogenesis (Fig.3F).

Altogether, these data indicate that TJ is essential for the M/E switch in FC, through the regulation of the expression of Notch downstream target genes Hnt and Cut.

tj is required for FC and PC differentiation

Downregulation of Cut is necessary for FC differentiation (Sun and Deng, 2005), which is marked by reduced expression of Fas III and Eya during mid-oogenesis. In tj^{Z4735} mutant main body FC, we found high levels of both Fas III and Eya after stage 6, but not in the adjacent wild-type cells (Fig.4A,B).

We further analysed the role of *tj* in PC by staining egg chambers for PC markers. In wild-type egg chambers, Fas III is detected in all FC until stages 6-7, and afterwards only in PC (Fig.4C). In *UPD>tj-RNAi* egg chambers, the Fas III staining was strongly reduced (Fig.4D). The use of the A101-lacZ enhancer trap line, a PC-

specific marker, confirmed this result since its expression was abolished in *tj*^{Z4735} mutant PC (Fig.4E,F).

We therefore conclude that *tj* is required for downregulation of early cell-fate markers, therefore promoting terminal differentiation.

CONCLUSION

The Drosophila egg chamber represents a good model system to study how signaling pathways work in concert to coordinate tissue growth and differentiation. Previous work has identified the conserved Notch, Jak/Stat and EGF/FGF/PVR pathways to control FC proliferation, border cell recruitment and guided migration, respectively.

In this study, we identified the Tj factor as an essential upstream element required for all these processes (Fig. 4G). FC mutant for *tj* do not undergo terminal differentiation, leading to arrested oogenesis with egg chambers remaining in an immature stage. In particular, *tj* plays a critical role in PC differentiation, which is key for BC formation at the anterior pole, as well as for proper anterior-posterior polarization of the oocyte, determined by posterior PC. Furthermore, *tj* is required for the M/E switch to control growth of the main body FC. Altogether, these results show that *tj* mutations mimic the phenotype of Notch loss-of-function. Our data show that *tj* mutations block Notch activity selectively, affecting some but not all target gene expression, suggesting that TJ acts downstream of or in parallel to the Notch pathway (Fig. 4G).

tj had previously been implicated in the control of the expression of adhesion molecules in FC to facilitate their interactions with germline cells (Li et al., 2003). Our study shows that TJ has a more general role in the maturation of FC for proper gonad development, acting at several stages upstream of cell differentiation pathways.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *tj* is required for oBC recruitment and migration, terminal FC differentiation and oocyte polarization

(A) Control *USG*>+ egg chamber in which BC (white arrow) have reached the anterior region of the oocyte. *USG>tj-RNAi* (B) and *UPD>tj-RNAi* (D) egg chambers showed strong migration defects and reduction of oBC recruitment (M), the non-motile PC (white arrows) remaining at the anterior tip of the egg chambers. *SLBO>tj-RNAi* egg chambers showed moderate migration defects and normal oBC recruitment (C and M).

(E) Mosaic cluster with tj^{Z4735} mutant oBC remaining attached to the anterior tip of the egg chamber by the mutant cells, A101-lacZ indicating PC.

(F) Mosaic tj^{Z4735} egg chambers with mutant anterior FC, including PC. The BC cluster is not formed.

(G) The *10xstat-GFP* reporter line is strongly expressed in anterior and posterior terminal FC. *10xstat-GFP* was strongly reduced in *UPD>tj-RNAi* egg chambers (H).

(I) The Upd ligand formed a gradient centered at the pole in control egg chambers.

(J) Upd expression and gradient distribution are strongly reduced in *UPD>tj-RNAi* egg chambers.

(K) Staufen is localized in a crescent at the posterior pole of the oocyte in control egg chambers. (L) In *UPD>tj-RNAi* egg chambers, Staufen is mislocalized in the oocyte.

(M) Table showing BC migration index (absence, partial or normal migration) and mean of oBC recruited (right column). 100 stage-10 egg chambers were analysed for each indicated genotype.

tj^{Z4735} mutant FC were identified by the absence of GFP, the borders between mutant clones and neighbouring wild-type cells are marked by dotted lines (E and F). *tj-RNAi* expressing cells were identifiable by the presence of GFP (A to D).

Figure 2: *tj* is required for the Mitotic-to-Endocycle switch

(A) tj^{Z4735} mutant FC show smaller nuclei compared to neighbouring wild-type cells. PH3 (B), Cyclin B (C), String-lacZ (D), Patched-lacZ (E) and Ci-155 (F) were observed in tj^{Z4735} mutant FC, after stage 6, but not in neighbouring wild-type cells, indicating continued mitotic division.

Figure 3: *tj* controls the expression of the downstream effectors of Notch, Hnt and Cut

The Notch receptor, which localizes to the apical side of FC, is upregulated in tj^{Z4735} mutant FC as revealed by staining with anti-NECD (A) and anti-NICD (B). The Notch reporter Gbe-Su(H)-lacZ is expressed in both, wild-type and tj^{Z4735} mutant FC (C). We observed an absence of Hnt (D) and a maintenance of Cut (E) expression in tj^{Z4735} mutant FC, after stage 6. In addition, Fzr-lacZ is not expressed in tj^{Z4735} mutant FC (F).

Figure 4: *tj* is involved in downregulation of immature-cell-fate markers to control cell differentiation

High levels of Fas III (A) and Eya (B) were detected in tj^{Z4735} mutant FC, after stage 6, but not in adjacent wild-type FC.

Details of posterior wild-type egg chambers showing Fas III (C) and A101-lacZ (E) expression in PC. In *UPD> tj-RNAi* egg chambers, the expression of these two PC-markers was strongly reduced or abolished (D and F).

(G) A model of TJ functions in FC

Supplemental Figure 1: expression pattern of TJ during oogenesis

Wild-type egg chambers at stage 9 (A) or 10 (B) of oogenesis, were stained with anti-TJ. White boxes showing BC (A' and B') are enlarged in (A'' and B''). Before and during delamination, similar amounts of TJ are found in BC and adjacent FC (A). However, when BC start to migrate, TJ levels decrease in BC as compared to other FC and this reduction is more prominent at the end of the migration (B).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Drosophila stocks and genetics

Drosophila culture and crosses were performed at 25°C following standard procedures, except where indicated.

The following *Drosophila* stocks have been used: *tj-RNAi* (NIG-Fly #10034 R2 III), tj^{z4735} *FRT40A* (Li et al., 2003), *slbo-Gal4* (Rorth et al., 1998), *upd-Gal4* (a gift from D. Montell), *USG-Gal4* (Ghiglione et al., 2008), *10xstat-GFP* (Bach et al., 2007), *fzr-lacZ* (Schaeffer et al., 2004), *A101-lacZ* (Bier et al., 1989), *Gbe-Su(H)-lacZ* (Furriols and Bray, 2001), *patched-lacZ* (Zhang et Kalderon, 2000), *string-lacZ* (Lehman et al., 1999).

The tj^{z4735} mutant FC clones were generated by mitotic recombination using the FLP/FRT technique (Xu and Rubin., 1993), after crossing tj^{z4735} *FRT40A* flies with *hsFLP; FRT40A UbiGFP* flies. Females with the *hsFLP/+;* tj^{z4735} *FRT40A* / *FRT40A UbiGFP* genotype were heat-shocked for 1hr at 37°C, twice a day for 3 days, and dissected 2 days after the last heat-shock.

Mosaic mutant clones were marked by the absence of GFP.

The w^{1118} flies were used as control.

In vivo UAS-RNAi screen

This screen was performed by crossing the NIG-Fly *UAS-RNAi* transgenic fly collection with the *USG-Gal4* driver (a combination of *upd-Gal4* and *slbo-Gal4*, which allows to target the expression of UAS constructs in PC and oBC, respectively, together with a *UAS-GFP* transgene allowing to visualize the BC; De Graeve et al., 2012).

USG>UAS-RNAi females were dissected after two days of incubation at 29°C and candidates *UAS-RNAi* lines were selected when abnormal BC migration was observed in more than 20% of stage-10 egg chambers.

Immunofluorescence staining and microscopy

Ovary dissection, fixation, and staining with antibodies, phalloidin, and Hoechst were performed as described previously (Ghiglione et al., 2002). The primary antibodies used were: guinea pig anti-TJ (1:3000; Li et al., 2003), rabbit anti-β-Galactosidase (1:1000, Cappel), rabbit anti-Upd (1:200; Harrisson et al., 1998), rabbit anti-Staufen (1:5000; a gift from D. St Johnston), rabbit anti-PH3 (1:500; Upstate), mouse anti-

FasIII (1:100, 7G10,DSHB), mouse anti-Cut (1:100, 2B10, DSHB), mouse anti-Hnt (1:100, 1G9, DSHB), mouse anti-Notch intracellular (1:100, C17.9C6, DSHB), mouse anti-Notch extracellular (1:100, C458-2H, DSHB), mouse anti-CyclinB (1:100, F2F4, DSHB), mouse anti-Eya (1:100, 10H6, DSHB), rat anti-Ci-155 (1:100, 2A1, DSHB). Phalloidin conjugates and Hoechst (1:1000, Sigma) were used to outline cells and to label DNA, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Godt, M. Grammont, D. Harrison, D. Montell, P. Rorth, L. Ruel, T. Schupbach, D. St Johnston, the Developmental Studies Hybridoma Bank and the Bloomington *Drosophila* Stock Center, the NIG-Fly and VDRC *Drosophila* RNAi Centers for providing *Drosophila* stocks and/or reagents. We also thank F. Bondi, G. Gozzerino, A. Samuel and M. Pierret for their work on the *UAS-RNAi* screen, and all members of our laboratory for fruitful discussions.
S.N. was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence nationale pour la Recherche (ANR), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Fondation pour la Recherche Médicale and Labex Signalife.

REFERENCES

Bach, E.A., Ekas, L.A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M.S., Lee, H, Perrimon, N., and Baeg G.H. (2007). GFP reporters detect the activation of the Drosophila JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr Patterns* **7**:323-31.

Beccari, S., Teixeira, L., and Rørth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during Drosophila oogenesis. *Mech Dev.* **111**:115-23.

Bier, E. et al. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes and Dev.* **3**: 1273-1287.

De Graeve, F.M., Van de Bor, V., Ghiglione, C., Cerezo, D., Jouandin, P., Ueda, R., Shashidhara, L.S., and Noselli, S. (2012). Drosophila apc regulates delamination of invasive epithelial clusters. *Dev Biol.* **368**:76-85.

Deng, W.M., Althauser, C., and Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in Drosophila follicle cells. *Development* **128**:4737-46.

Devergne, O., Ghiglione, C., and Noselli, S. (2007). The endocytic control of JAK/STAT signalling in Drosophila. *J Cell Sci.* **120**:3457-64.

Furriols, M. and Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr. Biol.* **11**: 60-64.

Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballès, F., Médioni, C., Cerezo, D., and Noselli, S. (2002). The Drosophila cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. *Development* **129**:5437-47.

Ghiglione, C., Devergne, O., Cerezo, D., and Noselli, S. (2008). Drosophila RalA is essential for the maintenance of Jak/Stat signalling in ovarian follicles. *EMBO Rep.* **7**:676-82.

Grammont, M., and Irvine, K.D. (2002). Organizer activity of the polar cells during Drosophila oogenesis. *Development* **129**:5131-40.

Grammont, M., Irvine, K.D. (2001). fringe and Notch specify polar cell fate during Drosophila oogenesis. *Development* **128**:2243-53.

Harrison, D.A., McCoon, P.E., Binari, R., Gilman, M., and Perrimon, N. (1998). Drosophila unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev.* **12**:3252-63.

Klusza, S., and Deng, W.M. (2011). At the crossroads of differentiation and proliferation: precise control of cell-cycle changes by multiple signaling pathways in Drosophila follicle cells. *Bioessays* **33**:124-34.

Lehman, D.A., Patterson, B., Johnston, L.A., Balzer, T., Britton, J.S., Saint, R., Edgar, B.A. (1999). Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string/Cdc25. *Development* **126**:1793-803.

Li, M.A., Alls, J.D., Avancini, R.M., Koo, K., and Godt, D. (2003). The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in Drosophila. *Nat Cell Biol.* **5**:994-1000.

López-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis. *Genes Dev.* **15**:1393-405.

McGregor, J.R., Xi, R., and Harrison, D.A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in Drosophila. *Development* **129**:705-17.

Montell, D.J. (2003). Border-cell migration: the race is on. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**:13-24.

Rørth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G.M., Weigmann, K., Milán, M., Benes, V., Ansorge, W., and Cohen, S.M. (1998). Systematic gain-of-function genetics in Drosophila. *Development* **125**:1049-57.

Rorth, P. (2002). Initiating and guiding migration: lessons from border cells. *Trends Cell Biol* **12**: 325-331.

Schaeffer, V., Althauser, C., Shcherbata, H.R., Deng, W.M., and Ruohola-Baker, H. (2004). Notch-dependent Fizzy-related/Hec1/Cdh1 expression is required for the mitotic-to-endocycle transition in Drosophila follicle cells. *Curr Biol.* **14**:630-6.

Silver, D.L., and Montell, D.J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. *Cell* **107**:831-41.

Sun, J., and Deng, W.M. (2005). Notch-dependent downregulation of the homeodomain gene cut is required for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in Drosophila follicle cells. *Development* **132**:4299-308.

Sun, J., and Deng, W.M. (2007). Hindsight mediates the role of Notch in suppressing Hedgehog signaling and cell proliferation. *Dev Cell.* **12**:431-42.

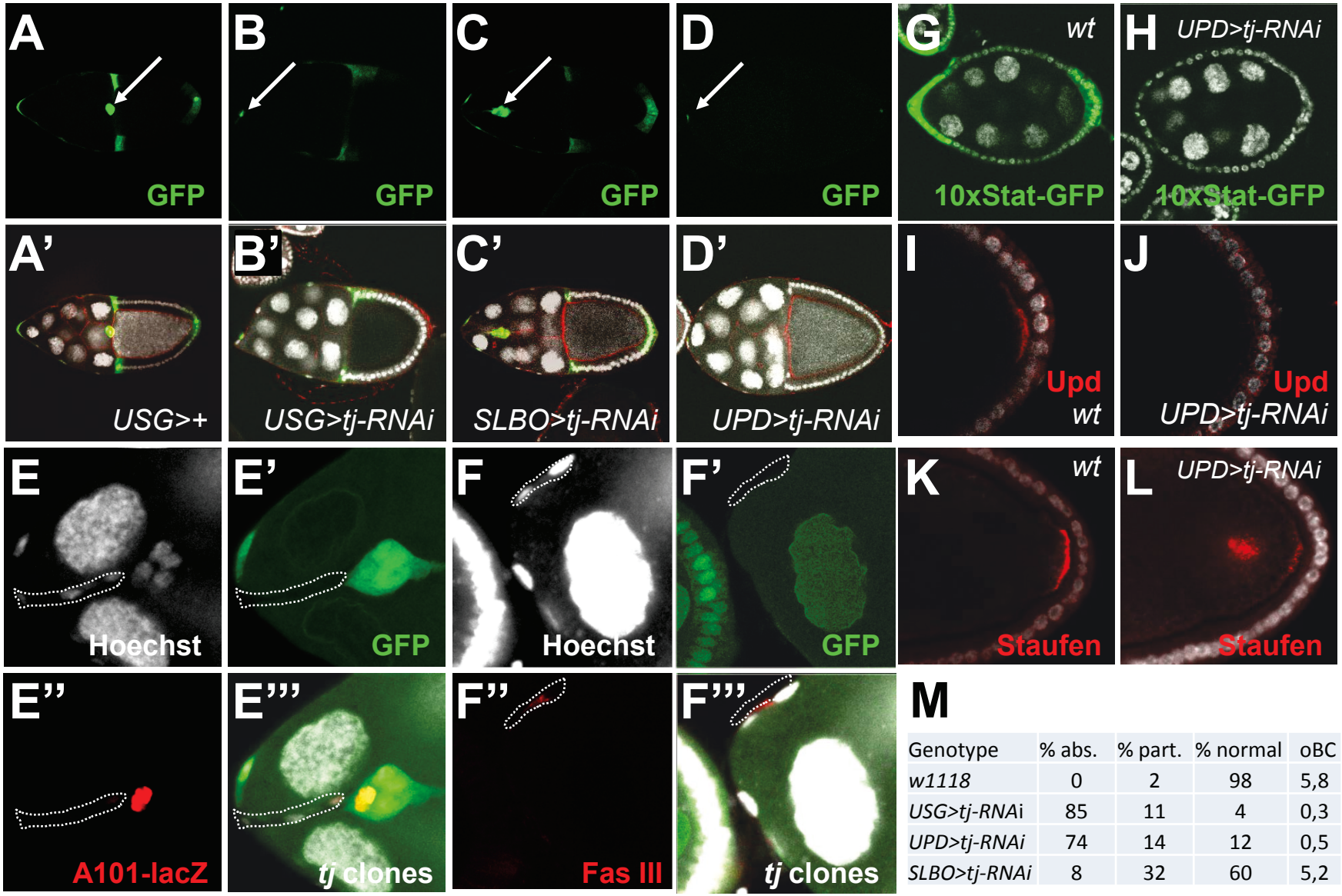
Van de Bor V, Zimniak G, Cérézo D, Schaub S, Noselli S. (2011). Asymmetric localisation of cytokine mRNA is essential for JAK/STAT activation during cell invasiveness. *Development* **138**:1383-93.

Xi, R., McGregor, J.R., and Harrison, D.A. (2003). A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium. *Dev Cell.* **4**:167-77.

Xu, J., and Gridley T. (2012). Notch Signaling during Oogenesis in Drosophila melanogaster. *Genet Res*: **2012**:648207.

Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**:1223-37.

Zhang, Y., and Kalderon, D. (2000). Regulation of cell proliferation and patterning in Drosophila oogenesis by Hedgehog signaling. *Development* **127**:2165-76.



M

Genotype	% abs.	% part.	% normal	oBC
w1118	0	2	98	5,8
USG>tj-RNAi	85	11	4	0,3
UPD>tj-RNAi	74	14	12	0,5
SLBO>tj-RNAi	8	32	60	5,2

Figure 1 (Ghiglione *et al.*)

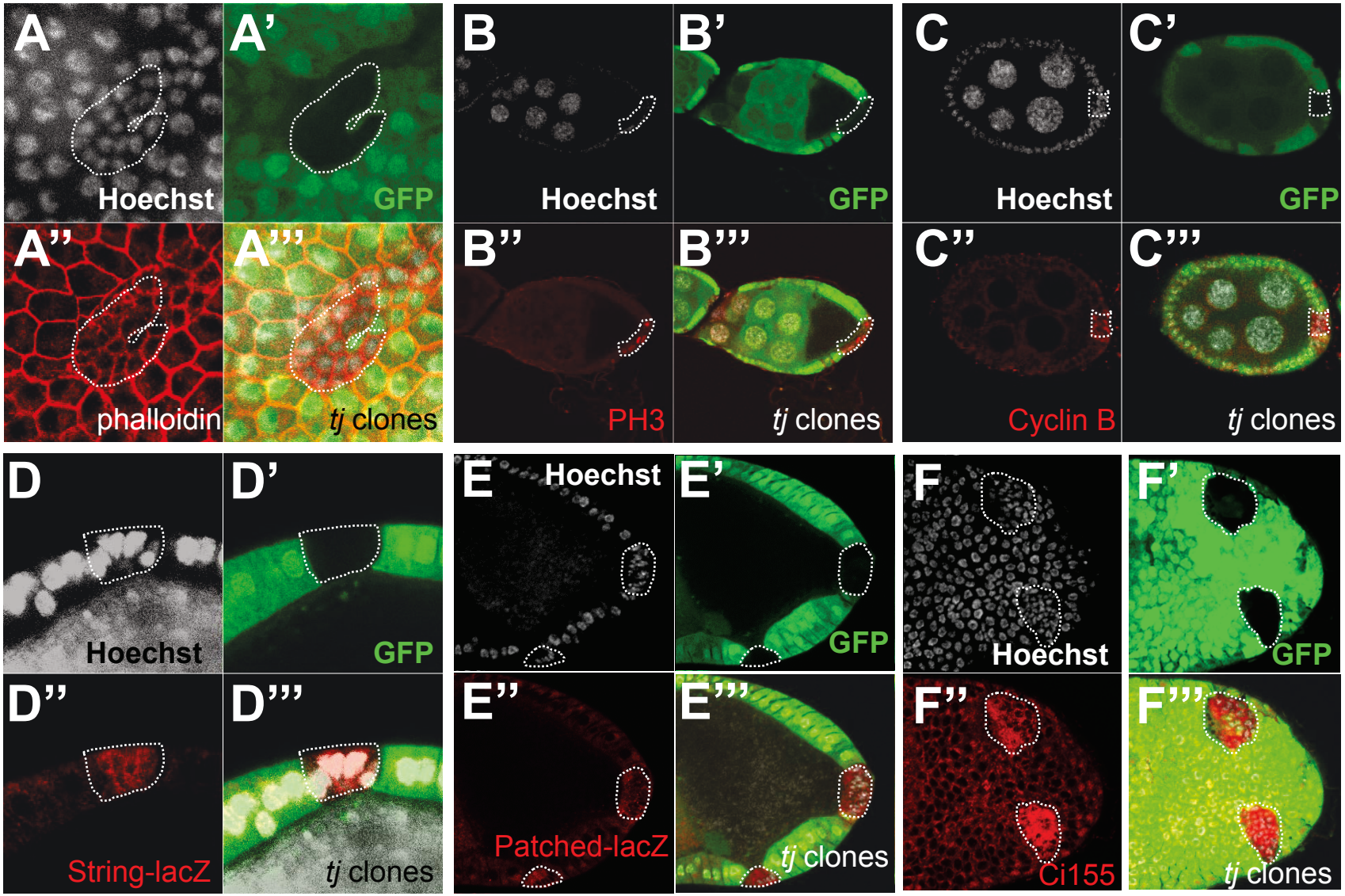


Figure 2 (Ghiglione *et al.*)

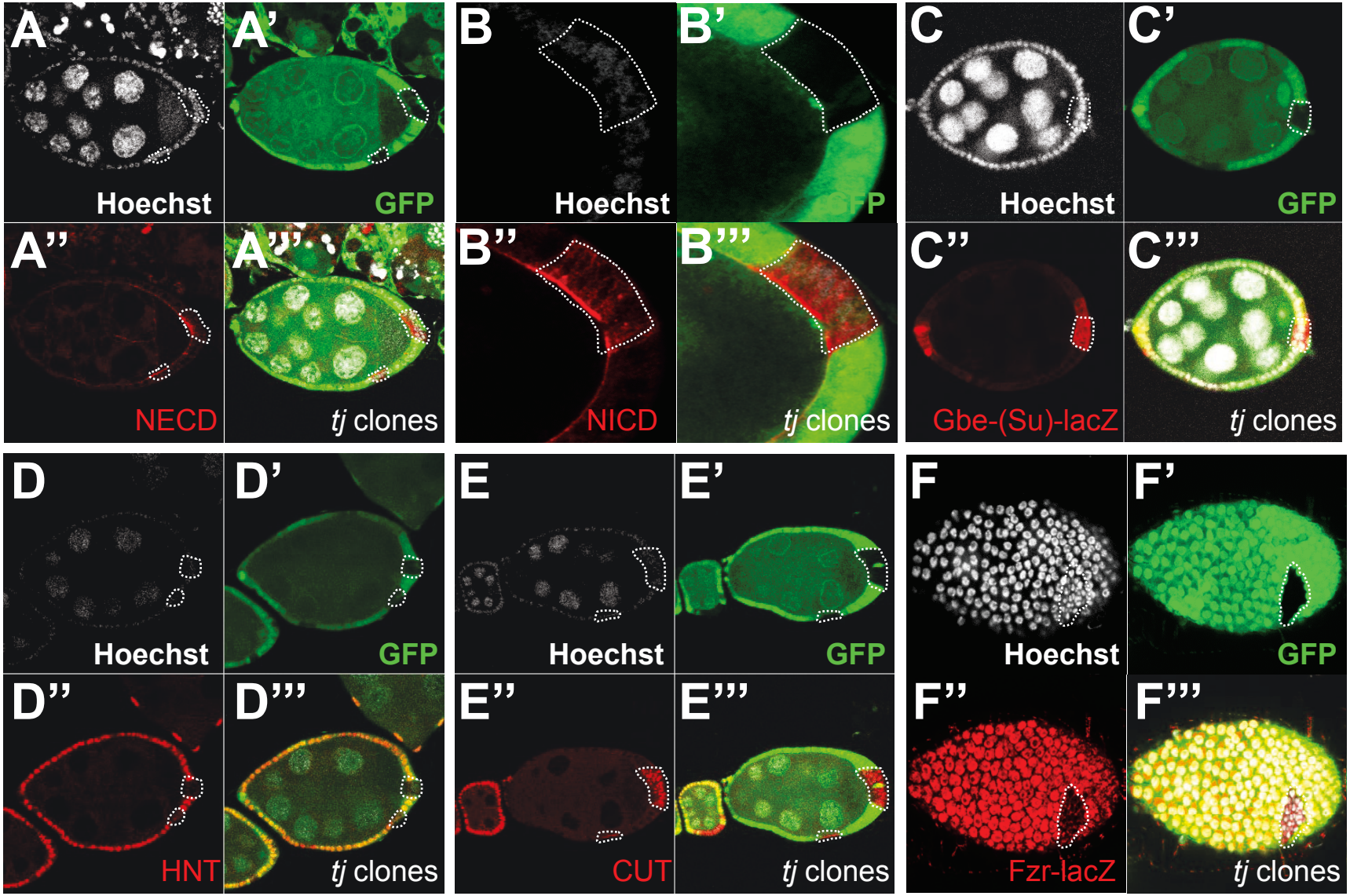
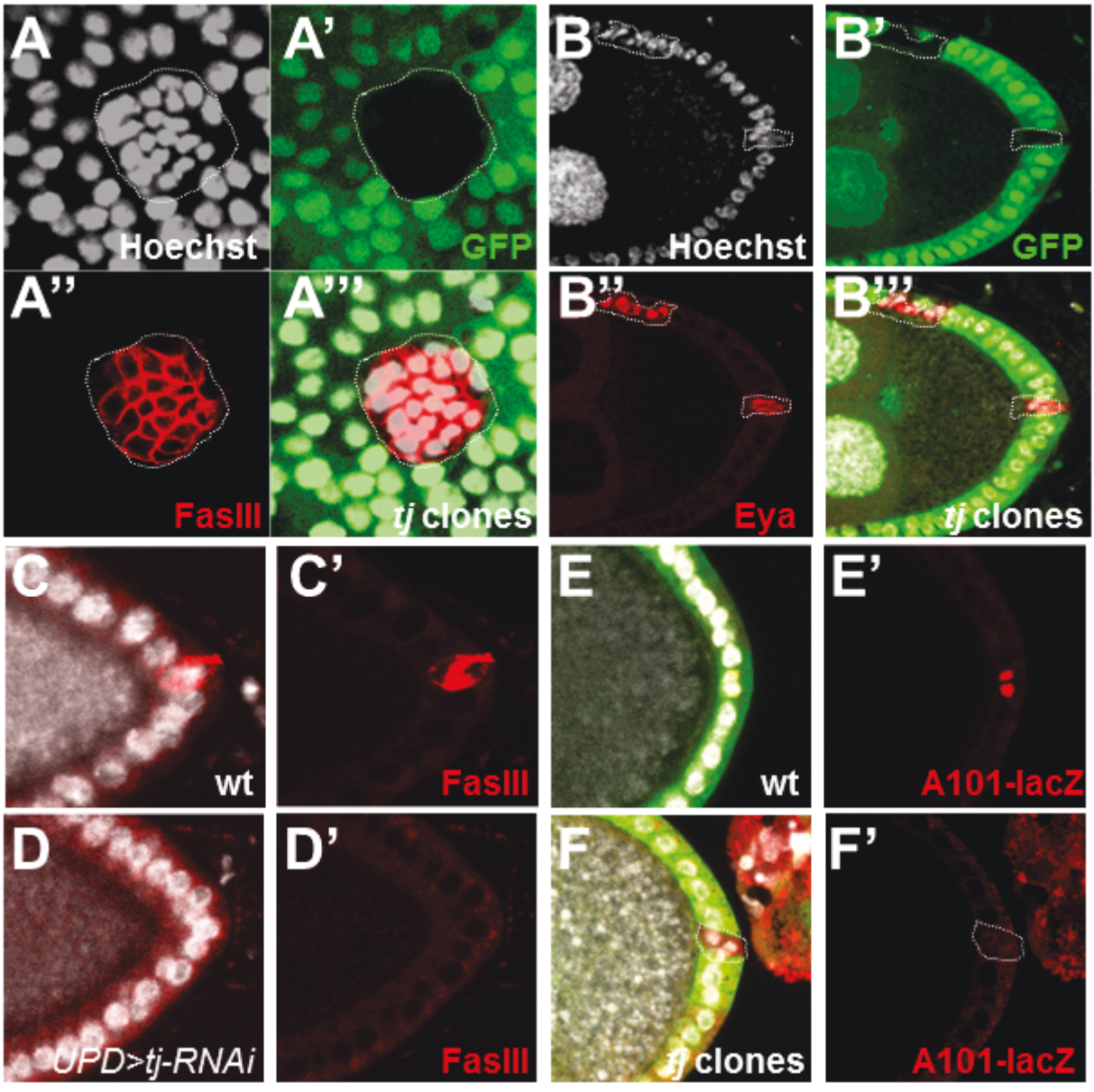


Figure 3 (Ghiglione *et al.*)



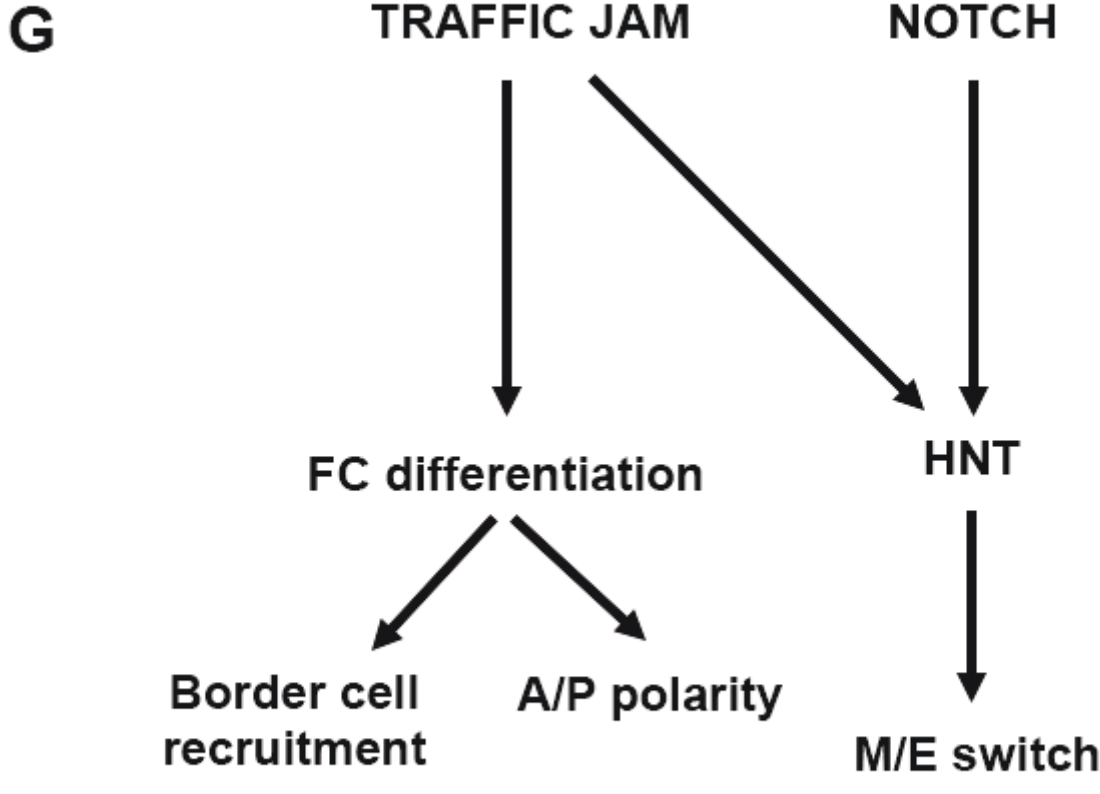


Figure 4 (Ghiglione *et al.*)

Résumés

Role of the Insulin signalling pathway in coupling oogenesis rate with nutritional cues in *Drosophila*.

Understanding how oogenesis is controlled upon nutrient challenge represents a key biological question to understand the balance between reproduction and adult fitness. In addition, exactly how ovarian follicles adapt to diet change to maintain their homeostasis remains poorly understood. Using *Drosophila* oogenesis as a model, we reveal the role of the Insulin pathway and FoxO in regulating the transition from Mitotic-to-Endocycle, a critical step controlling the entry of egg chambers into vitellogenesis.

Because vitellogenic stages are highly energy consuming, their formation has to be balanced with other physiological needs. We show that the M/E switch functions as a nutrient checkpoint under the control of the Insulin pathway, blocking the entry into vitellogenesis upon starvation and therefore protecting adults from energy loss. Starvation induces pausing of the M/E switch and involves a previously unknown crosstalk between FoxO, Cut and Notch, a fully reversible process ensuring rapid resuming of oogenesis upon re-feeding. This work reveals the M/E switch as a FoxO-dependent nutrient checkpoint integrating metabolic cues with reproduction and protecting tissues from starvation-induced damages.

In addition, we show that the Insulin pathway couples vitellogenic ovarian follicles development with the migration of a subset of epithelial cells, thus ensuring oocyte fertilization. We demonstrate that Insulin signaling regulates the formation of actin-rich cellular extensions in invasive cells, thus controlling their migration rate. During this process, FoxO represses *chickadee* expression, which encodes Profilin. Insulin signaling activity leads to the inhibition of FoxO and subsequent Profilin accumulation, which further allows actin polymerization, necessary for cell motility.

Altogether, data reveal a crucial role for the conserved Insulin signaling pathway in regulating ovarian follicles through somatic tissues, a process which is likely to share much in common with oogenesis in mammals.

Key words: *Drosophila*, oogenesis, Insulin signaling, Notch signaling, Nutrient checkpoint, cell migration.

Rôle de la voie de signalisation Insuline dans le couplage des informations nutritionnelles et développementales au cours de l'ovogenèse chez la drosophile

L'ovogenèse dépend largement de conditions environnementales fluctuantes, notamment la nutrition. La gestion des nutriments doit donc être finement régulée, de manière à maintenir un équilibre entre l'énergie dépensée pour le développement des follicules ovariens et la survie des organismes. En utilisant l'ovogenèse chez la drosophile comme modèle, j'ai montré que la voie de signalisation Insuline, au travers de FoxO, régule une transition du cycle cellulaire, mitose/ endocyle (M/E), une étape critique qui contrôle l'entrée des follicules ovariens en vitellogenèse.

Les stades vitellogéniques nécessitent une énergie considérable, et leur formation doit donc être ajustée en fonction d'autres besoins physiologiques. Mes travaux montrent que la transition M/E porte le rôle d'un point de contrôle nutritionnel, sous contrôle de la signalisation Insuline. La carence protéique induit un blocage de la transition M/E au travers d'une interaction entre FoxO, Cut et Notch, empêchant ainsi l'entrée en vitellogenèse et une perte d'énergie. Ce blocage reste réversible, autorisant la reprise de l'ovogenèse sous retour à une alimentation normale. Ces travaux montrent que la transition M/E est en fait un point de contrôle nutritionnel dépendant de FoxO, permettant de coupler des informations métaboliques et développementales afin de protéger les tissus des dommages liés à la carence.

D'autre part, j'ai montré que la signalisation Insuline contrôle le comportement invasif d'une cohorte de cellules d'origine épithéliale pendant la vitellogenèse, assurant ainsi la fertilité de l'ovocyte. IIS participe à la formation d'extensions cytoplasmiques riches en actine, indispensables à la migration de ces cellules. Lors de ce processus, la signalisation Insuline contrôle notamment l'expression de *chickadee*, qui code pour la Profiline, une protéine nécessaire pour la polymérisation de l'actine qui permet la motilité des cellules.

L'ensemble de ce travail permet de mieux comprendre comment l'homéostasie de l'ovogenèse est assurée en dépit de conditions de nutritions fluctuantes. Il met notamment en valeur le rôle des tissus somatiques, et propose différents niveaux d'intercommunication entre les voies de signalisation. Ces travaux posent les bases de l'étude de nouveaux aspects de l'ovogenèse, potentiellement conservés chez les mammifères.

Mots clés: drosophile, ovogenèse, signalisation Insuline, signalisation Notch, point de contrôle nutritionnel, migration cellulaire.