Etude de la fonction de Patj dans la régulation de la polarité épithéliale.

Clothilde Penalva

▶ **To cite this version:**

Clothilde Penalva. Etude de la fonction de Patj dans la régulation de la polarité épithéliale.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM25 . tel-01889245

HAL Id: tel-01889245

https://theses.hal.science/tel-01889245

Submitted on 5 Oct 2018

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 BLAISE PASCAL UNIVERSITÉ D'AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire du Développement

Clothilde Pénalva

Etude de la fonction de Patj dans la régulation de la polarité épithéliale

Soutenue publiquement le 19 Décembre 2014 devant le jury d'examen :

Président :	Vincent SAPIN
Rapporteurs :	André LE BIVIC François SCHWEISGUTH
Examinateur :	Muriel GRAMMONT
Membres :	Vincent MIROUSE

Laboratoire GReD, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, Clermont Université

RESUME
La polarité apico-basale des cellules épithéliales est requise pour le développement de l'épithélium, le maintien de son intégrité et sa fonction. Elle est définie par les relations dynamiques d'un réseau de protéines de polarité qui se localisent asymétriquement et s'excluent mutuellement pour déterminer les différents domaines corticaux. Le complexe Crumbs (Crb) est un déterminant clé du domaine apical, essentiel et suffisant pour sa définition. Patj, une protéine contenant un domaine L27 et 4 domaines PDZ, a été identifiée comme faisant partie biochimiquement du complexe Crb (via Stardust), mais sa fonction reste à préciser. Au cours de ma thèse j'ai analysé la fonction Patj chez la drosophile. La mutation *Patj* est létale et induit une perte de Crb de la membrane apicale dans l'épithélium folliculaire, mais pas dans l'embryon. La fonction de Patj est donc tissu spécifique. J'ai pu mettre en évidence que Patj régule positivement Crb et que les domaines PDZ1 ou PDZ4 associés au domaine L27 sont suffisants pour la fonction de Patj. J'ai de plus tenté de déterminer comment Patj régule Crb à l'échelle moléculaire. Tout d'abord, l'analyse fonctionnelle in vivo suggère que Patj régulerait la stabilité de Crb indirectement en favorisant le recrutement d'autres déterminants du domaine apical au sein du complexe. Ensuite, des approches biochimiques et génétiques ont permis de montrer qu'en plus d'interagir indirectement avec Crb, Patj interagit aussi directement via ces domaines PDZ1 et PDZ4. Ces données permettent de proposer un modèle mécanistique dans lequel Patj en liant à la fois Sdt et Crb formerait des dimères de Crb, qui en association avec sa dimèrisation extracellulaire déjà connue permettrait la formation d'oligomères de Crb à la membrane apicale. L'oligomérisation de Crb favoriserait son activité de déterminant apical. De plus, j'ai observé une redondance entre Patj et Lin-7, un autre membre du complexe Crb, dans la polarité apico-basale, une telle fonction pour Lin-7 n'ayant pas encore été reportée. Ainsi, mes travaux apportent de nouveaux éléments pour la compréhension de la polarité épithéliale.
Mot clés : Crumbs, épithélium, cellules folliculaires, polarité.

ABSTRACT
Apico-basal polarity is required for epithelium development, function and integrity. Polarization is defined by a network of polarity proteins that are localized asymmetrically and the dynamic interplay between them. Crb is a key determinant of the apical domain, necessary and sufficient for its identity. Patj, a protein containing a L27 domain and four PDZs domains, has been identified as a core component of the Crb complex, as it interacts with Crb through Sdt. But its function remains elusive. During my thesis I investigated Patj function in *Drosophila*. Patj mutation is lethal and induces a decrease of Crb from the apical domain in the follicular epithelium, but not in embryonic epithelium. Thus, Patj function is tissue-specific. Patj positively regulates Crb, and the PDZ1 or PDZ4 together with the L27 domain of Patj are sufficient for its function. Then, I focused on the molecular mechanism underlying Crb regulation. In vivo analysis suggests that Patj regulates Crb stability indirectly by modulating its ability to recruit apical proteins. Biochemical and genetics analyses allow showing that in addition of its indirect interaction through Sdt, Patj interacts directly with Crb through its PDZ1 and PDZ4. Extra-cellular dimerisation of Crb is involved in a feedback promoting its apical localization. Patj with Crb direct interaction could participate to this feedback via an intra-cellular dimerisation, allowing Crumbs oligomerisation at the apical membrane. In addition, I have seen that Patj is redundant with Lin-7, another core component of Crb complex, for apico-basal polarity. In conclusion my thesis work provides new clues for the understanding of epithelial polarity regulation.
Keys words : Crumbs, Epithelium, Follicular cells, polarity.

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre I : Introduction 1

I. Les épithéliums 3

I.1. Caractéristiques, fonctions et classification des épithéliums 3
I.2. Structure de la cellule épithéliale 5
I.2.1. L'adhésion et les jonctions 6
I.2.2. Le cytosquelette et le transport cellulaire 12
I.3. Le développement des épithéliums 16
I.3.1. Formation des épithéliums primaires 17
I.3.2. Formation des épithéliums secondaires 19
I.3.3. La morphogénèse épithéliale 21
I.4. Modèle d'étude : l'épithélium folliculaire de la drosophile 22
I.4.1. Structure des ovaires et ovarioles 23
I.4.2. Développement du cyste germinal 24
I.4.3. Différenciation et morphogénèse des cellules folliculaires 25

II. Les acteurs de la polarité 29

II.5. Les protéines PAR 30
II.5.4. Les protéines PAR polarisent l'embryon de *C.elegans* 30
II.5.5. La polarisation de l'ovocyte de la drosophile 32
II.6. Les protéines de polarité apicales 33
II.6.1. Crumbs : déterminant clé du domaine apical 33
II.6.2. Cdc42-PAR-6-aPKC 36
II.6.3. Bazooka 38
II.7. Les protéines de polarité latérales 40
II.7.1. Le module Scrib/Lgl/Dlg 41
II.7.2. Yurt et le groupe Cor/Nrx-IV/NaKATPase 43
II.7.3. PAR-1 44

III. Formation et maintien de la polarité apico-basale au cours du développement épithélial 45
III.1. Les antagonismes et la régulation positive apicale 46
III.1.1. Crb/aPKC versus Lgl 46
III.1.2. aPKC et Baz versus PAR-1 47
III.1.3. Crb/aPKC versus Yurt 47
III.1.4. Crb versus PI3K 48
III.1.5. Crb/Sdt/PAR-6/aPKC versus Baz 49
III.1.6. La phosphorylation de Crb par aPKC la régule positivement 50
III.2. Le réseau de polarité régule les jonctions et le cytosquelette lors de la morphogénèse 51
III.2.1. Formation de la zonula adherens et régulation des jonctions au cours de la gastrulation 51
III.2.2. Régulation du cytosquelette 53
III.3. Le réseau de polarité régule la croissance, la survie et la prolifération 54

IV. Le complexe Crumbs 57
IV.1. Les nombreuses fonctions de Crumbs 57
IV.1.3. Crumbs au cœur de la morphogénèse 58
IV.1.4. La régulation de la voie Hippo 60
IV.1.5. Régulation de la voie Notch 61
IV.2. Régulation et maintien de Crumbs 62
IV.3. Stardust : structure et fonction 65
IV.4. Lin-7 : structure et fonction 67
IV.5. Patj : structure et fonction 68
IV.5.1. Structure de Patj 68
IV.5.2. La fonction de PATJ dans les cellules mammifères 68
IV.5.3. La génétique autour de Patj : une succession d'erreurs. 69
IV.5.4. Objectifs de la thèse 72

Chapitre II : Résultats 73

I. Patj régule positivement le complexe Crb 73

II. Comment Patj régule Crb à l'échelle moléculaire ? 83
II.1. Recherche de(s) partenaire(s) du PDZ1 de Patj 83

II.2. Hypothèse de travail 85
II.2.1. Patj régule les jonctions d'adhérence et la Myosine II de façon dépendante de Crb 88
II.2.2. Patj régule t'elle le trafic de Crb ? 91
II.2.3. Interaction Directe Crb-Patj. 92
II.2.4. Test de sauvetage de la mutation *Patj* 94
II.2.5. Redondance Patj-Lin-7 96

Chapitre III : Discussion 98

I. Patj régule positivement le complexe Crumbs de façon tissu-spécifique 98

II. Patj, Crb et la morphogénèse épithéliale. 100
II.1. Régulation de la Myosine II. 100
II.2. Régulation des jonctions 101

III. Redondance Patj-Lin-7 103

IV. Pertinence du Modèle d'oligomérisation de Crumbs. 105
IV.1. Interaction-directe Crb-Patj 105
IV.2. Patj permet l'oligomérisation de Crb. 108
IV.3. Patj et la stabilité du complexe Crb. 109

V. Conclusion 111

Références Bibliographiques 112

CHAPITRE I : INTRODUCTION

La majorité des organismes eucaryotes contient des cellules qui, pour accomplir leurs fonctions, doivent être polarisées. La levure possède un cytosquelette et un système de sécrétion polarisé nécessaire à sa croissance. En effet, la croissance est réduite si l'asymétrie cellulaire est altérée par des mutations chez *S.cerevisiae* (Levure bourgeonnante) et chez *S.pombe* (Levure de fission), (Martin and Arkowitz, 2014). L'amibe *Dictyostelium* est polarisée afin de se déplacer par chimiotactisme (Iglesias and Devreotes, 2008). Chez les eucaryotes multicellulaires de nombreux types cellulaires sont polarisés : certains ovocytes, neuroblastes, neurones, cellules épithéliales. La polarité est requise notamment pour la transmission des signaux nerveux, pour le transport de molécules à travers les épithéliums, ou encore pour les divisions cellulaires asymétriques qui jouent un rôle dans la différenciation des lignages cellulaires et le maintien des cellules souches (Arimura and Kaibuchi, 2007; Rodriguez-Boulan et al., 2005; St Johnston and Ahringer, 2010).

Comment la polarité cellulaire est-elle mise en place et maintenue ? Cette question est fondamentale pour comprendre le développement normal et pathologique. La polarité cellulaire a été étudiée dès les années 70 dans les cellules épithéliales mammifères (Simons and Fuller, 1985). Avec la découverte des gènes PAR en 1988 chez *C. elegans*, puis celle du gène Crumbs chez la drosophile en 1990, les premiers acteurs indispensables à la polarisation cellulaire ont été identifiés (Kemphues et al., 1988; Tepass et al., 1990). Depuis, un grand nombre d'acteurs ont été mis en évidence et il apparaît que la plupart de ces gènes

sont conservés du ver à l'humain, certains étant même présents chez la levure. Néanmoins, la séquence d'évènements qui permet d'établir la polarité varie selon le tissu considéré.

La tissu-spécificité ne s'arrête pas seulement à la polarisation. Le réseau de protéines de polarité est à la croisée de nombreuses signalisations et processus cellulaires. Il régule le trafic cellulaire, le cytosquelette, la croissance, la prolifération, la survie, la migration, les propriétés mécaniques, la communication entre les cellules et leur morphogénèse. Ce réseau doit donc être finement régulé, et ce de façon spatio-temporelle afin d'être adapté aux transformations que l'épithélium subit au cours du développement.

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse s'inscrivent dans cette problématique. Patj est une protéine du réseau apical de polarité épithéliale, qui appartient au complexe Crumbs. Lorsque j'ai débuté ma thèse, en 2010, le rôle de Patj était peu connu. J'ai donc étudié sa fonction chez la drosophile.

Dans cette introduction, je présenterai les épithéliums, leur développement et les éléments structurels qui régissent la cellule épithéliale. Ensuite, je décrirai les acteurs de la polarité et les mécanismes de polarisation des cellules épithéliales. Pour finir, la structure et la fonction des membres du complexe Crumbs seront détaillées ainsi que les éléments qui étaient connus sur Patj lorsque j'ai commencé à l'étudier.

I. Les épithéliums

Les cellules des organismes eucaryotes fonctionnent de façon coordonnée et s'assemblent en tissu. Schématiquement, on distingue quatre types de tissu : le tissu conjonctif, le tissu musculaire, le tissu nerveux, et le tissu épithélial. Les épithéliums apparaissent très tôt au cours du développement (Cereijido et al., 2004; Le Bivic, 2013). Ils sont souvent les premiers tissus à se différencier comme le trophoblaste des mammifères qui apparaît au stade blastocyste, ou l'épithélium blastodermique de la drosophile qui est formé lors de la cellularisation et qui est à l'origine de tous les futurs tissus de la mouche.

I.1. Caractéristiques, fonctions et classification des épithéliums

Les épithéliums tapissent le corps et la face interne des cavités, des tubes, et des organes creux. Ce sont des tissus composés d'une ou plusieurs couches de cellules fortement adhérentes les unes aux autres. Cette adhésion est assurée par de nombreuses jonctions cellulaires qui ne laissent que peu d'espace intercellulaire et maintiennent l'intégrité et l'étanchéité du tissu. Pour mettre en place ces jonctions et assurer sa fonction, l'épithélium est polarisé. De plus, il possède généralement un taux de division cellulaire très élevé, il se renouvelle donc constamment.

Grace à ses caractéristiques le tissu épithélial rempli plusieurs fonctions essentielles au cours de la vie adulte et du développement. Sa première fonction est protectrice puisqu'il sépare le corps de l'environnement extérieur et les organes de leur lumière. De plus, il remplit une seconde fonction cruciale d'absorption et de sécrétion, et régule ainsi les échanges entre les

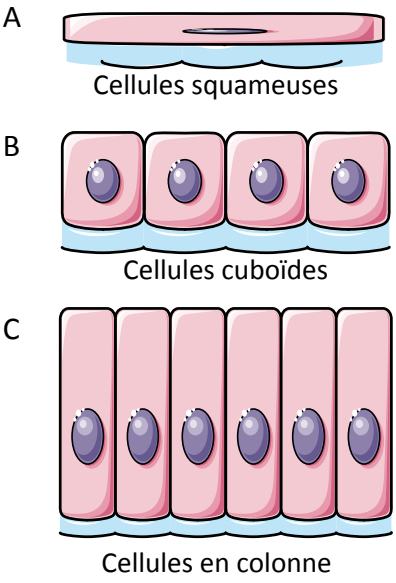


Figure 1 : Les différentes formes de cellules épithéliales.
Cette figure présente les trois formes de cellules épithéliales (**A**) squameuses ou pavimenteuses, (**B**) cuboïdes, (**C**) en colonne ou prismatiques.

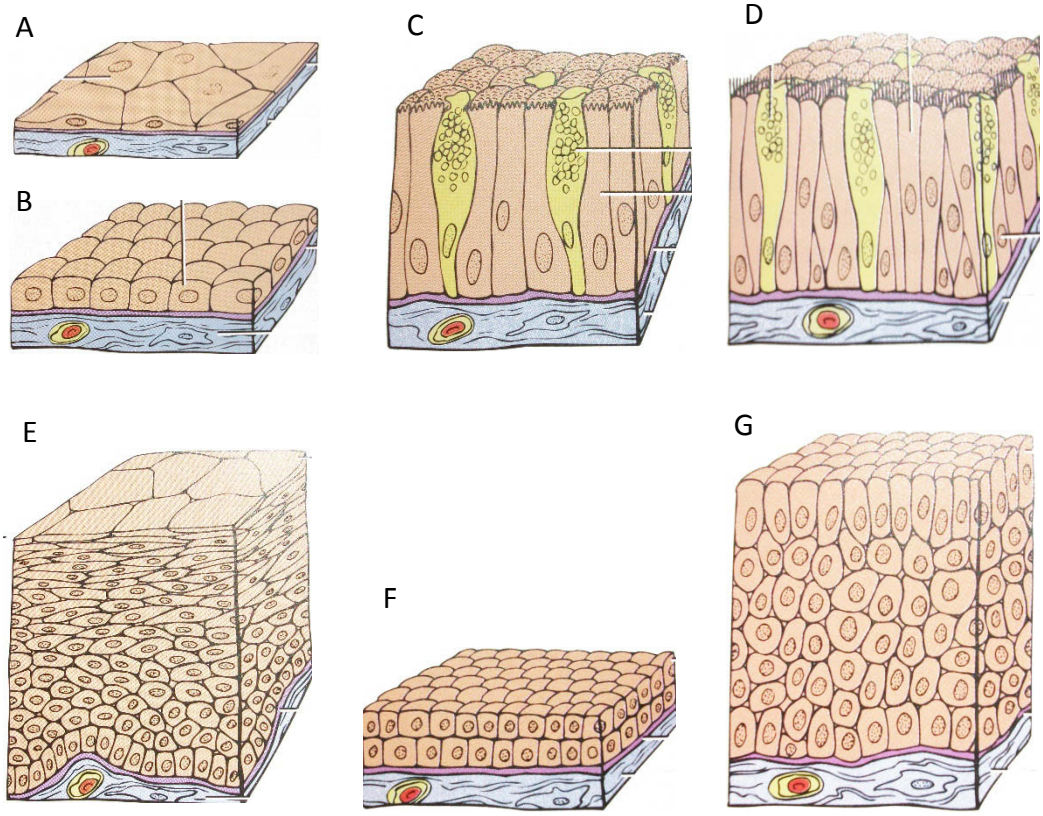


Figure 2 : Classification des épithéliums.
Les épithéliums simples (**A,B,C**) peuvent être composés de cellules pavimenteuses (**A**), cuboïdes (**B**), ou prismatiques (**C**). L'épithélium pseudo-stratifié ne contient qu'une seule couche de cellules qui ne font pas toutes la même hauteur (**D**). Comme pour les épithéliums simples il existe trois types d'épithéliums stratifiés (multicouche) : pavimenteux (**E**), cuboïdes (**F**), ou prismatiques (**G**), en référence à la forme des cellules de la couche la plus apicale.
D'après (Tortora and Grabowski, 2001).

différents compartiments qu'il sépare. Cette capacité est retrouvée aussi dans les épithéliums glandulaires qui sont responsables de la sécrétion d'hormones.

La classification des épithéliums est basée d'une part sur le nombre de couche(s) de cellules qui le composent et d'autre part sur la morphologie de ces cellules. Il existe trois formes de cellules épithéliales : les cellules pavimenteuses ou squameuses, les cellules cuboïdes, et les cellules en colonne ou prismatiques (**Fig. 1**). La morphologie des épithéliums est représentative de la fonction qu'ils remplissent.

Les épithéliums constitués d'une seule couche de cellules sont les épithéliums simples. La drosophile ne possède que des épithéliums simples. L'épithélium simple pavimenteux, composé de cellules aplaties, tapisse l'intérieur du poumon, du cœur et de nombreux vaisseaux comme les vaisseaux lymphatiques ; il remplit essentiellement une fonction de filtration et de diffusion rapide (**Fig.2A**). L'épithélium simple cuboïde assure l'absorption et l'excrétion, il est présent dans les glandes ou les tubes rénaux (**Fig.2B**). L'épithélium prismatique réalise des fonctions d'absorptions et de sécrétions importantes, il recouvre la face interne du tube digestif de l'estomac à l'anus ainsi que les conduits des glandes (**Fig.2C**). Lorsqu'il possède des cils motiles, comme dans les voies aériennes supérieures ou les trompes utérines, il participe à la propulsion de mucus et d'autres substances. L'épithélium prismatique pseudo-stratifié n'est composé que d'une seule couche de cellules mais toutes les cellules n'atteignent pas la surface apicale (**Fig.2D**). Les épithéliums stratifiés sont constitués de plusieurs couches de cellules. Ils sont qualifiés de pavimenteux (**Fig.2E**), cuboïdes (**Fig.2F**) ou prismatiques (**Fig.2G**) selon la morphologie des cellules de la couche la plus apicale. Ce sont principalement des épithéliums de protection comme la peau.

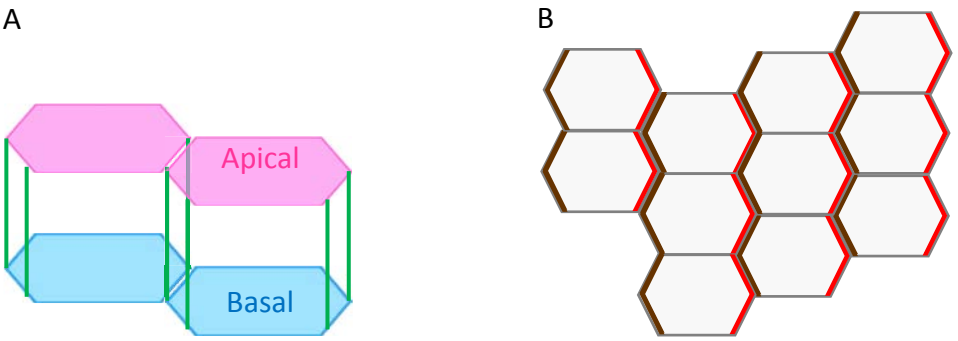


Figure 3 : La polarisation oriente la cellule épithéliale.
(**A**) La polarité apico-basale est retrouvée dans toutes les cellules épithéliales. (**B**) La polarité planaire est observable dans le plan de l'épithélium.

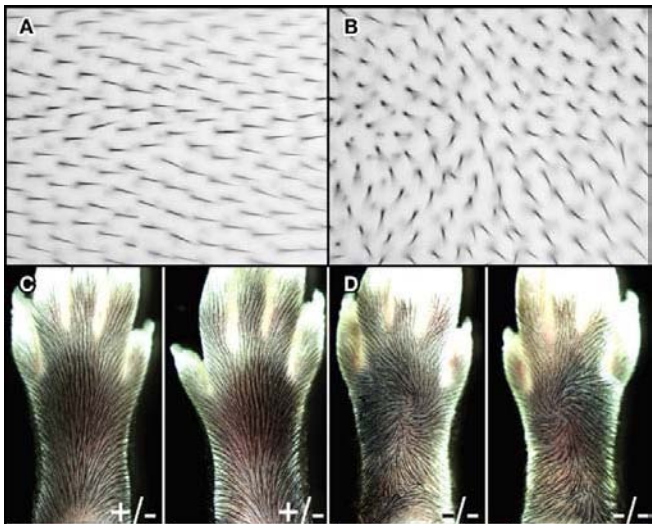


Figure 4 : La polarité planaire permet l'orientation homogène des soies des insectes et des poils des mammifères.
(**A,B**) Les cellules de l'aile de la drosophile produisent chacune une soie. (**A**) Les soies sont toutes orientées dans la même direction dans une aile sauvage (**B**) mais sont désorientées si les cellules sont mutantes pour un déterminant de la polarité planaire. (**C,D**) Le même phénotype est observé pour les poils des pattes chez la souris.
D'après (Zallen, 2007).

I.2. Structure de la cellule épithéliale

L'organisation constitutive de la cellule épithéliale repose sur sa polarité. La polarité apico-basale s'observe transversalement dans toutes les cellules épithéliales (**Fig.3A**). De plus, dans de nombreux épithéliums une autre asymétrie est aussi observée dans le plan du tissu identique de cellule à cellule et qualifiée de polarité planaire (**Fig.3B**). Elle se caractérise le plus souvent par la localisation asymétrique de protéines au sein du domaine apical et permet, par exemple, l'orientation homogène des cils, soies, ou poils à la surface de l'épithélium (**Fig.4**), (Zallen, 2007). Au cours du développement, elle est retrouvée notamment lors de la morphogénèse, par exemple pour l'intercalation cellulaire ou l'établissement de frontières. La polarité planaire sera mentionnée à plusieurs reprises dans ce manuscrit, mais les voies qu'elle fait intervenir ne seront pas détaillées.

La polarité apico-basale se manifeste par la distribution asymétrique des organelles, du cytosquelette, des jonctions cellulaires, d'ARNm et de protéines, ainsi que par une asymétrie dans la composition et la morphologie de la membrane plasmique. Le cortex cellulaire est ainsi régionalisé en trois domaines : l'apical, le latéral et le basal (**Fig.5**). La définition et le maintien des domaines corticaux sont indispensables à la différenciation des cellules épithéliales et au développement du tissu. Ils sont aussi essentiels pour ses fonctions et son intégrité, leurs altérations conduisant par exemple à la formation ou à l'aggravation de cancers. Le réseau de protéines de polarité et les mécanismes impliqués dans la régulation des domaines corticaux seront détaillés dans les parties II, III et IV.

La membrane apicale fait le plus souvent face à l'extérieur de l'organisme ou à la lumière des vaisseaux et organes et forme généralement des replis appelés microvillosités. C'est à la membrane apicale que se forment les cils des cellules épithéliales qui en

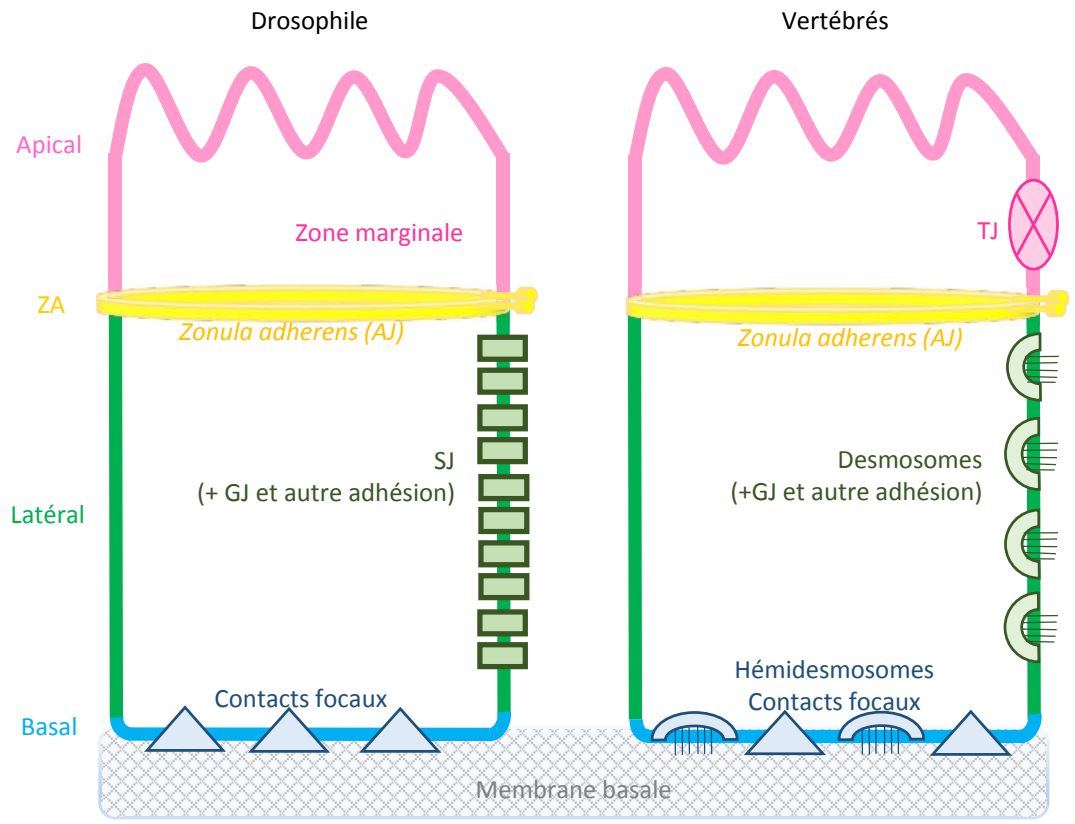


Figure 5 : Localisation des différents types de jonctions dans les cellules épithéliales de la drosophile et des vertébrés.

L'adhésion à la membrane basale (**bleu**) est assurée par les contacts focaux et les hémidesmosomes chez les mammifères. En latéral (**vert**) les jonctions communicantes (**GJ**) sont communes à la drosophile et aux vertébrés. Chez les vertébrés on y retrouve les desmosomes, alors que chez la drosophile le domaine latéral comporte les jonctions septées (**SJ**) qui assurent le rôle de barrière sélective. Les jonctions d'adhérence (**AJ**) s'associent en un anneau subapical autour de la cellule appelé zonula adherens (**ZA**, **jaune**). La ZA est localisée de la même façon entre la drosophile et les vertébrés. La zone marginale est la portion la plus haute de membrane latérale. Elle peut être considérée comme appartenant au domaine apical (**rose**) puisqu'elle contient les protéines de polarité apicales. Chez les vertébrés la zone marginale comporte les jonctions serrées (**TJ**) qui assurent la fonction de barrière sélective.

possèdent. En basal, la cellule adhère à la membrane basale (BM) aussi appelée lame basale, la matrice-extracellulaire qui constitue le socle de l'épithélium. Au cortex latéral de nombreuses jonctions permettent l'adhésion entre les cellules. Ces jonctions jouent un rôle prépondérant dans la structure de la cellule épithéliale.

I.2.1. L'adhésion et les jonctions

Les jonctions assurent, en plus de l'adhésion cellulaire, l'étanchéité de l'épithélium et les échanges avec les cellules adjacentes. De plus, leur capacité à induire des voies de signalisations intracellulaires leur permet de réguler un grand nombre de processus au sein de la cellule.

Les jonctions sont classées en trois grandes catégories : les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage, et les jonctions communicantes (**Fig.5**). Les jonctions serrées (TJ) chez les vertébrés, fusionnent la couche externe des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes empêchant ainsi la diffusion para-cellulaire entre les compartiments que l'épithélium sépare. Actuellement il n'a pas été mis en évidence de TJ chez la drosophile. Les jonctions septées (SJ) des invertébrés diffèrent des TJ par leur composition, mais sont considérées comme équivalentes puisqu'elles remplissent la même fonction de barrière sélective (Carlson et al., 2000; Tepass et al., 2001). Les desmosomes, les hémidesmosomes, les contacts focaux et les jonctions d'adhérence (AJ) sont des jonctions d'ancrage qui assurent la cohésion des cellules. Elles sont particulièrement importantes pour maintenir les cellules ensemble ainsi que leur structure, notamment lors de la morphogénèse ou pour résister aux tensions. Les jonctions communicantes (GJ) établissent des canaux d'échanges entre les cellules. Les études menées dans différents organismes modèles ont montrées des

similitudes dans la structure des jonctions, mais leur composition et leur localisation le long du cortex diffèrent (**Fig.5**), (Knust and Bossinger, 2002; Médina et al., 2002).

La structure et la compostion de ces jonctions sont présentées ci-dessous des plus basales aux plus apicales. Néanmoins, la répartition des différents types de jonctions le long du cortex épithélial n'est qu'une vision schématique. Chacune des jonctions possède un « noyau protéique » bien établi, mais d'autres protéines peuvent être retrouvées dans le même domaine cortical. C'est le cas des cadhérines et des intégrines qui peuvent se localiser dans tous les compartiments corticaux. De plus, l'ordre des jonctions lui-même peut varier selon l'épithélium considéré (Tepass and Hartenstein, 1994).

Adhésion à la Matrice extracellulaire

Les protéines composant la matrice extracellulaire sont très conservées de *C.elegans* aux vertébrés (Hynes and Zhao, 2000). Les BMs contiennent notamment du collagène IV, des laminines, et des protéoglycanes comme le perlecan. Ces protéines sont reliées au cytosquelette intracellulaire par les contacts focaux chez la drosophile, les contacts focaux et hémidesmosomes chez les vertébrés.

L'adhésion à la BM fait intervenir principalement les intégrines, des protéines transmembranaires qui forment des hétérodimères de deux sous-unités α et β (Takada et al., 2007). Les intégrines interagissent avec les protéines de la BM comme les laminines et, en intracellulaire, avec des protéines intermédiaires qui les relient au cytosquelette. Un autre complexe qui participe à l'adhésion basale fait intervenir le Dystroglycan (Bello et al., 2014). Le Dystroglycan interagit d'une part avec le perlecan et les laminines et d'autre part avec la dystrophine faisant le lien avec le cytosquelette d'actine.

Les jonctions latérales

La plus grande portion de la membrane latérale est composée : chez la drosophile de SJ et de GJ, chez les vertébrés de desmosomes et de GJ (**Fig.5**). Les jonctions d'ancrage latérales forment des spots répartis le long de la membrane.

Les cadhérines desmogleines et desmocollines sont les protéines d'adhésion qui composent les desmosomes (Nekrasova and Green, 2013). Elles établissent des interactions intercellulaires entre leur domaine extracellulaire et interagissent avec les plakines qui les ancrent en intracellulaire aux filaments intermédiaires. Chez la drosophile il n'existe ni filament intermédiaire, ni de desmosomes (Adams et al., 2000).

Les GJ sont elles conservées. Elles sont composées de plusieurs canaux intercellulaires et permettent l'échange de petites molécules (Phelan and Starich, 2001). Chez les vertébrés les connexines s'associent par six molécules pour former un hémi-canal, deux hémi-canaux formant la GJ. Les connexines ne sont pas retrouvées chez la drosophile mais huit protéines appelées innexines sont leurs analogues structurales, retrouvées aussi chez *C.elegans* (Bauer et al., 2005).

Les SJ remplissent à la fois la fonction de barrière sélective comme les TJ et une fonction d'adhésion latérale comme les desmosomes des vertébrés (**Fig.5, Fig.7A2**). Les SJ se localisant plus en basal que les TJ, leur équivalence est controversée (Furuse and Tsukita, 2006). Néanmoins, il a été découvert trois protéines qui sont homologues aux claudines, les composantes majeures des TJ et faisant partie des SJ (Berh et al., 2003; Nelson et al., 2010; Wu et al., 2004). Les interactions protéiques intercellulaires que font intervenir les SJ sont mal connues en dépit de l'identification d'une dizaine de protéines transmembranaires : les claudines, deux sous-unités de la Na+/K+-ATPase (ATPα et Nervana2), le Neuroglian (Nrg), la

Gliotactine, la Neurexine-IV (Nrx-IV), la Contactine, la Lachesine, la Transferrine2, et la Mcr (Macroglobuline complement-related), (Baumgartner et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 2004; Genova and Fehon, 2003; Hall et al., 2014; Llimargas et al., 2004; Tiklová et al., 2010). Trois protéines intracellulaires composent les SJ et sont nécessaires à leur formation : Yurt (Yrt), Coracle (Cor), et Varicose (Lamb et al., 1998; Laprise et al., 2009; Ward et al., 1998; Wu et al., 2007b). Yurt s'associe au Nrg, mais le rôle de cette interaction est inconnu (Laprise et al., 2009). Cor interagit avec la partie intracellulaire de la Nrx-IV, elles sont toutes deux interdépendantes pour leur localisation au cortex latéral (Ward et al., 1998). Les rares SJ des vertébrés, retrouvées dans des cellules nerveuses des nœuds de Ranvier, sont composées des homologues de Nrx-IV et de Cor (caspr et band4.1), (Banerjee et al., 2006).

L'anneau d'adhésion subapical : *zonula adherens*

Les AJ peuvent être retrouvées sous forme de spots répartis de façon peu concentrés le long du domaine latéral. Ils se localisent aussi en position subapicale où ils sont considérés comme des AJ immatures. Les spots d'AJ subapicaux peuvent s'associer en un amas continu autour de la cellule et constituer ainsi un anneau d'adhésion : c'est la *zonula adherens* (ZA). La ZA possède la même localisation et la même composition entre les cellules épithéliales des insectes et des vertébrés (**Fig.5**). Elle procure à la cellule une résistance aux stress mécaniques et définit la frontière entre le domaine apical et le domaine latéral. En plus d'être robustes, les AJ sont dynamiques (Collinet and Lecuit, 2013). La plasticité des AJ est co-régulée par leur recyclage constant et par les tensions mécaniques que les cellules voisines et le cytosquelette d'acto-myosine leur appliquent. L'attachement des AJ à l'actine est essentiel à leur formation complète et à leur maintien. Le cytosquelette d'actine renforce leur stabilité et restreint leur localisation ce qui permet leur agrégation en

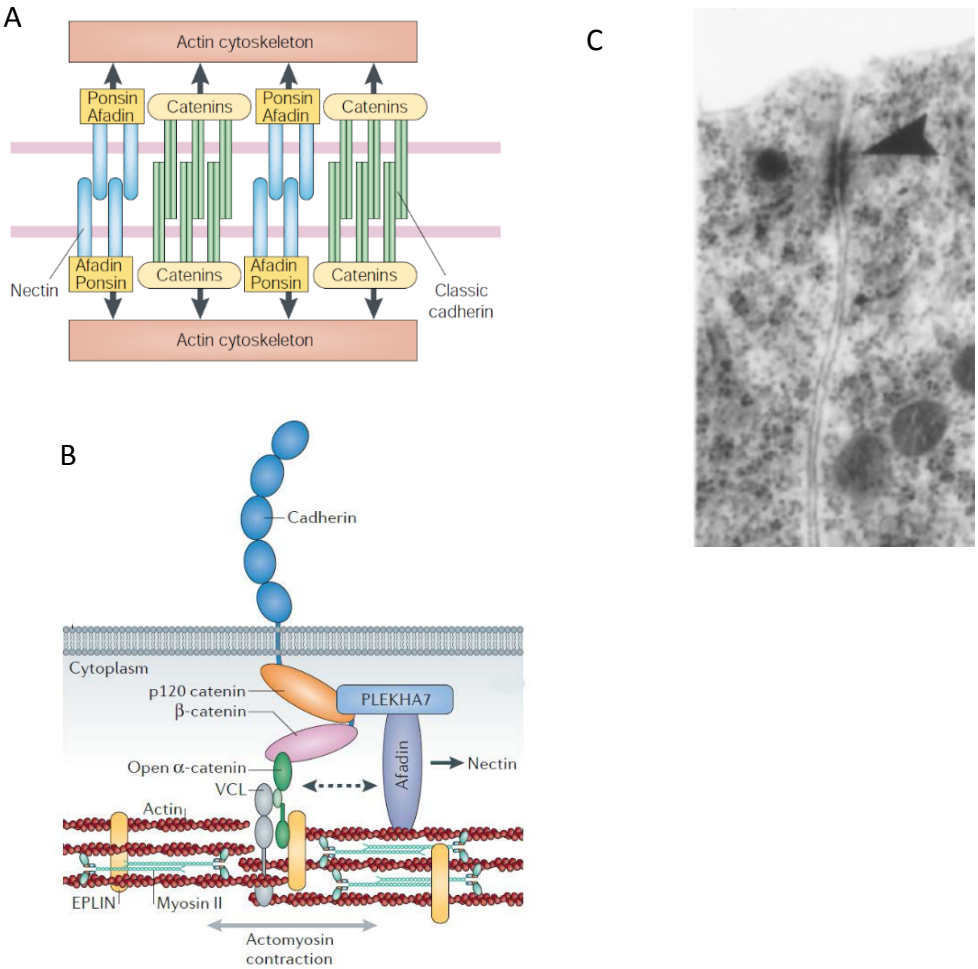


Figure 6 : Structure et Composition des jonctions d'adhérence.

Les jonctions d'adhérence de la *zonula adherens* subapicale, sont composées des complexes cadhérine-caténine et nectine-afadine (**A**). Les cadhérines et la Nectine à la surface de cellules adjacentes réalisent des interactions homophiles extracellulaires et sont reliées au cytosquelette d'actine intracellulaire via les caténines et l'Afadine. (**B**) Les cadhérines interagissent avec la β-caténine qui s'associe à l'α-caténine. L'α-caténine peut connecter l'actine directement, ou via ses partenaires : l'EPLIN, la Vinculine et l'Afadine. La Nectine est reliée au cytosquelette grâce a l'Afadine qui interagit directement ou via la Ponsine avec l'actine. Les complexes cadhérine-caténine et nectine-afadine sont reliés via les interactions de plusieurs de leurs partenaires. (**C**) Observées avec un microscope électronique à transmission, les AJ forment une zone dense aux électrons (**tête de flèche**) dans la partie apicale de la membrane latérale.

D'après (Tepass et al., 2000; Takeichi, 2014 ; Mandai et al., 2013 ; Tepass et al., 1996).

ZA. En retour les AJ régulent la polymérisation et la structure de l'actine-F. De plus, les protéines apicales de polarité jouent un rôle à la fois dans la formation initiale des AJ et dans leur agrégation en ZA, comme nous le verrons dans la partie I.3.

Deux complexes protéiques constituent les AJ: le complexe cadhérine-caténine et le complexe nectine-afadine (**Fig.6A**).

Les protéines de la famille des cadhérines sont transmembranaires et sont définies par leurs domaines cadhérines extracellulaires. Ces domaines réalisent, lorsqu'ils sont associés à des ions calcium, des interactions homophiles entre les cadhérines présentent à la membrane de la même cellule (interaction *cis*) et les cadhérines émergeantes des cellules adjacentes (interaction *trans*). Au cours de la formation des premiers contacts cellule-cellule les cadhérines établissent des interactions *trans*. Elles forment alors des spots d'AJ mobiles le long du cortex latéral. Les interactions *cis* permettent leur agrégation en ZA.

Il existe un grand nombre de cadhérines classées en quatre sous-familles (Tepass et al., 2000). Les cadhérines dites classiques comme E-Cadhérine (E-Cad) et N-Cadhérine possèdent dans leur partie intracellulaire un domaine d'interaction avec la β-Caténine (β-Cat) appelée Armadillo (Arm) chez la drosophile. Les cadhérines classiques interagissent aussi avec la caténine p120 qui n'est pas requise pour la formation des AJ chez la drosophile mais participe à leur maintien (Myster et al., 2003). La β-Cat/Arm interagit à son tour avec l'α-Caténine (α-Cat) qui lie le complexe à l'actine (**Fig.6B**), (Oda et al., 1993; Pai et al., 1996; Rimm et al., 1995). L'α-Cat peut interagir directement avec l'actine, mais l'existence d'un complexe quaternaire E-Cad/β-Cat/α-Cat/actine n'a jamais été mise en évidence (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). L'α-Cat pourrait relier les cadhérines à l'actine via ses

intermédiaires : la Vinculine, l'EPLIN (Epithelial Protein Lost In Neoplasm) ou l'Afadine (**Fig.6B**), (Ishiyama et al., 2013; Tachibana et al., 2000; Taguchi et al., 2011; Watabe-Uchida et al., 1998). Cependant les interactions de l'α-Cat avec Arm et avec l'actine sont toutes deux essentielles pour la fonction de l'α-Cat et la formation des AJ (Desai et al., 2013). Les mutations de *shotgun* (code E-Cad chez la drosophile) ou *arm* conduisent à la perte de l'intégrité des épithéliums de l'embryon de drosophile (Cox et al., 1996). Dans les cellules folliculaires mutantes pour *arm*, l'E-Cad et la N-Cad sont délocalisées (Tanentzapf et al., 2000). Le complexe cadhérine-caténine est donc essentiel pour la mise en place et le maintien des AJ. Le complexe cadhérine-caténine est toujours présent au niveau de la *zonula adherens* mais sa localisation s'étend aussi, en quantité moindre et variable selon le tissu, tout le long du cortex latéral.

Contrairement au complexe cadhérine-caténine le complexe nectine-afadine est exclusivement localisé à la ZA. La nectine est transmembranaire, en extracellulaire elle réalise des interactions homophiles *trans*, et interagit en intracellulaire avec l'Afadine qui l'ancre à l'actine directement ou indirectement via la Ponsine (**Fig.6B**), (Mandai et al., 2013). La Nectine est capable d'induire le recrutement d'E-Cad, de l'α-Cat et de la β-Cat, dans plusieurs types de cellules mammifères en culture (Honda et al., 2003; Tachibana et al., 2000). Dans l'épithélium du disque d'aile de la drosophile, Echinoïd (Ed, l'homologue de la Nectine) est requise pour l'accumulation d'E-Cad (Wei et al., 2005). Il existe donc un lien étroit entre les complexes cadhérine-caténine et nectine-afadine (**Fig.6B**). De nombreuses interactions entre les protéines des deux complexes ont été reportées, mais le rôle de ces interactions dans l'établissement des AJ et l'organisation du cytosquelette reste à déterminer (Mandai et al., 2013).

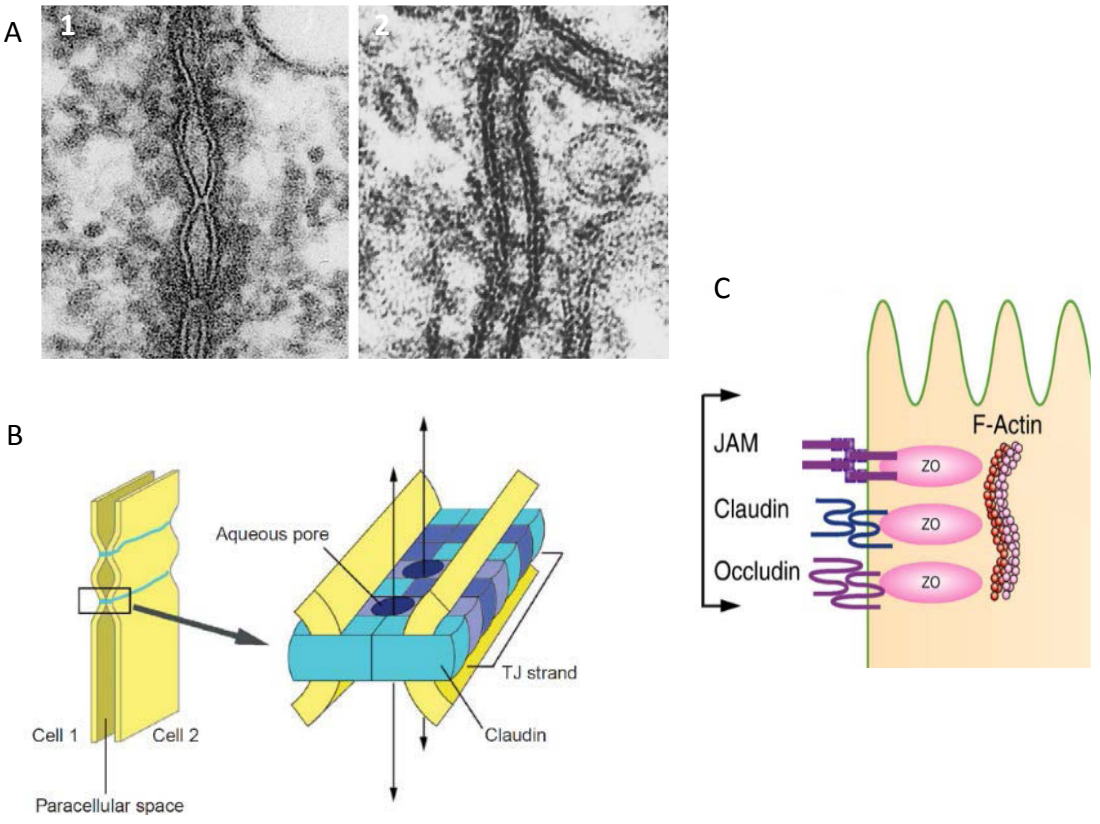


Figure 7 : Les barrières sélectives des épithéliums.

Pour réaliser leur fonction les cellules épithéliales doivent contrôler les échanges para-cellulaires entre les compartiments physiologiques qu'elles séparent. Ce rôle est rempli par les jonctions serrées (TJ) chez les vertébrés et les jonctions septées (SJ) chez la drosophile. (**A1**) Les TJ et (**A2**) les SJ ont une structure différente comme on peut le voir en microscopie électronique. (**B**) Les TJ fusionnent les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes pour obstruer l'espace intercellulaire, (**C**) via les interactions extracellulaires homophiles et hétérophiles des claudines, occludines et protéines JAM. Ces trois types de protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine par les protéines ZO.

D'après (Furuse and Tsukita, 2006; Miyoshi et al., 2008).

La *zonula occludens* des vertébrés

La région la plus apicale du cortex latéral est appelée zone marginale. On y retrouve les protéines apicales de polarité et les TJ chez les vertébrés. Les protéines apicales sont requises pour la formation des TJ, certaines d'entre elles interagissent directement avec leurs composants (Médina et al., 2002). Les TJ sont constituées de protéines transmembranaires qui obstruent le espace intercellulaire en interagissant avec celles des cellules voisines (**Fig.7A1,B**), (Paris et al., 2008). Ces protéines sont les occludines, claudines et JAMs (Junctional Adhesion Molecules) qui sont ancrées à l'actine par le biais des protéines ZO-1 (Zonula Occludens 1), ZO-2 et ZO-3 (**Fig.7C**).

I.2.2. Le cytosquelette et le transport cellulaire

Le cytoplasme cellulaire est organisé par un squelette de fibres d'actine (actine-F) et un squelette de microtubules. Le cytosquelette par son association aux jonctions permet le maintien de la forme de la cellule, et lui confère une résistance aux stress mécaniques qu'elle subit. Mais il n'est pas seulement un élément structurel inerte, il est dynamique et réalise de nombreuses fonctions actives. Ainsi l'orientation et la contraction/relaxation de l'acto-myosine est à l'origine de nombreux mouvements cellulaires : migration, intercalation, pulsation, constriction. La régulation des fibres d'actine est donc requise pour la morphogénèse. De plus, les microtubules positionnent le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, et établissent des rails qui guident le trafic cellulaire. Les microtubules orientent aussi les divisions cellulaires.

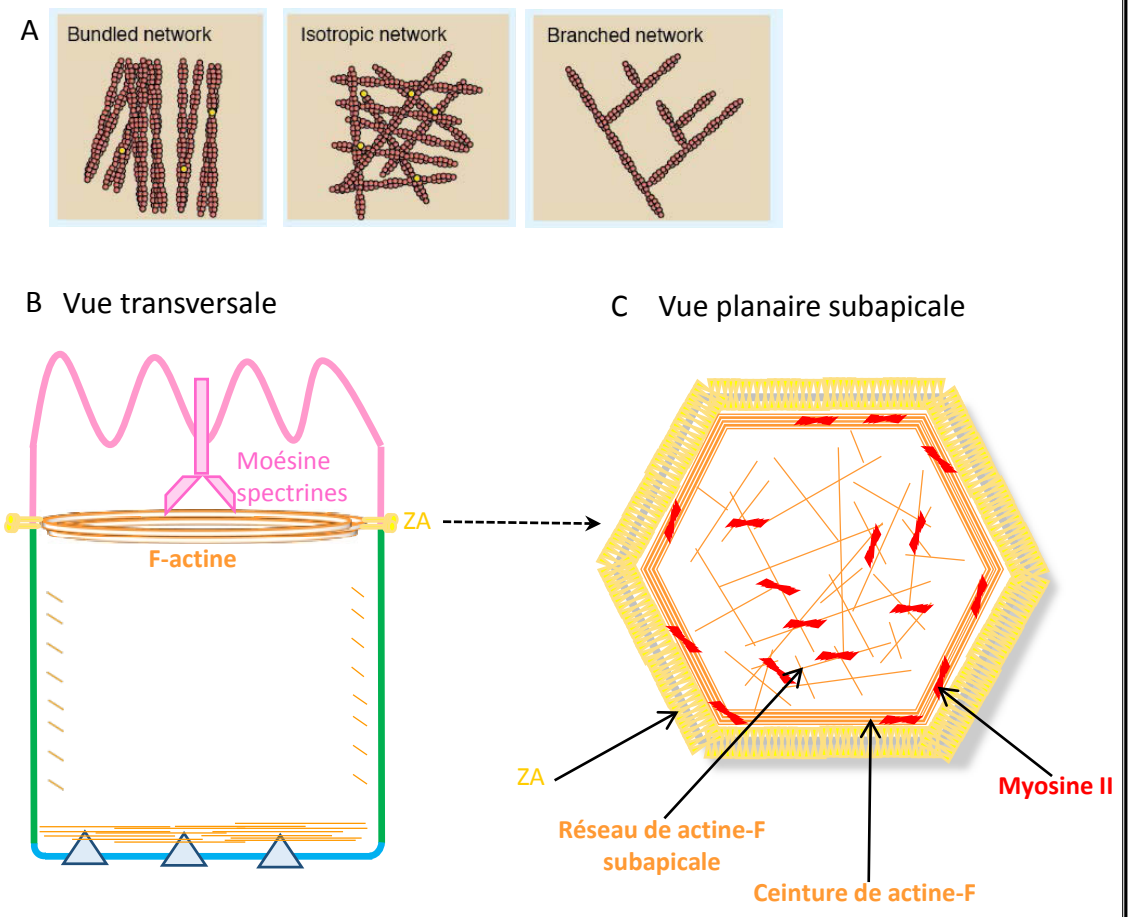


Figure 8 : Structure du cytosquelette d'acto-myosine.

Les monomères d'actine s'associent en filament d'actine-F (**A rouge, B et C orange**). (**A**) Si les filaments s'associent de façon parallèle ils forment l'actine en faisceau (**bundled network**), mais ils peuvent aussi se croiser pour former un réseau isotropique (**isotropic network**). Le réseau d'actine peut aussi être formé par le branchage en Y de filaments les uns sur les autres, dans ce cas il est qualifié de branché (**branched network**). (**B**) Le réseau d'actine est retrouvé dans tous les domaines corticaux de la cellule épithéliale, où il est relié au cortex par les jonctions et l'adhésion basale. En subapical, l'actine est associée à la ZA (**jaune**), mais aussi au cortex apical via les spectrines et la Moésine (**rose**). (**C**) Dans le plan subapical de la cellule, l'actine en faisceau forme une ceinture le long de la ZA. Un réseau d'actine composé d'actine isotropique ou branchée, traverse la cellule dans le plan. La myosine II (**rouge**) connecte plusieurs filaments d'actine et régule la contractilité du cytosquelette d'actine.

*Panel **A** D'après (Munjal and Lecuit, 2014).*

Structure du cytosquelette d'actine

L'actine peut être assemblée en filaments parallèles les uns aux autres appelés faisceaux (**Fig.8A**), (Collinet and Lecuit, 2013). Les faisceaux lorsque qu'ils s'entrecroisent forment l'actine isotropique. Les filaments peuvent aussi être fixés les uns sur les autres en Y, formant l'actine branchée (**Fig.8A**). La polymérisation et l'assemblage des structures d'actine sont régulés par plusieurs acteurs. Le complexe Arp2/3 produit de l'actine branchée, les formines comme Diaphanous favorisent l'expansion linaire en faisceau de l'actine-F. Les formines et Arp2/3 se localisent spécifiquement au niveau des amas de cadhérines et leur inhibition empêche la formation des AJ.

L'actine-F s'associe en basal avec les intégrines et le long du cortex latéral avec les jonctions latérales (**Fig.8B**). Au niveau subapical elle forme un anneau le long de la ZA et un réseau qui traverse la cellule dans le plan de l'épithélium (**Fig.8C**). Cette actine subapicale est reliée au cortex latéral par les complexes cadhérine-caténine et nectine-afadine et au cortex apical par le complexe αβHeavy$_2$-spectrine et la Moésine (**Fig.8B**). Au niveau des AJ en spot, l'actine en faisceau est attachée dans le prolongement des cadhérines perpendiculairement au cortex ; elle est qualifiée de radiale. Lors de l'agrégation en ZA, l'actine est réorganisée et s'oriente en parallèle du cortex pour former une ceinture linéaire autour de la cellule (**Fig.8C**). Cet anneau est composé de faisceaux (**Fig.6**). Les intéracteurs de l'α-Cat semblent jouer un rôle important dans sa formation (Abe and Takeichi, 2008; Le Duc et al., 2010; Taguchi et al., 2011; Yonemura et al., 2010).

Régulation de l'actine-F aux jonctions d'adhérence

Les AJ sont associées aux régulateurs des complexes Arp2/3 et formines qui sont principalement les petites GTPases Rac, Rho, Cdc42 et leurs activateurs et inhibiteurs

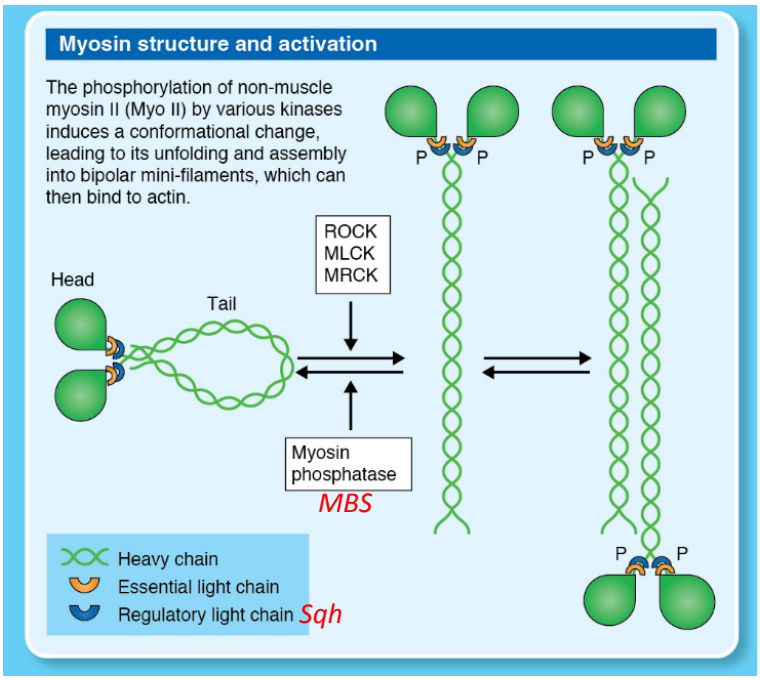


Figure 9 : Structure et activation de la myosine II.

La myosine II est composée d'une chaîne lourde, d'une chaîne légère structurale et d'une seconde chaîne légère régulatrice (Sqh). La phosphorylation de la myosine II régule sa conformation et permet son association bipolaire avec une autre Myosine II. Les couples bipolaires s'associent à deux filaments d'actine. Le niveau de phosphorylation de la myosine II est contrôlé notamment par ROCK et la phosphatase MBS.

D'après (Munjal and Lecuit, 2014).

(Collinet and Lecuit, 2013). Les AJ recrutent alternativement au cours du développement les GAPs (Guanylate Activating Protein) et GEFs (Guanine Exchange Factor) de Rho et Rac. Rac active la polymérisation de l'actine et la formation d'actine branchée via Arp2/3. Rho régule les formines et la production d'actine en faisceau nécessaire à la formation et au maintien de la ZA. De plus, la petite GTPase Rho active via la Rho kinase (ROCK), la myosine II qui régule la contractilité du cytosquelette d'actine.

La myosine II est composée d'une chaîne lourde, d'une chaîne légère structurale et d'une seconde chaîne légère régulatrice (*spaghetti squash* chez la drosophile, Sqh), (**Fig.9**), (Munjal and Lecuit, 2014). Deux myosines s'associent de façon bipolaire pour lier deux filaments d'actine. Les molécules de myosine II glissent sur l'actine induisant ainsi la contraction du cytosquelette d'actine. L'activation de la myosine II par ROCK est contrebalancée par la phosphatase MBS (Myosin Binding Subunit).

Les microtubules

Les microtubules sont des multimères intrinsèquement polarisés (Janke, 2014). L'extrémité moins (–) a une croissance lente, alors que l'extrémité plus (+) a une croissance rapide caractérisée par un phénomène appelé l'instabilité dynamique (**Fig.10A**). La dynamique des microtubules est la résultante de cette propriété : alternance de phases d'élongation et de ruptures brutales, dont les fréquences et les vitesses sont régulées par les protéines associées aux microtubules.

L'orientation des extrémités participe à la polarisation de la cellule en localisant les organelles, et en orientant le trafic vésiculaire (Sugioka and Sawa, 2012). Dans la cellule épithéliale il y a schématiquement deux routes de microtubules (**Fig.10B**). La première part des centrosomes, localisés au-dessus du noyau et associés aux extrémités –, vers les cortex

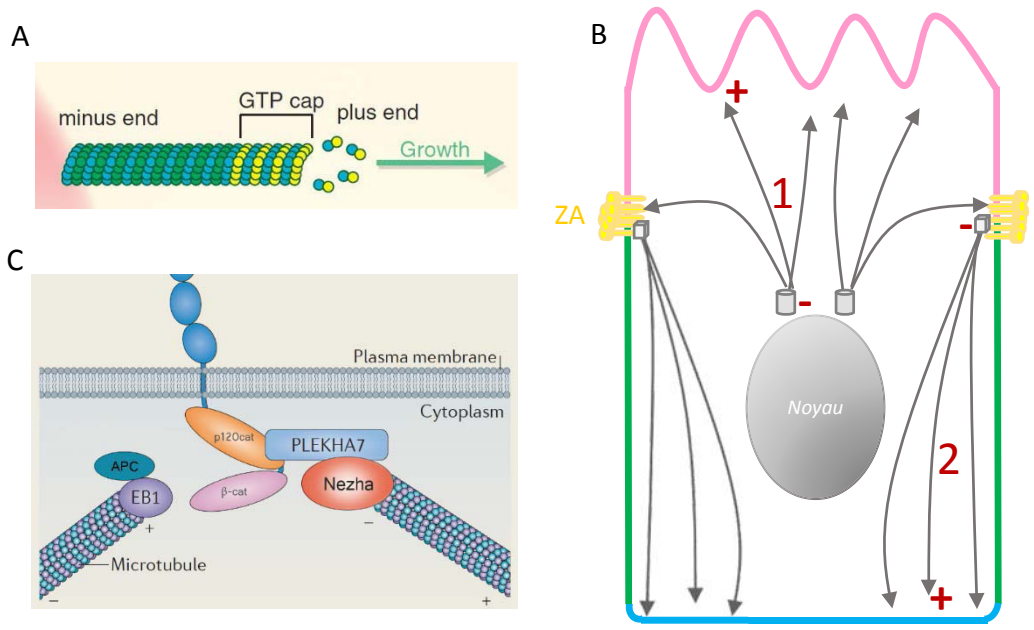


Figure 10 : Organisation des microtubules au sein de la cellule épithéliale.
(**A**) La tubuline s'associe en multimères qui forment des tubes polarisés possédant une extrémité + a croissance rapide et une extrémité – a croissance lente. (**B**) Dans la cellule épithéliale les microtubules polarisent la cellule en s'organisant schématiquement en deux routes. La première (**B1**) va du noyau (-) aux cortex subapical et apical (+). La seconde (**B2**) va des AJs (-) au cortex basal (+). (**C**) Les extrémités + sont associées au AJs de façon dépendante d'EB1 et APC, et les extrémités + via Nezha et PLEKHA7 qui s'associent à la caténine p120 chez les mammifères.
*Panels **A** et **C** D'après (Sugioka and Sawa, 2012; Takeichi, 2014).*

apical et subapical. Dans la deuxième route, l'extrémité – est reliée aux AJ et le microtubule plonge vers le cortex basal. Les AJ reçoivent donc des extrémités – et +. Ce modèle est cependant variable selon le tissu considéré.

Comment les microtubules s'associent aux jonctions est encore mal connu (Takeichi, 2014). L'attachement des extrémités + est dépendante d'EB1 (End Binding 1), d'APC (Adenomatosis Polyposis Coli) et de la dynéine (qui interagit avec la β-Cat chez les mammifères), et il participe à la formation et à la stabilisation des AJ (**Fig.10C**). Pour les extrémités –, un complexe protéique associé à la p120-caténine composé de PLEKHA7 et Nezha a été mis en évidence chez les mammifères (**Fig.10C**). Nezha est conservée chez la drosophile (Patronin) et protège les extrémités – des microtubules de la dépolymérisation dans des cellules en culture, mais son rôle au niveau des AJ n'a pas été étudié (Goodwin and Vale, 2010; Goshima et al., 2007).

Transport le long des microtubules et trafic vésiculaire

Les moteurs associés aux microtubules sont les kinésines et les dynéines. Les kinésines, selon le type, se déplacent vers les extrémités + ou -, alors que les dynéines vont vers les - (Horgan and McCaffrey, 2011). Les kinésines et les dynéines sont notamment régulées par les petites GTPases Rab associées spécifiquement avec un type de vésicule intracellulaire. Ainsi elles sont des acteurs essentiels du trafic cellulaire.

Le trafic vésiculaire consiste notamment au transport de protéines et de molécules entre les compartiments intracellulaires et la membrane plasmique pour les protéines membranaires, ou le milieu extracellulaire pour les protéines sécrétées. La première étape est le bourgeonnement des vésicules à partir de la membrane d'un compartiment (membrane plasmique ou appareil de Golgi), et nécessite les clathrines et les

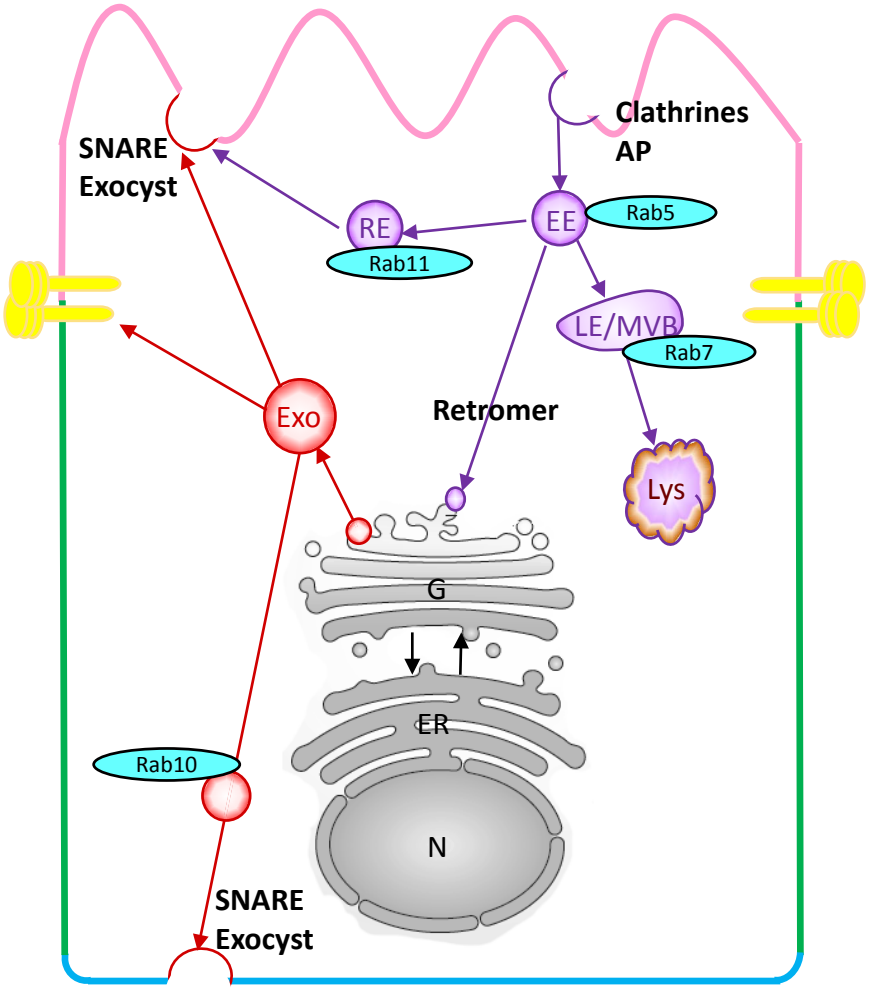


Figure 11 : Organisation schématique du trafic cellulaire au sein d'une cellule épithéliale.

En gris sont représentés le noyau (**N**), le réticulum endoplasmique (**ER**) et l'appareil de Golgi (**G**). Les protéines membranaires ou sécrétées sont exocytées du Golgi vers le cortex cible via les exosomes (**Exo**). L'exocystose (**voie rouge**) nécessite les protéines SNARE et l'exocyst pour l'attachement et la fusion des vésicules à la membrane plasmique (ils régulent aussi ces processus dans la voie d'endocytose) et des petites GTPases Rab (**turquoise**) comme Rab10 pour orienter leur adressage en basal. Au sein de la voie d'endocytose (**voie violette**) plusieurs types de vésicules sont retrouvées. Les endosomes précoces (**EE**) sont les premières formées grâce à l'action des Clathrines et des protéines AP. Ils maturent par défaut en endosome tardif (**LE**) ou en corps multi-vésiculaires (**MVE**) puis fusionnent avec des lysosomes (**Lys**), ce qui conduit à la dégradation de leur contenu. Les protéines endocytées peuvent être recyclées via les endosomes de recyclage (**RE**) ou en rejoignant le Golgi grâce au complexe Retromer. Les petites GTPases Rab régulent les différentes étapes de l'endocytose : par exemple Rab5 est associée aux EE, Rab7 aux LE et Rab11 aux RE.

protéines adaptatrices (AP). Ensuite les vésicules se déplacent dans la cellule vers les compartiments cibles, notamment grâce aux kinésines et aux dynéines. Ces vésicules doivent ensuite s'attacher et fusionner avec le compartiment cible. Chaque type de vésicule est caractérisé par sa composition spécifique en lipides membranaires et protéines Rab (**Fig.11**). Par exemple Rab5 est spécifique des endosomes précoces, Rab11 des endosomes de recyclage.

Lors de l'exocytose, les vésicules partent du Golgi vers la membrane plasmique. L'attachement et la fusion à la membrane du compartiment cortical cible, sont réalisés par les protéines SNAREs et les protéines de l'Exocyst (**Fig.11**).

Au cours de l'endocytose, les premières vésicules formées sont les endosomes précoces. Les endosomes précoces maturent par défaut en corps multi-vésiculaires ou en endosomes tardifs qui peuvent fusionner avec des lysosomes conduisant à la dégradation des protéines qu'ils contiennent (**Fig.11**). Les protéines internalisées dans les endosomes peuvent être sauvées de la dégradation en étant dirigées soit vers les endosomes de recyclage soit vers le Golgi (**Fig.11**). L'adressage spécifique de protéines vers le bon compartiment cellulaire est régulé par des protéines de triage comme le complexe Retromer qui permet l'adressage au Golgi pour le recyclage (**Fig.11**).

I.3. Le développement des épithéliums

On distingue les épithéliums primaires des épithéliums secondaires en fonction de leur origine développementale. Les épithéliums primaires sont formés soit à partir de cellules souches embryonnaires, soit dérivent directement d'autres épithéliums. Les épithéliums secondaires quant à eux se différencient à partir du mésenchyme.

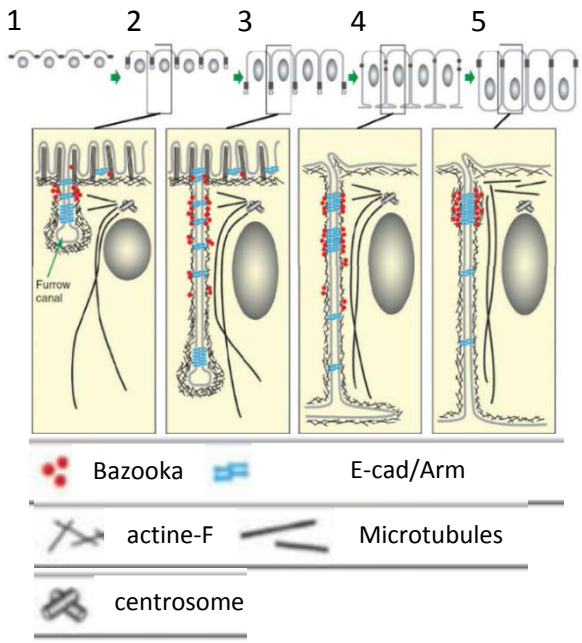


Figure 12 : La formation des jonctions lors de la cellularisation.

La cellularisation est un processus d'individualisation cellulaire qui permet la formation du blastoderme de la drosophile. Elle se fait par la formation de sillons membranaires au cortex apical de l'embryon (**1,2**), qui progressent basalement (**2,3,4**) pour séparer les noyaux du syncytium embryonnaire (**5**). Baz et le complexe cadhérine-caténine se localisent à la membrane du sillon néoformé (**2**). Les AJ progressent avec le sillon jusqu'à être réparties tout le long du cortex latéral et en basal (**3,4**). Ensuite, les AJ s'accumulent en position subapicale sous l'action de Baz (**5**), où elles formeront plus tard la ZA.

D'après (Laprise and Tepass, 2011).

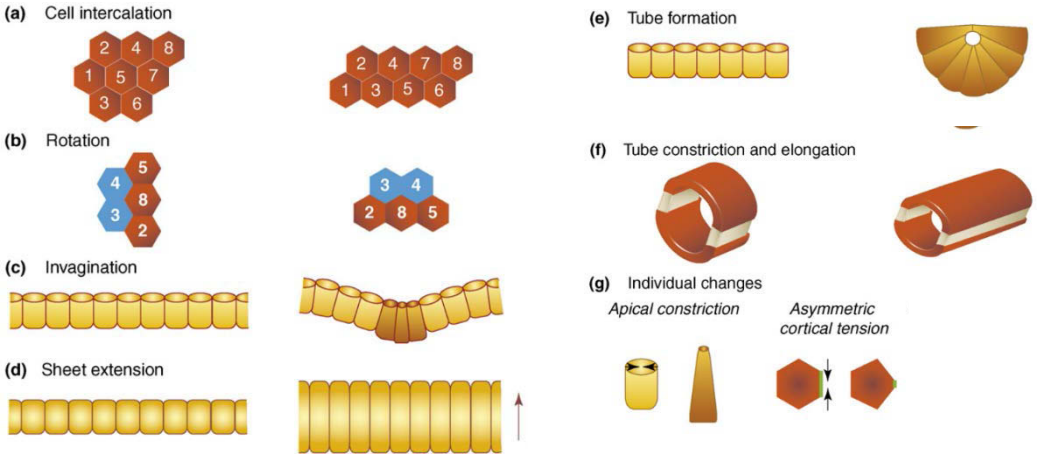


Figure 13 : Exemple de processus morphogénétiques retrouvés au cours du dévelopement des épithéliums.

La morphogénèse tissulaire implique des processus d'élongation notamment par intercalation cellulaire (**a**), de contraction, d'invagination (**c**), de migration, d'éversion, de rotation (**b**) et de formation de tubes (**e,f**). A l'échelle cellulaire ces mouvements impliquent des remodelages planaires polarisés (**g, cortical tension**) ou apicaux (**g, apical constriction**), le changement de la forme des cellules par épaississement (**d**) ou élongation (**f**).

D'après (Quintin et al., 2008)

Il a été proposé une subdivision du développement épithélial en plusieurs phases (Tepass et al., 2001). La première correspond à l'établissement primitif de la polarité et des jonctions en spots (phase I). Le signal initial amorçant la polarisation des épithéliums primaires ou secondaires reste peu connu. A ce jour aucun signal initial universel n'a été mis en évidence, il diverge selon l'épithélium considéré et il est bien souvent méconnu. L'absence de cellules épithéliales polarisées de drosophile en culture fait écho à cette méconnaissance. Dans une deuxième phase, la polarisation du cortex et du cytoplasme est élaborée et complexifiée, les jonctions préexistantes s'assemblent en anneau d'adhésion et de nouvelles jonctions se forment (phase II). Ensuite, ces structures devront être renforcées et régulées pour permettre la différenciation finale des cellules épithéliales et leur spécialisation selon leur fonction. Cette dernière phase est hautement tissu spécifique.

I.3.1. Formation des épithéliums primaires

La cellularisation du blastoderme (phase I)

Le blastoderme se forme *de novo* par une cytokinèse atypique appelée cellularisation (**Fig.12**), (Harris et al., 2009). Après fécondation, l'embryon subit 13 cycles de divisions mitotiques sans cytokinèse. Il est alors un syncytium contenant plus de 5000 noyaux à sa périphérie. La membrane plasmique forme ensuite des sillons qui en s'allongeant simultanément entre les noyaux (de l'apical vers le basal) individualisent les cellules.

Juste avant la formation du sillon, les centrosomes au-dessus du noyau envoient des microtubules en arc de cercle vers le basal. Le cytosquelette est donc déjà partiellement polarisé. Il est indispensable à la cellularisation car il organise le réticulum endoplasmique et

l'appareil de Golgi autour du noyau et dirige le trafic vésiculaire requis pour la formation et la croissance du sillon. Le matériel nécessaire à la formation de la membrane est envoyé en apical, point de départ du sillon, puis progresse avec le sillon latéralement.

Dès l'apparition du sillon les AJ se forment au niveau de la protrusion apicale de celui-ci (**Fig.12**), (Cox et al., 1996; Harris and Peifer, 2004; Harris and Peifer, 2005; Müller and Wieschaus, 1996; Tepass and Hartenstein, 1994). Ces premières AJ sont très proches des microtubules et co-localisent avec la protéine Bazooka (Baz, aussi appelée PAR-3). Les premières AJ formées suivent le sillon lors de sa progression, jusqu'à sa fusion basale alors que Baz reste proche du domaine apical. A la fin de la cellularisation, il y a des AJ au cortex basal et tout le long du cortex latéral. Ensuite, les AJ basales se désassemblent et les AJ latérales se concentrent en subapical.

Baz est localisée en position subapicale de façon dépendante de la dynéine et des microtubules, avant les AJ qui se répartissent tout le long du cortex (Harris and Peifer, 2004; Harris and Peifer, 2005; Müller and Wieschaus, 1996). La mutation de *baz* prévient la relocalisation des AJ en subapical. De plus, Baz interagit directement avec Arm et Ed (McGill et al., 2009; Wei et al., 2005). L'accumulation des spots d'AJ en subapical est donc dépendante de Baz. Ces spots d'AJ subapicaux sont ensuite enrichis jusqu'à former, plus tard, dans les épithéliums issus du blastoderme, la *zonula adherens*.

Développement des épithéliums issus du blastoderme (phase II)

Si le blastoderme présente déjà des AJ et une polarisation primitive, les épithéliums qui en dérivent poursuivent leur différenciation. Au cours de la gastrulation et de l'organogénèse, l'expression de nouvelles protéines de polarité, la réorganisation du cytosquelette, la formation de la ZA des GJ et des SJ, renforcent cette polarisation initiale

(Tepass and Hartenstein, 1994). La ZA ne se forme pas en même temps dans tous les épithéliums primaires ; pour certains, comme l'endoderme postérieur, elle est déjà établie à la fin de la gastrulation, pour d'autres, comme dans les trachées, elle n'est pas encore complète à la fin de l'embryogénèse. L'assemblage des spots d'AJ en ZA est favorisé par Crumbs et par Cdc42-PAR-6-aPKC qui inhibent l'endocytose d'E-Cad (Harris and Tepass, 2008; Tepass, 1996).

I.3.2. Formation des épithéliums secondaires

Les épithéliums secondaires se forment par une transition mésenchymo-épithéliale à partir du mésenchyme qui lui-même s'est formé par une transition épithélio-mésenchymateuse (Tepass et al., 2001). Il y a peu d'épithéliums secondaires dans l'embryon de la drosophile : l'épithélium de l'intestin moyen, le cœur, et les vaisseaux de la barrière neurale. Chez l'adulte un des plus étudiés est l'épithélium folliculaire.

L'épithélium de l'intestin moyen est issu de la migration, de la fusion puis de la différenciation de deux groupes de cellules mésenchymateuses (Tepass and Hartenstein, 1994). Ces cellules acquièrent leurs caractéristiques épithéliales grâce à leur attachement basal médié par les intégrines, mais ne montrent pas de réorganisation des jonctions latérales. Les cellules mésenchymateuses possèdent quelques AJ et GJ en spots. Après leur différenciation épithéliale elles conservent ces jonctions qui restent diffuses le long du cortex latéral sans former de ZA.

Les cellules mammifères MDCK (Madin Darby canine kidney) peuvent être polarisées *in vitro* permettant d'étudier les mécanismes qui initient la polarisation, et constituent donc un modèle pour l'étude de la différenciation des épithéliums secondaires.

Cultivées en suspension ces cellules forment des cystes polarisés, l'apical vers l'extérieur, par l'établissement de jonctions latérales (Bryant et al., 2010; Wang et al., 1990a; Wang et al., 1990b). Ces cystes déposés sur une matrice de collagène inversent leur polarité (Wang et al., 1990a; Wang et al., 1990b). L'attachement à la matrice induit une signalisation intégrine qui via Rac1 polarisent le cytosquelette et le trafic cellulaire (O'Brien et al., 2001; Yu et al., 2005). Mais leur polarisation complète nécessite aussi des AJ. En effet, les MDCK cultivées avec des faibles concentrations de calcium, pour réduire les interactions entre les cadhérines, ne parviennent pas à définir de domaine apical et latéral même si elles sont attachées à la matrice de collagène (Cereijido et al., 1978).

L'épithélium folliculaire de la drosophile est un épithélium secondaire particulier qui nécessite en plus de l'adhésion basale, un contact apical pour se différencier (Tanentzapf et al., 2000). Cet épithélium recouvre les cystes germinaux, leur domaine apical étant en contact avec les cellules germinales. Dans les ovaires agamétiques le domaine basal se différencie, mais aucune délimitation des domaines apical et latéral n'est observée. Cette absence de différenciation terminale est corélée avec l'absence du déterminant apical Crumbs. La présence de la lignée germinale est donc essentielle pour la différenciation de cet épithélium. Par ailleurs, la mutation *arm* n'empêche pas la polarisation de l'épithélium, même s'il est requis plus tard pour maintenir la forme des cellules. Les AJ ne semblent donc pas nécessaires pour la formation de l'épithélium folliculaire.

L'analyse de ces différents exemples d'épithélium secondaire montre l'importance de l'adhésion dans leur différenciation. L'adhésion basale renforcée soit par les AJ soit par un contact apical, induit la réorientation du cytosquelette et du trafic essentielle pour poursuivre et maintenir la différenciation épithéliale.

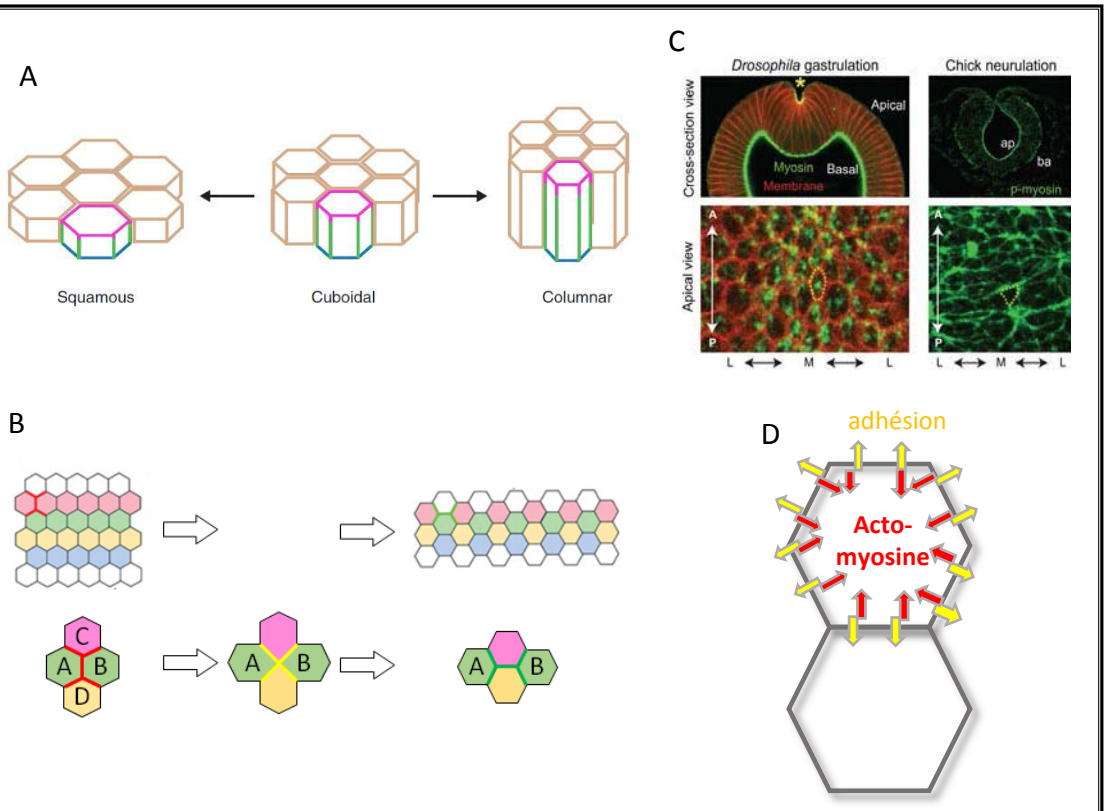


Figure 14 : La morphogénèse est régulée par les protéines de polarité, les jonctions et l'acto-myosine

(**A**) Afin de changer de forme les cellules doivent modifier la taille de leur domaine corticaux. Par exemple, pour devenir prismatique elle doivent allonger leur domaine latéral. (**B**) L'élongation de la bandelette germinative se fait par intercalations cellulaires. Ce processus consiste en un remodelage des jonctions qui permet aux cellules changer de voisines. Deux cellules A et B adjacentes contractent la membrane par laquelle elles adhérent l'une à l'autre (**jonctions rouges**), jusqu'à n'être attachées plus que part un seul point de contact. Cette contraction rapproche et forme un point d'adhésion entre les cellules C et D (**jonctions jaunes**). Ce point de contact entre 4 cellules est ensuite résolu, par l'élongation des membranes de C et D en contact (**jonctions vertes**). Ainsi C et D se sont intercalées entre A et B ce qui entraine l'élongation du tissu. (C) La constriction apicale se fait via la contraction de l'acto-myosine (**C, vert cross view et apical view**). Lors de l'invagination du blastoderme chez la drosophile la contraction se fait au centre du réseau subapical d'actomyosine (**C, gauche, apical view**). Pendant la formation du tube neural du poulet la contraction se fait au niveau de l'anneau d'actine en faisceaux (**C, droite, apical view**). (**D**) La morphogénèse cellulaire est régulée par la balance entre les forces opposées qu'exercent l'adhésion cellulaire (**D, jaune**) et le cytosquelette (**D, rouge**). La première tend à augmenter la surface de contact entre les cellules alors que la deuxième tend à la diminuer.

*Panels **A**, **B** et **C** D'après (Bertet, et al., 2004; Martin and Goldstein, 2014; St Johnston and Sanson, 2011).*

I.3.3. La morphogénèse épithéliale

La morphogénèse regroupe tous les évènements, actifs ou passifs, qui aboutissent à l'établissement de la forme des cellules et des tissus. La morphogénèse va permettre à partir de la cellule œuf le développement de l'organisme en trois dimensions et dans toute sa complexité.

A l'échelle du tissu épithélial un grand nombre de mouvements morphogénétiques ont été décrits : élongation, contraction, invagination, migration, éversion et formation de tubes (**Fig.13**), (Lye and Sanson, 2011; Quintin et al., 2008; St Johnston and Sanson, 2011). Tous ces événements tissulaires impliquent des réorganisations coordonnées, actives ou passives, des cellules qui les composent. Cette réorganisation cellulaire peut être initiée par des cascades de signalisations induites sous l'action des morphogènes et des contacts cellule-cellule, et/ou par des tensions extrinsèques générées par les autres tissus.

Pour former un nouveau tissu ou pour modifier les propriétés du tissu auquel elles appartiennent, les cellules peuvent être amenées à changer de forme globale ou localement. Par exemple, certaines cellules changent de forme en modifiant la taille de leurs domaines corticaux (**Fig.14A**). De nombreux processus morphogénétiques comme l'élongation et l'invagination nécessitent la contraction locale de la cellule. Cette contraction se fait le plus souvent au niveau subapical et fait intervenir les AJ et le cytosquelette d'acto-myosine. C'est le cas notamment lors de l'élongation tissulaire par intercalation : les cellules changent de voisines en remodelant leur adhésion (**Fig.14B**). Ce processus nécessite l'activation planaire polarisée de la myosine II pour la contraction et le remodelage des jonctions (Bertet, et al., 2004). Une autre modification locale est la constriction apicale nécessaire à l'invagination ou

à la formation de tubes (**Fig.13c,e,f,g**), (Martin and Goldstein, 2014). La constriction apicale implique différents types de contraction de l'acto-myosine. Lors de la fermeture du tube neural chez le xénope, le poulet ou la souris, la constriction se fait au niveau de l'acto-myosine en anneau autour de la cellule, alors qu'au cours de l'invagination du blastoderme chez la drosophile la myosine se localise au centre du plan subapical pour contracter le réseau d'actine (**Fig.14C**), (Das et al., 2014; Haigo et al., 2003; Hildebrand, 2005; Martin et al., 2009; Nishimura and Takeichi, 2008).

Les AJ et le cytosquelette d'acto-myosine sont donc au cœur des processus morphogénétiques. Le modèle actuel propose que les jonctions et l'acto-myosine génèrent des forces opposées sur la cellule : la première tend à augmenter la surface de contact entre les cellules alors que la deuxième tend à la diminuer (**Fig.14D**), (Lecuit and Lenne, 2007). Le remodelage des jonctions, la contraction de la myosine et les tensions externes régulent l'équilibre entre ces deux forces. Nous avons vu que le déséquilibre contrôlé de ces forces permet les processus morphogénétiques. Si la balance est rompue par des mutations les cellules peuvent ne plus être capables de résister aux tensions externes et de maintenir leur forme (Tanentzapf et al., 2000; Wang and Riechmann, 2007).

I.4. Modèle d'étude : l'épithélium folliculaire de la drosophile

L'épithélium folliculaire (FE) des ovaires de la drosophile est un excellent modèle pour étudier le développement de ce type de tissu. Les nombreux outils génétiques développés dans cet organisme modèle permettent de modifier facilement et de façon tissu spécifique l'expression d'un ou de plusieurs gènes. Le FE est un épithélium très facile d'accès et abondant, les ovaires occupant la plus grande partie de l'abdomen de la femelle. Il se développe continuellement dans la mouche adulte, ce qui lui confère plusieurs avantages.

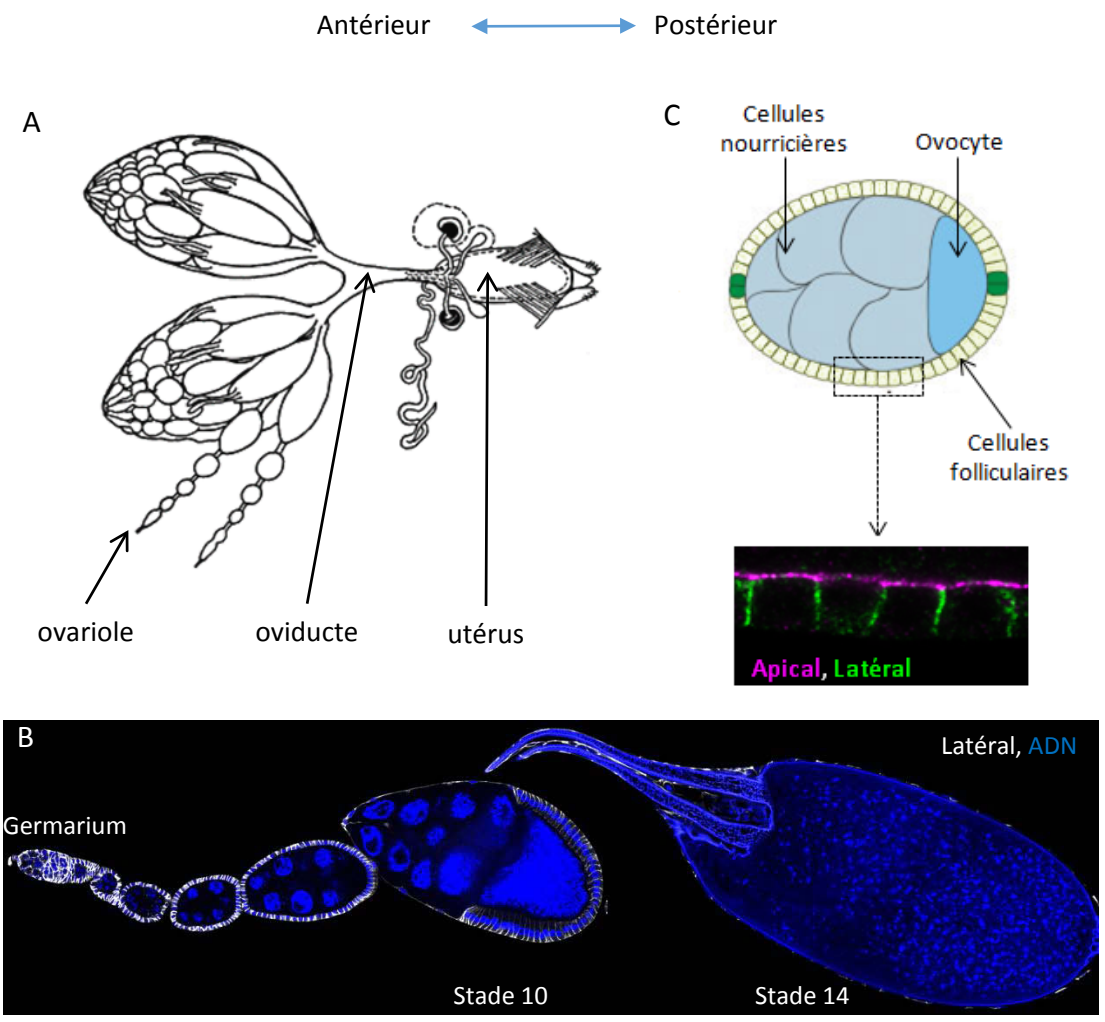


Figure 15 : Structure des ovaires, ovarioles et follicules de la drosophile

Par convention l'antérieur est positionné à gauche et le postérieur à droite des schémas et images de cette figure, et de toutes les futures figures qui montrent des follicules ovariens au sein de ce manuscrit.

(**A**) Schéma représentant une paire d'ovaires de drosophile. Un ovaire est composé de plusieurs ovarioles orientées selon l'axe antéropostérieur de la mouche. Les œufs débouchent dans les oviductes, puis dans l'utérus où il sont fécondés. (**B**) Un ovariole contient un germarium dans lequel sont formés les follicules, et plusieurs follicules qui se développent le long de l'axe antéropostérieur. La maturation des follicules est divisée en 14 stades. (**C**) Un follicule est composé d'un cyste germinal comportant les cellules nourricières et l'ovocyte, et de cellules somatiques folliculaires qui forment un épithélium entourant le cyste. Le cortex apical (**rose**) des cellules folliculaires est orienté vers le cyste.

D'après (Horne-Badovinac and Bilder, 2005; King, 1970 ; Vachias et al., Sous presse).

Tout d'abord, il n'est pas sujet à une contribution maternelle. Il se divise constamment, ce qui permet la génération de tissus mosaïques : les cellules ont différents génotypes et sont observables au sein du même tissu et dans les mêmes conditions. Ensuite, le FE mature au sein d'une succession de follicules à des stades de développement croissants de l'antérieur vers le postérieur. Ainsi les différentes étapes de son développement sont toutes observables en même temps et dans la même structure. De plus, le FE subit de nombreux processus clés du développement des épithéliums : polarisation, prolifération et croissance cellulaire, élongation tissulaire, morphogénèse cellulaire, transition épithélio-mésenchymateuse, migration collective, tubulogénèse, mort cellulaire. Il est donc un modèle de choix pour l'étude du développement épithélial.

I.4.1. Structure des ovaires et ovarioles

Chaque ovaire comporte 16 à 20 ovarioles qui débouchent dans les oviductes. Les ovarioles sont des structures linéaires et orientées composées d'une succession de follicules reliés entre eux par les filaments inter-folliculaires (**Fig.15**), (King, 1970). Chaque follicule (aussi appelé chambre d'œuf ou chambre ovarienne) est composé d'un cyste de 16 cellules germinales, dont l'une est l'ovocyte, entouré par les cellules somatiques folliculaires qui constituent le FE (**Fig.15B**). Le domaine apical des cellules folliculaires (FC) fait face au cyste germinal (**Fig15B**). Les FC sont nécessaires à la maturation de l'ovocyte, elles participent donc à la fertilité de la mouche et au développement normal du futur embryon.

La production continue de follicules est assurée par des groupes de cellules souches au sein de la structure la plus antérieure de l'ovariole appelée le germarium (**Fig.16**). Les follicules se développent lors de leur progression antéro-postérieure (A-P) pour aboutir à la formation d'œufs matures. Leur développement est divisé en 14 stades (Lin and Spradling, 1993).

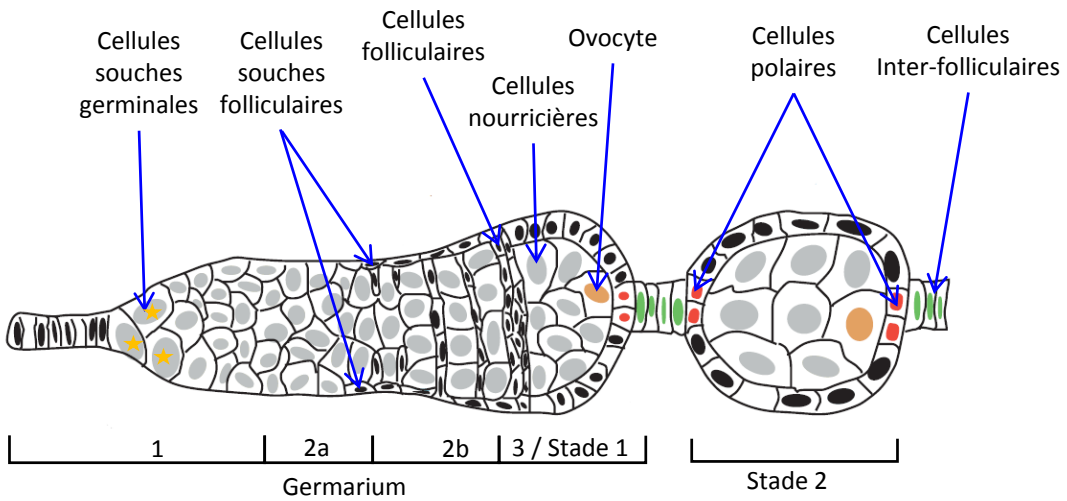


Figure 16 : Formation des follicules ovariens au sein du germarium.

Les cystes germinaux sont produits par la division asymétrique de cellules souches germinales en région 1 du germarium donnant un cytoblaste et une nouvelle cellule souche. Les cytoblastes progressent en se divisant et sont encapsulés par les cellules folliculaires somatiques, issues des cellules souches folliculaires dans la région 2b. Une des 16 cellules du cyste germinal devient l'ovocyte. Ensuite les cellules polaires et les cellules inter-folliculaires se différencient.

D'après (Grammont and Irvine, 2001).

L'œuf mature sort de l'ovariole, traverse les oviductes puis l'utérus où il est fécondé, avant d'être pondu.

I.4.2. Développement du cyste germinal

Dans la région 1 du germarium, c'est-à-dire à son extrémité antérieure, deux cellules souches germinales se divisent alternativement et asymétriquement dans l'axe A-P pour donner naissance à une nouvelle cellule souche antérieure et à un cystoblaste postérieur. Les cellules souches résident dans une niche qui régule leur survie et leur division (Lin and Spradling, 1993; Xie and Spradling, 2000). Le cystoblaste réalise 4 mitoses incomplètes pour former un cyste de 16 cellules germinales connectées par des ponts cytoplasmiques. L'une d'entre elle devient l'ovocyte alors que les quinze autres deviennent des cellules nourricières (**Fig.16**), (Huynh and St Johnston, 2004). Toutes les cellules germinales entrent en méiose, mais seul l'ovocyte y reste alors que les cellules nourricières réalisent des cycles d'endo-réplication (Carpenter, 1975; Huynh and St Johnston, 2000).

Après sa sortie du germarium le cyste entre dans une phase de croissance intense. En effet, au cours des stades précoces le volume du cyste augmente d'environ 30 fois en 30 heures. Cette croissance est dépendante notament des cellules nourricières. Elles produisent de grandes quantités d'ARNm, de protéines et de mitochondries, qui sont acheminés via les ponts cytoplasmiques jusqu'à à l'ovocyte où ils forment la réserve du futur embryon. Au stade 10B les cellules nourricières déversent l'intégralité de leur cytoplasme dans l'ovocyte puis dégénèrent.

L'ovocyte se polarise dans la région 3 du germarium et qui correspond au stade 1 (Bolivar et al., 2001; Huynh et al., 2001). A partir du stade 7 l'ovocyte modifie sa polarité notamment

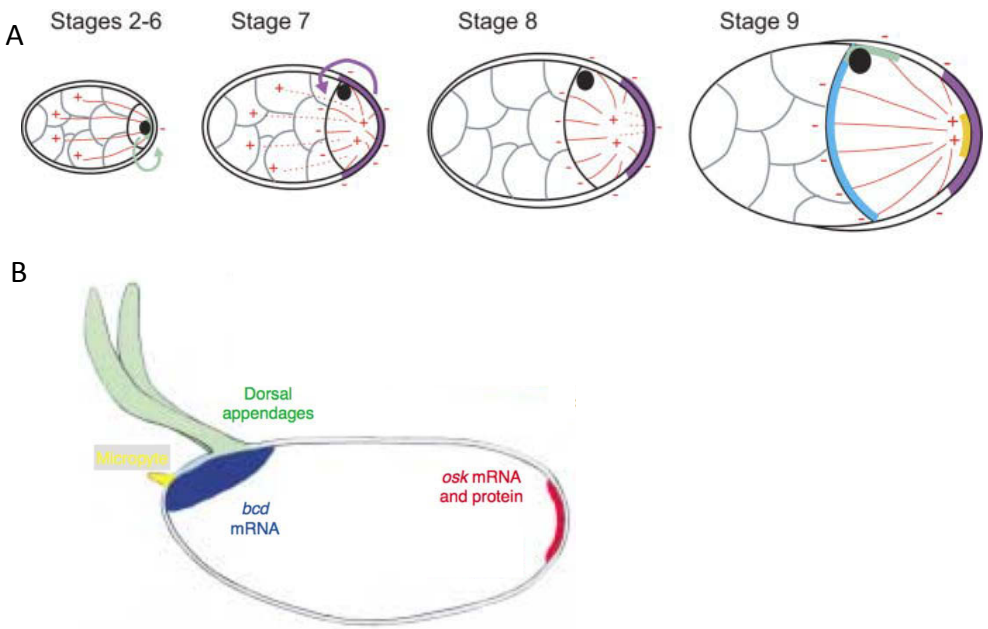


Figure 17 : Polarisation de l'ovocyte et définition des axes développementaux du futur embryon.

(**A**) Pendant les stades 2-6 du développement du follicule ovarien les microtubules de l'ovocyte sont orientés l'extrémité – en postérieur et l'extrémité + dans les cellules nourricières. Gurken (**A, vert**) en postérieur de l'ovocyte induit la différenciation des FC postérieures (**A**, **violet)**. A partir du stade 7, l'ovocyte inverse sa polarité sous l'action d'un signal provenant des FC postérieures. Les microtubules se réorganisent : leurs extrémités + deviennent centrales dans l'ovocyte et les extrémités - partent vers les FC ; ce qui permet la migration du noyau en position antéro-dorsale. Au cours des stades 8 à 9, Gurken devient antérodorsale, les extrémités + des microtubules sont postérieures et les ARNm de *bicoid* (A, **bleu**) et *oskar* (**A, jaune**) se localisent respectivement en antérieur et en postérieur. (**B**) La localisation opposée de *bicoid* (**B, bleu**) et *oskar* (**B, rouge**) définit l'axe A-P du futur embryon.

D'après (Riechmann and Ephrussi, 2001; Steinhauer and Kalderon, 2006).

par la réorganisation des microtubules et la migration antéro-dorsale du noyau (**Fig.17A**), (Clark et al., 1994; Ruohola et al., 1991; Theurkauf et al., 1992; Van Eeden and St Johnston, 1999). La réorganisation de l'ovocyte nécessite la présence des cellules folliculaires. Cette polarisation permet de déterminer les axes développementaux du futur embryon. L'axe A-P est notamment défini via la localisation asymétrique et dépendante des microtubules des ARNm *oskar* et *bicoid*. L'ARN *oskar* se localise en postérieur où seront recrutés les déterminants abdominaux et germinaux, et *bicoid* en antérieur où se formeront la tête et le thorax (**Fig.17B**), (Clark et al., 1997; Ephrussi and Lehmann, 1992; Ephrussi et al., 1991; Frohnhofer and Nüsslein-Volhard, 1986; Kim-Ha et al., 1991; Pokrywka and Stephenson, 1995). L'axe D-V quant à lui est défini via la localisation de la protéine Gurken (et de son ARNm) en position antéro-dorsale (Schüpbach, 1987).

I.4.3. Différenciation et morphogénèse des cellules folliculaires

Différenciation initiale des cellules folliculaires

Deux cellules souches folliculaires sont localisées à l'entrée de la région 2b du germarium de façon diamétralement opposée (**Fig16**), (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). Elles se divisent alternativement pour produire une nouvelle cellule souche et une cellule fille en postérieur. Cette cellule fille est un précurseur de FC. Les précurseurs migrent pour entourer le cyste germinal et le séparer du cyste plus jeune antérieur. Ceci conduit à l'encapsulation du cyste germinal. Les précurseurs se différencient en cellules épithéliales cuboïdes au cours de l'encapsulation quand leur contact avec la lignée germinale permet l'établissement des domaines apical et latéral (**Partie I.3.2**), (Tanentzapf et al., 2000).

Les cellules polaires et les cellules inter-folliculaires sont les premières populations FC à se différencier des autres, en arrêtant de proliférer. A ce stade plusieurs d'entre elles se différencient en cellules pré-polaires, ensuite seulement deux paires de cellules polaires sont conservées. La différenciation et la sélection des cellules polaires requiert l'activation de la voie Notch par son ligand Delta exprimé dans la lignée germinale (Grammont and Irvine, 2001; Vachias et al., 2010). A partir du stade 1, les cellules polaires différenciées sécrètent unpaired le ligand de la voie JAK/STAT qui n'est activable que dans les cellules où la signalisation Notch ne l'est pas (Assa-Kunik et al., 2007). Ceci induit la différenciation des cellules inter-folliculaires. Les cellules inter-folliculaires relient les chambres d'œuf de l'ovariole en adhérant aux BMs de deux follicules adjacents. Une paire de cellules polaires est retrouvée à l'extrémité antérieure et postérieure de chaque follicule.

Prolifération et définition de plusieurs populations de cellules folliculaires

A sa sortie du germarium par bourgeonnement le cyste germinal a cessé de se diviser et croit, il est alors recouvert d'une centaine de FC. Pour accompagner la croissance du cyste les FC prolifèrent. Elles réalisent 5 à 6 cycles mitotiques (Margolis and Spradling, 1995). Cette phase de division s'arrête au stade 6, ensuite les FC effectuent trois cycles d'endoréplication. La transition prolifération-endoréplication est régulée par la voie Notch via l'augmentation de l'expression de Delta dans la lignée germinale (Deng et al., 2001; Lopez-Schier and St Johnston, 2001). La croissance et la différenciation des lignées germinale et somatique sont coordonnées (Vachias et al., sous presse). En effet, l'accélération ou le ralentissement de la croissance d'un des deux tissus par des moyens génétiques induit l'accélération ou le ralentissement de la croissance et de la différenciation de l'autre tissu.

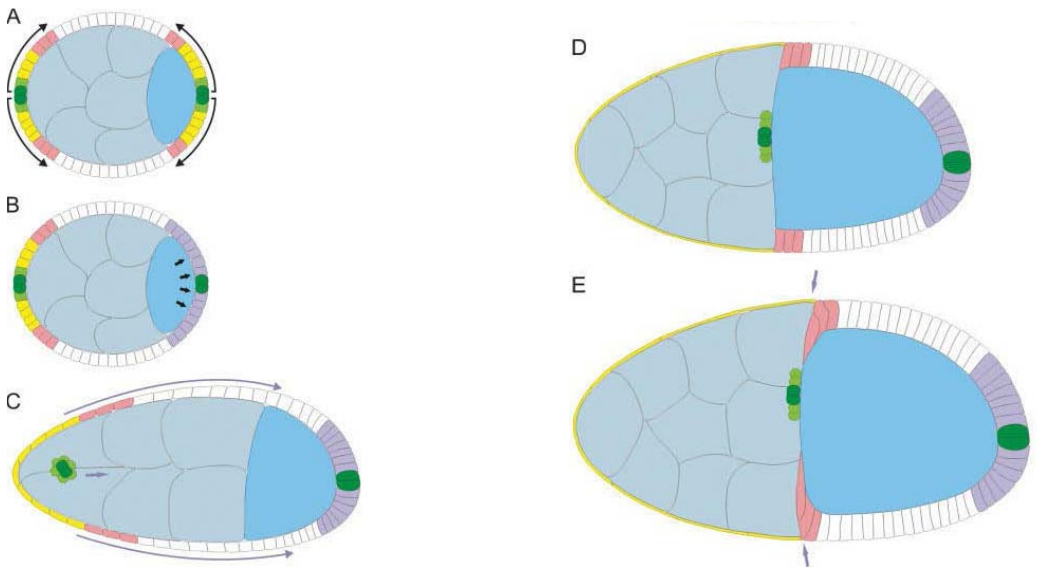


Figure 18 : La différenciation et la morphogénèse des cellules folliculaires des stades 6 à 10B.

(**A**) Au stade 6, la sécrétion de unpaired par les cellules polaires (**vert foncé**) induit la différenciation des FC en cellules terminales et centrales. Les FC deviennent en fonction de leur éloignement des polaires : des cellules de bordure (**vert clair**), des cellules squameuses (**jaune**), des cellules centripètes (**rose**) et des cellules centrales (**blanc**). (**B**) Ensuite, la localisation postérieure de Gurken dans l'ovocyte induit la différenciation des cellules postérieure en FC terminales postérieures (**B, violet**). (**C**) Au stade 9 les cellules de bordure et les polaires antérieures réalisent une transition épithélio-mésenchymateuse puis migrent entre les cellules nourricières vers l'ovocyte. Les cellules squameuses s'aplatissent de l'antérieur vers le postérieur, le front d'aplatissement correspondant à la localisation des cellules de bordure. (**D**) Au stade 10A les cellules de bordure ont atteint la face antérieure de l'ovocyte, les cellules nourricières ne sont recouvertes que par les cellules squameuses. Les cellules centripètes, centrales et postérieures qui sont devenues prismatiques recouvrent l'ovocyte. (**E**) Au stade 10B les cellules centripètes migrent entre l'ovocyte et les cellules nourricières pour rejoindre les cellules de bordure.

D'après (Horne-Badovinac and Bilder, 2005).

Au stade 6, trois populations de FC se différencient : les FC terminales antérieures, les FC centrales et les FC terminales postérieures (**Fig.18A,B**), (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). Les cellules polaires agissent comme un centre organisateur de la différenciation du follicule puisque se sont-elles qui induisent dans un premier temps la différenciation de ces trois populations de FC (Grammont and Irvine, 2002). Les cellules terminales antérieures et postérieures se différencient autour des cellules polaires de façon dépendante de l'activation de la voie JAK/STAT par unpaired en fonction de leur éloignement des cellules polaires. Les cellules les plus éloignées, qui ne reçoivent pas unpaired, deviennent les FC centrales (**Fig18A**). En antérieur les cellules terminales sont subdivisées en trois groupes : les cellules de bordure, les cellules squameuses et les cellules centripètes (**Fig.18B**), (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). Les cellules terminales en contact avec l'ovocyte comportent aussi plusieurs populations mais adoptent finalement toutes une identité commune postérieure au stade 7 (**Fig.18B**), (González-Reyes and St Johnston, 1998). La différenciation des cellules postérieures est médiée par la protéine Gurken exprimée par l'ovocyte et qui active le récepteur EGF présent dans les cellules FC.

La morphogénèse des FC

Le FE subit de nombreuses modifications morphogénétiques à partir du stade 9 (**Fig.18C,D,E**), (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). En antérieur les cellules de bordure et les cellules polaires se détachent de l'épithélium par une transition épithélio-mésenchymateuse, puis migrent entre les cellules nourricières vers le postérieur jusqu'à atteindre la face antérieure de l'ovocyte au stade 10 (**Fig18C,D**). Ces cellules formeront plus tard le micropyle. Alors que les FC étaient cuboïdes jusqu'à ce stade, les cellules au contact de l'ovocyte deviennent prismatiques et les cellules au contact des cellules nouricières

deviennent squameuses. L'aplatissement des cellules squameuses s'effectue de l'antérieur vers le postérieur de façon concomitante avec la migration des cellules de bordure (**Fig.18C**). Cet aplatissement est régulé par la voie Notch et implique notamment le désassemblage progressif des AJ (Grammont, 2007). Au stade 10A les cellules squameuses recouvrent les cellules nourricières, alors que les cellules centripètes, les cellules centrales et les cellules terminales postérieures recouvrent l'ovocyte (**Fig.18D**).

Au stade 10B les cellules centripètes migrent entre l'ovocyte et les cellules nourricières, pendant que celles-ci déversent leur contenu dans l'ovocyte, et rejoignent les cellules de bordure (**Fig.18E**), (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). A la fin du stade 10B l'ovocyte est entièrement recouvert par les FC. Ensuite les cellules nourricières et les cellules squameuses dégénèrent. A ce stade une nouvelle vague de différenciation des FC dépendante de la sécrétion dorsale de Gurken, définit l'axe dorso-ventral et conduit à la formation des appendices dorsaux par tubulogénèse au cours des stades 11 à 14. Les autres FC s'aplatissent de l'antérieur vers le postérieur, sécrètent la membrane vitelline et le chorion, puis dégénèrent à leur tour.

L'ovogénèse aboutie donc à la formation d'un œuf qui possède toutes les structures et la forme nécessaires à sa fécondation, et dans lequel les axes développementaux du futur embryon sont déterminés (**Fig.17B**).

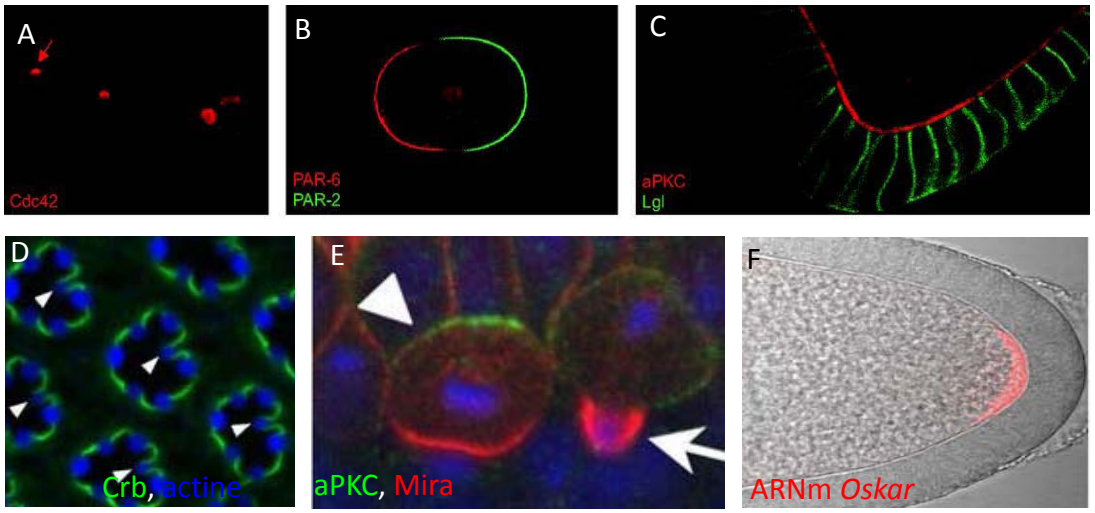


Figure 19 : Exemple de cellules polarisées.

La polarité cellulaire est caractérisée par la localisation asymétrique de protéines ou d'ARN comme on peut le voir sur ces images par la détection de différents marqueurs de la polarité. Plusieurs exemples de cellules polarisées sont présentées ici : levures *S.cerevisae* (**A**) , Cellule œuf de C.elegans (**B**) ou encore chez la drosophile des cellules folliculaires (**C**), des photorécepteurs (**D**), des neuroblastes (**E**), et un ovocyte (F).

D'après (Doerflinger et al., 2006; Ogawa et al., 2009; Richard et al., 2009; Thompson, 2013).

II. Les acteurs de la polarité

De nombreux organismes et types cellulaires sont polarisés. Parmi eux, nous pouvons citer les embryons et ovocytes invertébrés, les cellules en migration, les neuroblastes et les neurones ou encore les photorécepteurs (exemples : **Fig.19**). Remarquablement la polarisation de chacun de ces types cellulaires fait intervenir les mêmes acteurs, qui sont très conservés au cours de l'évolution (**Fig.20**), (Tepass, 2012). Les mécanismes moléculaires qu'ils font intervenir sont encore très étudiés. De nouvelles interactions protéiques et processus de régulation sont régulièrement identifiés, montrant la complexité de la régulation de polarité cellulaire.

La nature des protéines des réseaux apical et latéral est similaire. A chacun de ces domaines on retrouve des protéines d'adhésion ou « d'échafaudage » transmembranaires comme Crumbs en apical. Elles s'associent en intracellulaire avec des protéines PDZ (Post synaptic density 95/Disc large/Zonula occludens 1), des protéines de la famille MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase), des protéines FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) et des protéines de signalisation. Les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine (ou protéine-lipide) qui peuvent se fixer à des motifs de liaison correspondant généralement aux cinq derniers acides aminés de la protéine partenaire, ou à d'autres domaines PDZ. Les protéines de la famille MAGUK sont caractérisées par la présence des domaines SH3 (Src Homology region 3), Hook et GUK (GUanylate Kinase). Le domaine Hook est un domaine d'interaction aux protéines FERM et le domaine GUK code un domaine catalytique inactif.

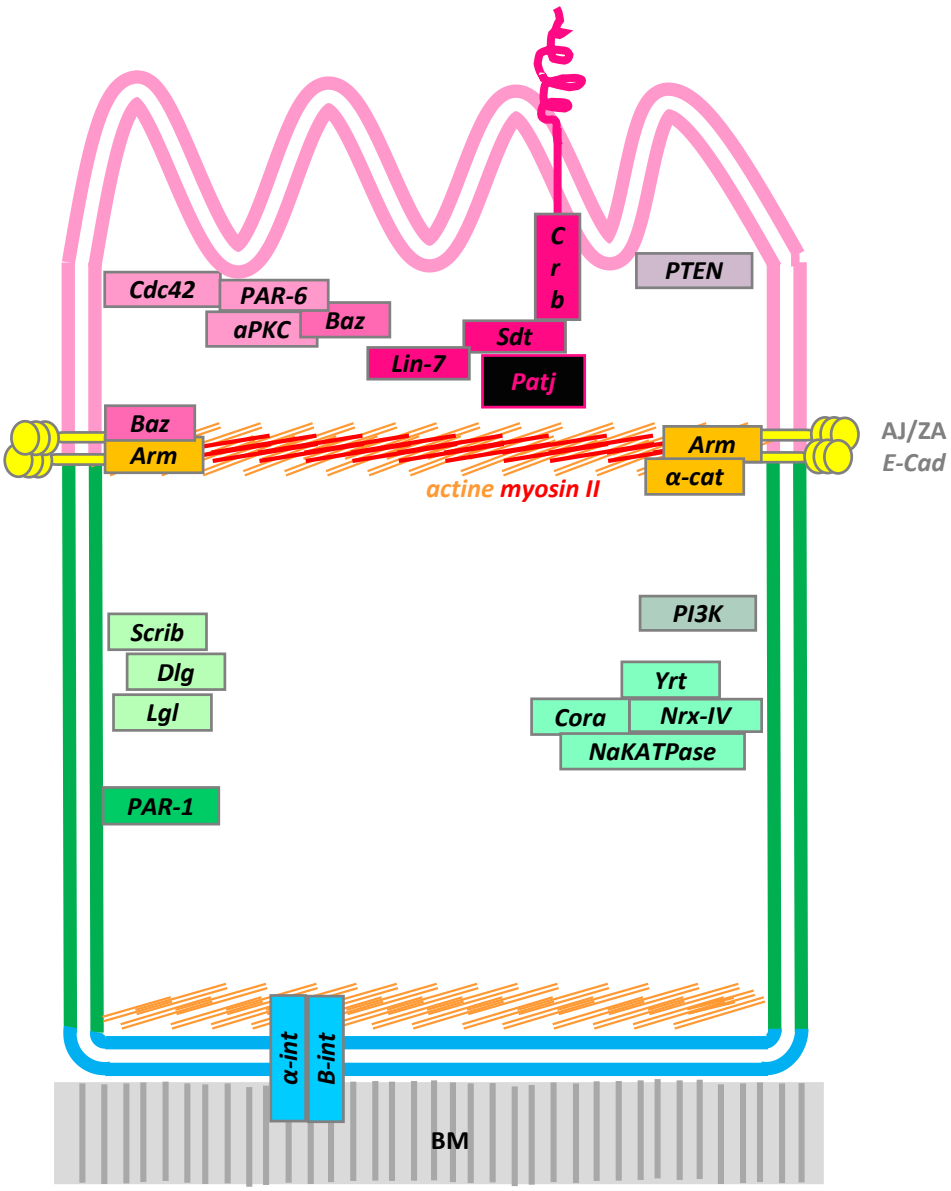


Figure 20 : Les acteurs de la polarité apico-basale des cellules épithéliales.

Le domaine basal (**bleu**) comprend les intégrines (αβ-int). Le domaine latéral (**vert**) est régulé par les modules Scribble – Disc Large – Lethal giant Larvae (Scrib, Dlg, Lgl), Yurt – Coracle – Neurexine IV – NaKATPase (Yurt, Cor, Nrx-IV, NaKATPase) et PAR-1. Les jonctions d'adhérence subapicales (**jaune**) sont composées notamment d'E-Cadhérine (E-cad), d'Armadillo (Arm) et d'α-caténine (α-cat). Elles s'associent avec le cytosquelette d'acto-myosine (**rouge, orange**) et Bazooka (Baz). Elles constituent la frontière entre les domaines latéral et apical. Le domaine apical et la zone marginale (**rose**) comportent schématiquement deux complexes protéiques : le complexe PAR composé de Cdc42, PAR-6, aPKC et Baz, et le complexe Crumbs composé de Crumbs (Crb), Stardust (Sdt), Patj et Lin-7. De plus les enzymes PTEN et PI3K participent à la définition des domaines apical et latéral en régulant la composition en lipides de la membrane.

Ensemble les protéines de polarité définissent les domaines corticaux et sont en étroite relation avec les petites GTPases pour réguler le trafic cellulaire, le cytosquelette, les jonctions, l'orientation de la division cellulaire, la prolifération, la survie et la croissance.

II.5. Les protéines PAR

II.5.4. Les protéines PAR polarisent l'embryon de *C.elegans*

En 1988, Ken Kemphues et ses collègues ont réalisé un crible de mutations affectant l'asymétrie de la première division de la cellule embryon de *C.elegans* (**Fig.21A**), (Kemphues et al., 1988). Les gènes altérés par ces mutations ont été nommés PAR-1 (PARtitioning defective-1) à PAR-6 (Kemphues et al., 1988). Les gènes PAR-1 et PAR-4 (LKB1, Liver Kinase B1) codent des Serine/Thréonine kinases, PAR-5 une protéine de type 14.3.3, PAR-3 (Baz) et PAR-6 des protéines PDZ, et PAR-2 une protéine à domaine RING (Really Interesting New Gene) non conservée au cours de l'évolution (St Johnston and Ahringer, 2010). Par la suite les homologues d'aPKC (Atypical Protein Kinase C / PKC-3 chez *C.elegans*), qui s'associe avec PAR-3 et PAR-6 chez les mammifères, et de Cdc42 découverte chez la levure, ont été identifiés chez *C.elegans* comme affectant aussi la division asymétrique (Gotta et al., 2001; Tabuse et al., 1998).

Contrairement à celui de la drosophile l'ovocyte de *C.elegans* n'est pas polarisé. L'axe A-P de l'embryon est défini au début du cycle de la première mitose (Goldstein and Hird, 1996). La première étape de polarisation est réalisée par la déstabilisation postérieure du cytosquelette d'acto-myosine (**Fig.21B**), (Cowan and Hyman, 2004; Cuenca et al., 2003; O'Connell et al., 2000; Wallenfang and Seydoux, 2000). Cette déstabilisation est induite par

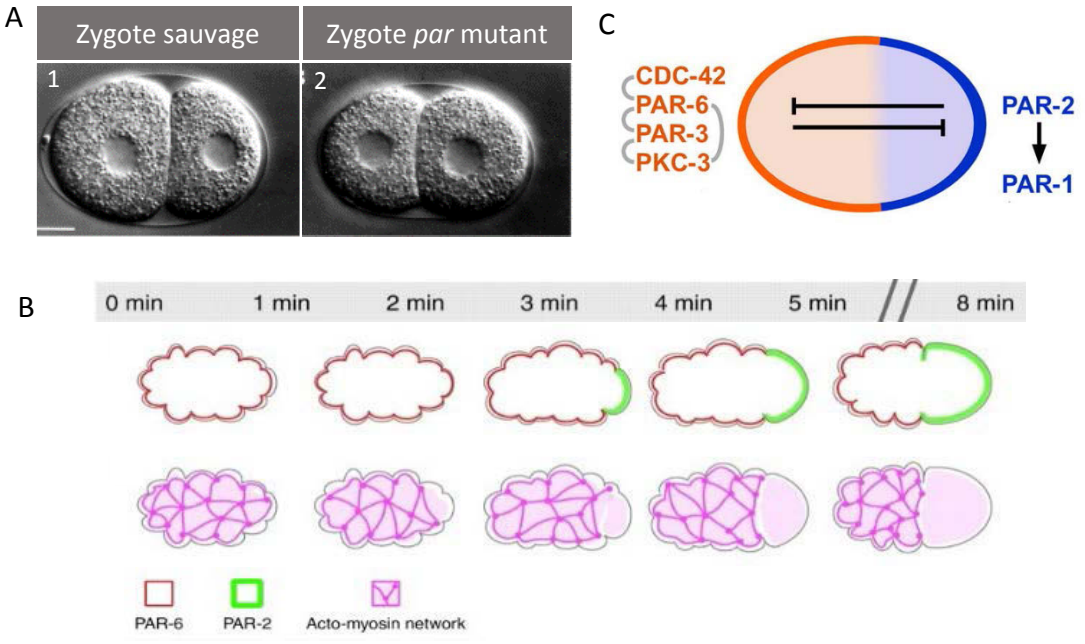


Figure 21 : La polarisation de l'embryon de C.elegans.

(**A**) La première division du zygote de C.elegans est asymétrique conduisant à la formation de deux cellules filles de taille et d'identité différentes en contexte sauvage (**A1**). Si l'embryon est mutant pour un des gènes *par* alors cette division devient symétrique (**A2**). (**B**) La polarisation de l'embryon de C.elegans se fait en quelques minutes avant la première division. Au départ PAR-6 (**rouge**) et le cytosquelette d'acto-myosine (**rose**) sont homogènes, puis le cytosquelette est déstabilisé en postérieur. En se contractant le cytosquelette devient de plus en plus antérieur et entraîne l'accumulation de PAR-6 en antérieur. PAR-2 (**vert**) se localise alors en postérieur. (**C**) Cette première polarisation est ensuite renforcée par l'action des complexes PAR antérieur et postérieur. Cdc42, PAR-6, PAR-3 et PKC-3 se régulent positivement et inhibent le complexe PAR postérieur pour empêcher son expansion dans le domaine antérieur. En postérieur, PAR-2 recrute PAR-1 et ensemble ils inhibent le complexe PAR antérieur.

D'après (Cowan and Hyman, 2007; Goldstein and Macara, 2007; Kemphues et al., 1988).

un signal inconnu, émanant du centrosome paternel localisé en postérieur. Elle pourrait se faire via l'inhibition de Rho (Jenkins et al., 2006).

La seconde étape de polarisation est réalisée par les protéines PAR (**Fig.21B,C**). PAR-3/PAR-6/PKC-3 et Cdc42 qui, initialement réparties uniformément le long du cortex, s'accumulent en antérieur, autorisant le recrutement postérieur de PAR-1 et PAR-2. La localisation asymétrique des protéines PAR est dépendante du cytosquelette, puisque son altération empêche le déplacement antérieur du complexe PAR-3 (Aceto et al., 2006; Cuenca et al., 2003; Motegi and Sugimoto, 2006; Munro et al., 2004; Schonegg and Hyman, 2006).

Après sa mise en place, l'asymétrie perdure par des exclusions mutuelles et des régulations positives entre les protéines PAR, Cdc42 et PKC-3 (**Fig.21C**). La localisation antérieure du complexe PAR-3 est maintenue via sa régulation positive par Cdc42, et la déstabilisation de Cdc42 par sa GAP en postérieur (Gotta et al., 2001; Kay and Hunter, 2001; Kumfer et al., 2010). PAR-1 et PAR-2 sont exclues du domaine antérieur par PKC-3 qui phosphoryle PAR-2 (Hao et al., 2006). Avant l'établissement de l'asymétrie, le complexe PAR-3 pourrait donc inhiber le recrutement de PAR-2 en postérieur. Cependant PAR-2 est toujours capable de se localiser en postérieur si le complexe PAR-3 n'est pas retiré du cortex dans les embryons mutants pour *rho* (Jenkins et al., 2006; Schonegg and Hyman, 2006). Récemment il a été montré que le centrosome paternel protège localement PAR-2 de la phosphorylation par PKC-3, autorisant le recrutement cortical de PAR-1 (Boyd et al., 1996; Motegi et al., 2011). En plus de recruter PAR-1, PAR-2 participe au maintien de la polarité en régulant la myosine II négativement et les microtubules (Colombo, 2003; Gotta et al., 2003; Munro et al., 2004; Tsou et al., 2002). PAR-1 inhibe la localisation postérieure du complexe PAR antérieur, en phosphorylant PAR-3 (Motegi et al., 2011). Dans les mutants *par-1* le domaine postérieur

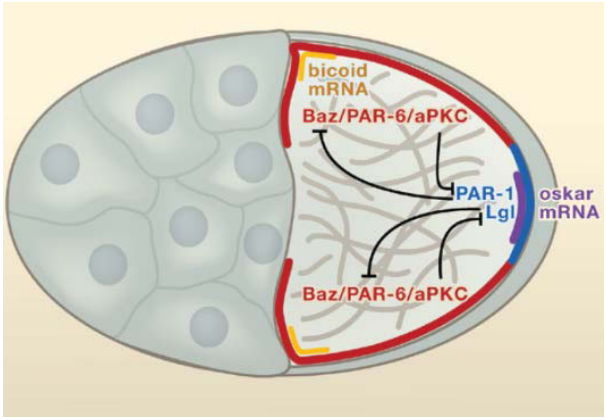


Figure 22 : La polarisation de l'ovocyte de la drosophile.

A partir du stade 7 de l'ovogénèse de la drosophile la polarité définitive de l'ovocyte est mise en place par l'orientation des microtubules, la localisation asymétrique de *oskar* (**violet**) et *bicoid (***jaune***)*, et des protéines PAR. La polarité est possible via les exclusions mutuelles et les régulations positives au sein des complexes PAR. En postérieur, PAR-1 (**bleu**) est recrutée sous l'action de Slimb (non représentée). PAR-1 et Lgl (**bleu**) inhibent le complexe PAR antérieur composé de Baz/PAR-3, aPKC et PAR-6 (**rouge**). En retour, aPKC inhibe PAR-1 et Lgl en les phosphorylant.

D'après (St Johnston and Ahringer, 2010).

n'est cependant pas totalement aboli mais est réduit en taille (Cuenca et al., 2003). La mutation *par-4* induit les mêmes défauts mais ils sont plus faibles, *par-4* codant une kinase activatrice de PAR-1 (Morton et al., 1992; Watts et al., 2000). PAR-1 et PAR-4 jouent donc un rôle important dans le maintien de l'asymétrie de la cellule œuf. PAR-5, qui ne montre pas de localisation asymétrique, régule aussi la taille des domaines antérieur et postérieur de façon dose dépendante probablement en régulant les interactions entre les autre protéines PAR (Mikl and Cowan, 2014; Morton et al., 2002).

II.5.5. La polarisation de l'ovocyte de la drosophile

La polarisation définitive de l'ovocyte de la drosophile débute au stade 7 de l'ovogénèse. Elle est induite par un signal inconnu provenant des FC terminales postérieures. Même si elle ne semble pas impliquer une première étape dépendante du cytosquelette d'acto-myosine et que PAR-2 n'est pas conservée chez la drosophile, cette polarisation est dépendante des protéines PAR et nécessite les mêmes mécanismes d'exclusion mutuelle que dans l'embryon de *C.elegans*. Elle permet de définir l'axe A-P du futur embryon par la localisation opposée des ARNm de *bicoïd* et *oskar*. La localisation de ces deux ARN est dépendante de l'orientation des microtubules, de la dynéine et de la kinésine (Brendza, 2000; Weil et al., 2006; Zimyanin et al., 2008). Les extrémités – se localisent en antérieur et les + en postérieur, PAR-1 permettant le maintien des extrémités + en postérieur (Doerflinger et al., 2006; Doerflinger et al., 2010; Shulman et al., 2000). Les protéines PAR jouent donc un rôle essentiel dans l'établissement de l'axe A-P.

PAR-1 se localise en postérieur et en exclut Baz-PAR-6-aPKC en phosphorylant Baz, alors que le complexe Baz se localise en antérieur où aPKC phosphoryle PAR-1 pour l'exclure (**Fig.22**), (Benton and St Johnston, 2003a; Doerflinger et al., 2006; Doerflinger et al.,

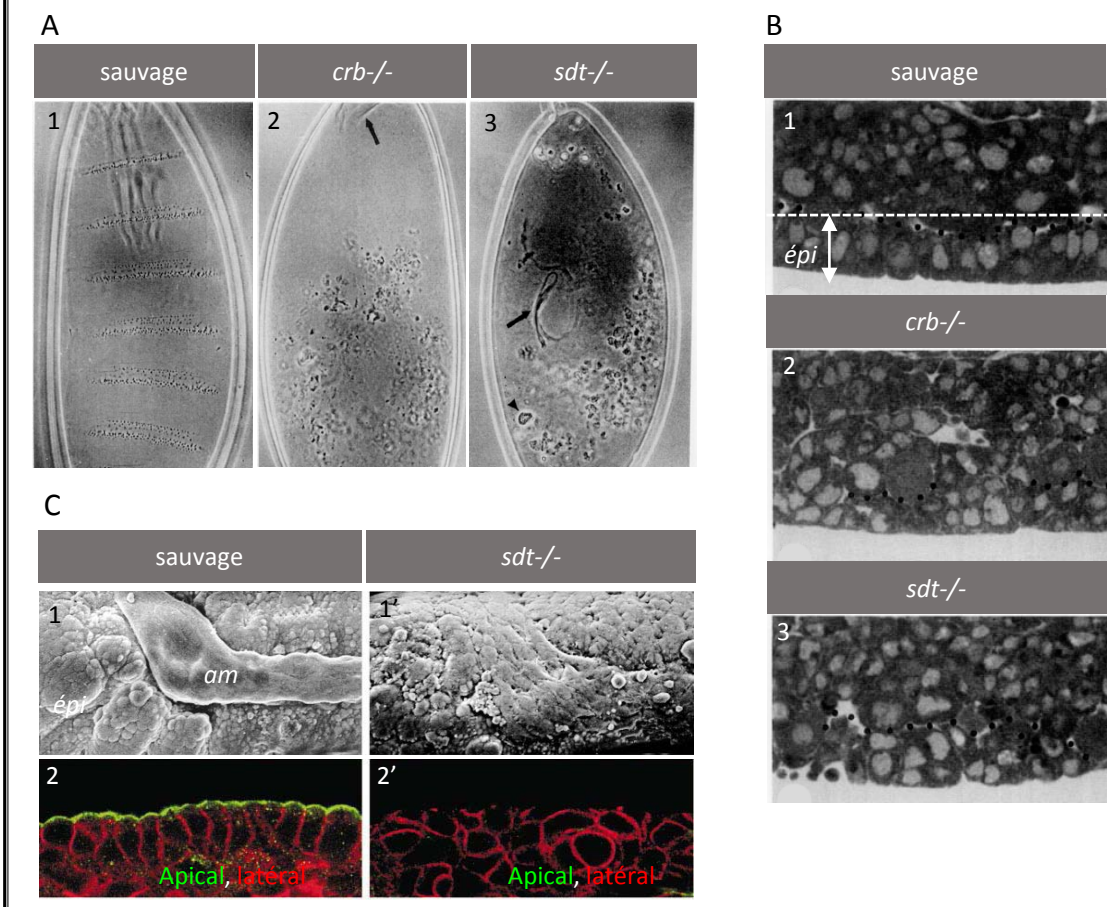


Figure 23 : Crumbs et Stardust sont requises pour la définition du domaine apical.
(**A**) La cuticule d'embryons mutants pour *crb* ou *sdt* paraît émiettée (**A2,A3**), comparée à la cuticule d'un embryon sauvage (**A1**). Les défauts de cuticule témoignent de la perte de l'intégrité de l'épiderme, l'épithélium qui la sécrète (**B1, épi, flèche**). (**B,C**) En microscopie électronique on observe que l'épiderme (**B2, B3, épi C1-C1'**) et l'amioséreuse (**am C1, C1'**) sont désorganisés dans les mutants *crb* ou *sdt*. Cette désorganisation est causée par la perte du domaine apical. En microscopie confocale, on voit que le marqueur apical est perdu (**C2', vert)**, les cellules deviennent rondes et le marqueur latéral (**C2'rouge**) s'étend tout le long du cortex. Crb et Sdt sont donc requises pour la polarité des cellules épithéliales, et plus particulièrement pour la définition du domaine apical.
D'après (Klebes and Knust, 2000; Tepass and Knust, 1993).

2010; Hurov et al., 2004). L'hypothèse pour expliquer la mise en place de l'asymétrie des protéines PAR est qu'une protéine serait recrutée en postérieur où elle déstabiliserait le complexe Baz et autoriserait la localisation de PAR-1. Lgl (Lethal Giant Larvae 2) a été proposée comme remplissant ce rôle, cependant sa mutation ne cause pas de défauts majeurs dans la polarité de l'ovocyte (**Fig.22**), (Tian and Deng, 2008). Récemment la mutation *slimb* a été identifiée comme affectant localisation de PAR-1 et l'exclusion du complexe Baz du domaine postérieur (Morais-de-Sa et al., 2014). Ici Slimb, qui code une E3 ligase, semble donc remplir la même fonction que PAR-2 chez *C.elegans* en déstabilisant le complexe PAR-3 et localisant PAR-1.

II.6. Les protéines de polarité apicales

Un grand nombre de protéines participant à la définition du domaine apical ont été identifiées. Parmi elles sont retrouvées dans la zone marginale les protéines du complexe Crumbs (Crb-Sdt-Lin-7-Patj) et du complexe PAR (Cdc42-Baz-PAR-6-aPKC), (**Fig.20**). Les protéines des AJ E-Cad et Arm, sont aussi impliquées dans la polarité (**Fig.20**).

II.6.1. Crumbs : déterminant clé du domaine apical

La cuticule qui protège l'embryon de drosophile est sécrétée par l'épiderme. La mutation de gènes affectant le développement précoce et/ou la formation de l'épiderme provoque des défauts dans la sécrétion de cette cuticule. Un crible génétique recherchant des mutations altérant l'organisation de la cuticule a permis d'identifier le gène *crb* (Jürgens et al., 1984). Les cuticules des mutants *crb* sont comme émiettées (**Fig.23A2**). En 1990, Ulrich Tepass a mis en évidence que la mutation *crb* induit la désorganisation de l'épiderme et des épithéliums qui en sont dérivés (**Fig.23B3**), (Tepass et al., 1990). Cette désorganisation se

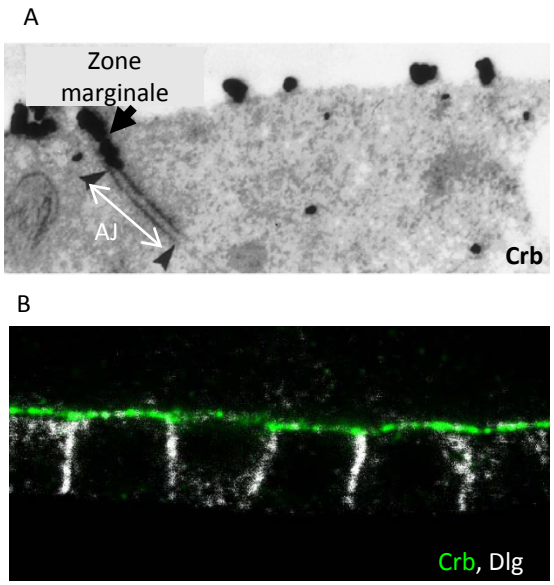


Figure 24 : Localisation de Crb dans les cellules épithéliales.
Marquage de Crb dans l'épiderme observé en microscopie électronique a transmission (**A, grains noirs**) ou dans les cellules folliculaires observées en microscopie confocale (**B, vert**). Crb se localise au cortex apical des cellules épithéliales (**A,B**), il est dense au niveau de la zone marginale et se répartit en spots tout le long de la membrane apicale (**A**).
*Panel **A** D'après (Tepass, 1996).*

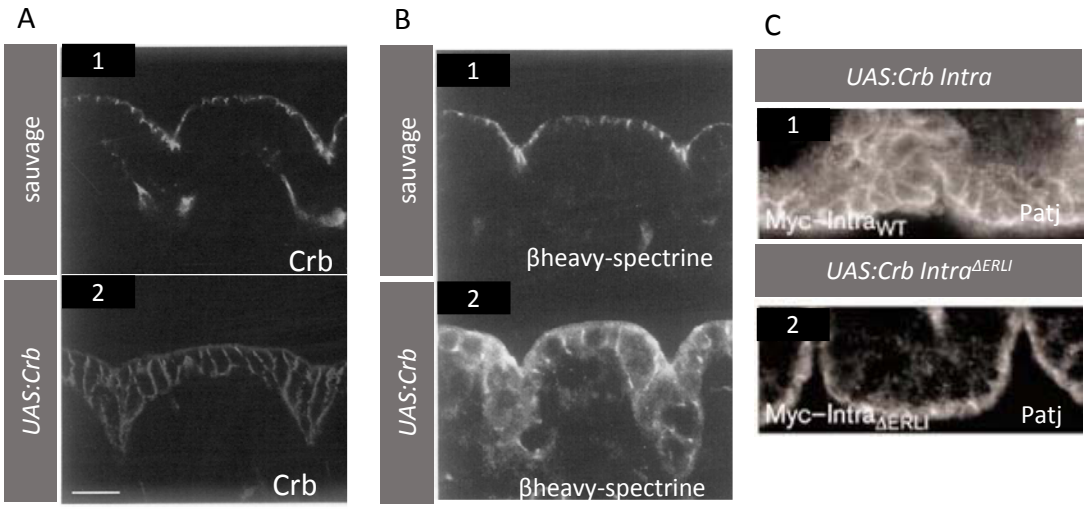


Figure 25 : La surexpression de Crb ou de son domaine intracellulaire induit l'expansion de domaine apical de façon dépendante du motif ERLI.
(**A,B**) Lorsqu'elle est surexprimée la protéine Crb (**A2**) se localise ectopiquement au cortex latéral des cellules épithéliales où elle induit l'expansion du domaine apical comme on peut le voir avec un marquage βHeavy-spectrine (**B2**). Ceci induit la perte de polarité des cellules. (**C**) De même la surexpression du domaine intracellulaire a un effet gain de fonction (**C1**), mais cet effet est aboli par la mutation du motif ERLI (**C2**). Crb et son motif ERLI sont donc capables d'induire la définition du domaine apical.
D'après (Klebes and Knust, 2000; Wodarz et al., 1995).

traduit par la perte de la forme des cellules, qui deviennent arrondies (**Fig.23B,C**). N'étant plus orientées elles meurent ou se divisent anarchiquement conduisant à la formation d'un épithélium multicouche (**Fig.23C2'**). Ce défaut est caractéristique de la perte de polarité des cellules épithéliales. Dans ces mêmes travaux, le profil d'expression de Crb dans l'embryon a été analysé. Crb n'est détectable dans les épithéliums qu'à partir de la gastrulation et n'est donc pas requis pour la polarisation initiale du blastoderme. Plus tard, l'expression de Crb est perdue dans les cellules épithéliales qui vont délaminer comme les précurseurs du système nerveux et dans quelques autres épithéliums. La protéine Crb se localise asymétriquement dans toutes les cellules où elle est présente. Dans les cellules épithéliales Crb s'accumule dans la zone marginale, mais se localise aussi de façon ponctuée le long du cortex apical (**Fig.24A,B**). La corrélation entre la perte de polarité dans les mutants *crb* et la localisation apicale de la protéine, ont permis aux auteurs de proposer Crb comme le premier déterminant apical identifié (Tepass et al., 1990). En effet, le domaine apical n'est plus spécifié dans les cellules mutantes pour *crb* (Wodarz et al., 1993). De plus, la surexpression de *crb* conduit aussi à la perte de polarité de l'épiderme, ici causée par l'expansion du domaine apical : Crb se localise anormalement à la membrane latérale (**Fig.25A**) et avec lui d'autres marqueurs apicaux comme la βheavy-spectrine (**Fig.25B**). Crb est donc suffisant pour déterminer le domaine apical des cellules épithéliales (Wodarz et al., 1995).

Crumbs est une grande protéine transmembranaire, la seule du réseau de polarité apical (**Fig.26A**). Sa partie extracellulaire est composée de répétitions de domaines EGF alternés avec des domaines laminine G. La partie intracellulaire C-terminale est très petite (37 acides aminés), mais contient plusieurs motifs essentiels aux fonctions de Crb. Le premier est le motif de liaison aux protéines FERM (motif FERM), (**Fig.26A**). Le second

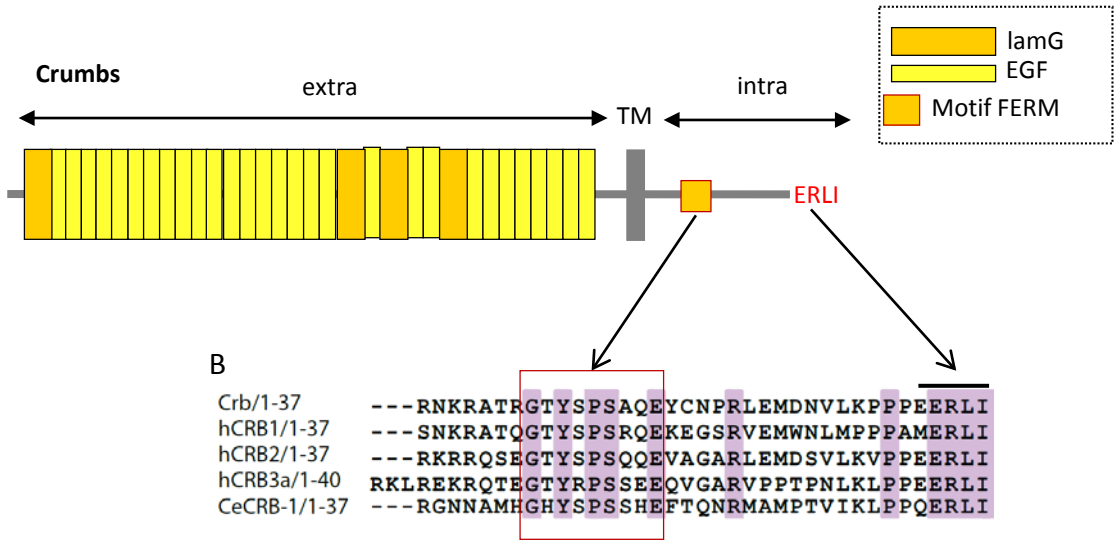


Figure 26 : Structure et conservation de la protéine Crumbs.

(**A**) Crb contient un long domaine extracellulaire (**A, extra**) composé de répétitions EGF et de domaines laminine G, un domaine transmembranaire (**A,TM**), et un domaine intracellulaire de 37 acides aminés (**A, intra**). Le domaine intracellulaire possède deux motifs particuliers : le motif FERM et le motif PDZ « ERLI ». Le domaine intracellulaire de Crb est essentiel à sa fonction. (**B**) Il est très bien conservé au cours de l'évolution surtout au niveau des motifs FERM et ERLI, comme on peut le voir sur l'alignement entre Crb de drosophile, les trois Crb humains (hCRB1, hCRB2, hCRB3a) et CRB de *C.elegans*.

*Panel **B** D'après (Tepass, 2012).*

correspond aux quatre derniers acides aminés « ERLI » et constitue un motif PDZ. La partie intracellulaire, associée à la partie transmembranaire (Crb-intra), sauve le phénotype embryonnaire de *crb* dans la même proportion que la protéine totale (Klebes and Knust, 2000). La surexpression de Crb-intra provoque aussi l'expansion du domaine apical comme celle de Crb entière, dans les épithéliums embryonnaires et le FE (**Fig.25C1**). Ainsi, il est suffisant pour induire un gain de fonction de Crb dans un fond génétique sauvage pour *crb* endogène (Klebes and Knust, 2000; Tanentzapf et al., 2000; Wodarz et al., 1995). Le domaine Crb-intra est très conservé entre la protéine CRB de *C.elegans*, les 3 protéines Crb humaine et celle de la drosophile (**Fig.26B**). De plus, la surexpression du domaine intracellulaire de CRB1 humain chez la drosophile à le même effet gain de fonction que celle de Crb-intra (Den Hollander et al., 2001). Dans l'épiderme de la drosophile, l'effet gain de fonction de la surexpression de Crb-intra est aboli si le motif ERLI est délété (Crb-Intra$^{\Delta ERLI}$), (**Fig.25C2**), mais n'est pas affecté par la mutation du motif FERM (Klebes and Knust, 2000; Wodarz et al., 1995). De plus, *crb*$^{\Delta ERLI}$ n'est pas capable de sauver les mutants *crb* (Klebes and Knust, 2000; Klose et al., 2013). Ensembles ces données montrent que le motif ERLI est requis pour la définition du domaine apical.

Le motif ERLI interagit notamment avec le domaine PDZ de Stardust (Sdt), (PALS1/MPP5 chez les mammifères), (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Kempkens et al., 2006; Roh et al., 2002). La mutation de *sdt* produit les mêmes défauts que celle de *crb* dans l'embryon (**Fig.23A3,B3,C**), (Tepass and Knust, 1993). La double mutation de *crb* et *sdt* n'aggrave pas les défauts comparativement aux mutations *crb* ou *sdt* seule, indiquant qu'ils appartiennent à la même voie génétique.

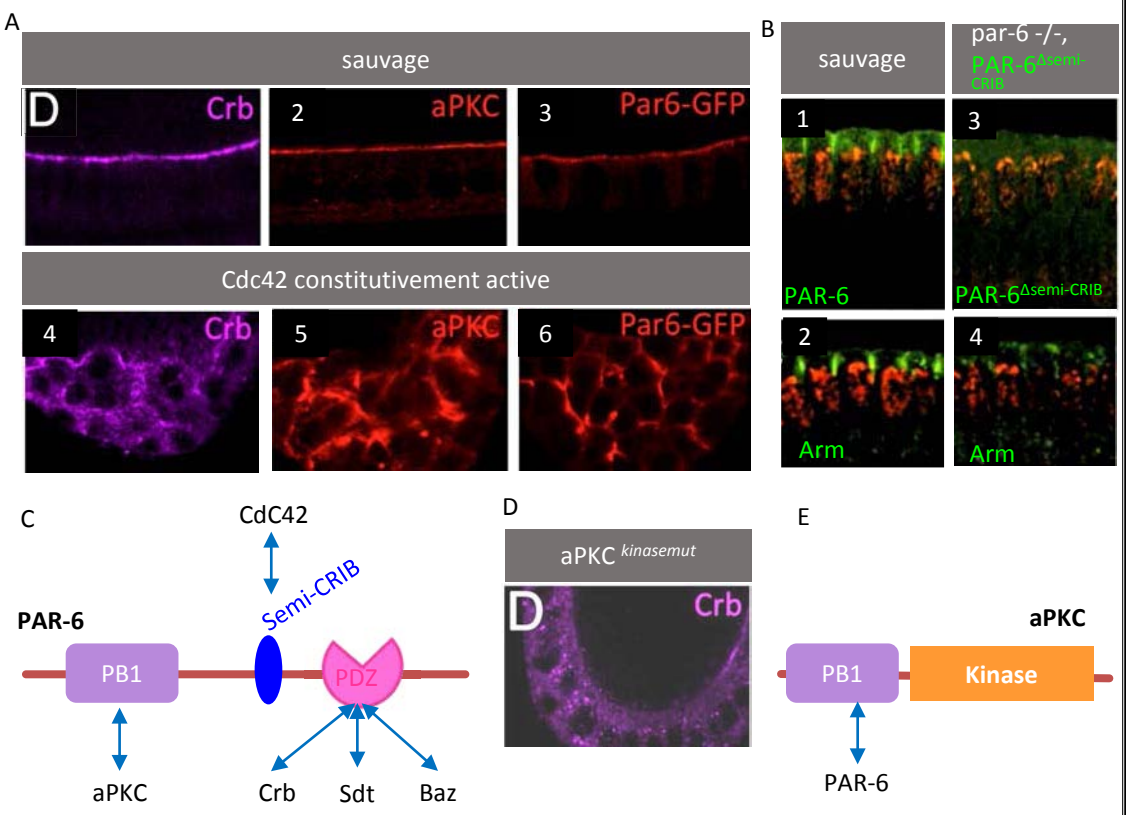


Figure 27 : Le complexe CdC42-PAR-6-aPKC est requis pour la définition du domaine apical.

(**A**) Dans un FE sauvage la localisation de Crb (**A1**), PAR-6 **(A3**) et aPKC (**A2**) est limitée au domaine apical, mais elle montre une expansion si la petite GTPase Cdc42 constitutivement active est surexprimée (**A4,5,6**). Cdc42 est donc capable de définir le domaine apical comme Crb. (**B**) PAR-6 interagit avec Cdc42 via son domaine semi-CRIB, sa mutation empêchant sa localisation apicale (**B2**) et une perte du domaine apical (**B3**) dans l'épiderme. (**C**) PAR-6 possède aussi un domaine PDZ qui interagit avec Crb, Sdt ou Baz (**flèche bleu**) et un domaine PB1 qui interagit avec aPKC. (**D,E**) aPKC est la kinase effectrice du domaine apical et la mutation de son domaine kinase provoque la perte de polarité des cellules dans le FE, comme on peut le voir par la perte de Crb de la membrane apicale (**violet**).

*Panels **A**, **B** et **D** D'après (Fletcher et al., 2012; Hutterer et al., 2004).*

Crumbs étant une protéine clé du domaine apical elle est présentée dans cette partie, mais sa structure, sa fonction et sa régulation seront reprises et approfondies dans la partie de ce manuscrit consacrée au complexe Crumbs (**Partie IV**).

II.6.2. Cdc42-PAR-6-aPKC

La petite GTPase Cdc42 se localise en apical des cellules épithéliales par un mécanisme qui reste à préciser et elle est requise pour leur polarisation. L'expression d'un dominant négatif ou de Cdc42 constitutivement active dans l'embryon induit une perte de polarité (Harris and Tepass, 2008; Hutterer et al., 2004). Dans le FE, la surexpression de Cdc42 constitutivement active provoque l'expansion du domaine apical en latéral (**Fig.27**), (Fletcher et al., 2012). Cdc42 est donc capable de spécifier le domaine apical en induisant le recrutement des autres protéines apicales de la même façon que Crb. Elle régule à la fois le cytosquelette d'actine et le trafic cellulaire. Cdc42 pourrait participer à la définition du domaine apical en modulant l'endocytose et/ou l'adressage des déterminants de la polarité comme Crb. L'analyse des défauts induits par l'expression du dominant négatif, de la forme constitutivement active ou par la mutation de *cdc42* a fourni plusieurs arguments pour cette fonction (Fletcher et al., 2012; Georgiou et al., 2008; Harris and Tepass, 2008; Leibfried et al., 2008). En effet, si Cdc42 est altérée par l'un de ces moyens génétiques Crb ou E-Cad sont délocalisées du cortex et retrouvées dans le cytoplasme sous forme de spots dans le notum, le neuro-ectoderme et les FC. Les spots d'E-Cad co-localisent avec des marqueurs des endosomes dans le notum et la même co-localisation a été observée pour Crb dans le neuro-ectoderme. Ces études montrent que Cdc42 inhibe l'endocytose d'E-Cad et de Crb.

Cdc42 interagit avec PAR-6 via le domaine semi-CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) de PAR-6 et l'active (**Fig.27C**), (Atwood et al., 2007; Hutterer et al., 2004). La

mutation du domaine semi-CRIB (PAR-6$^{\Delta semi\text{-}CRIB}$) abroge son interaction avec Cdc42 mais pas avec aPKC et Baz. Dans un contexte *nul* pour PAR-6 endogène, PAR-6$^{\Delta semi\text{-}crib}$ est incapable de se localiser au cortex apical de l'épiderme ce qui conduit à la localisation anormale de Baz, Arm et Patj (**Fig.27B**), (Hutterer et al., 2004). De même, la mutation de ce domaine prévient la polarisation des neuroblastes (Atwood et al., 2007). L'interaction PAR-6-Cdc42 est conservée chez les mammifères, où elle est requise pour la formation et le maintien de TJ (Joberty et al., 2000; Johansson et al., 2000). PAR-6 contient en plus du domaine semi-CRIB, le domaine PB1 (Phox and Bem1p 1) qui interagit avec le domaine PB1 d'aPKC, et un domaine PDZ qui interagit, entre autres, avec Baz (**Fig.27C**), (Joberty et al., 2000; Johansson et al., 2000; Lin et al., 2000; Petronczki and Knoblich, 2001; Suzuki et al., 2001). La fonction principale de PAR-6 est de recruter et de réguler l'activité d'aPKC.

La protéine aPKC est une kinase C atypique car elle n'a de commun avec ces kinases que son domaine catalytique (**Fig27E**). Elle phosphoryle de nombreuses cibles, régule le cytosquelette, le trafic et la localisation de plusieurs protéines de polarité. C'est la kinase effectrice du domaine apical, indispensable à sa définition (Wodarz et al., 2000). La surexpression d'aPKC^{CAAX} , qui se localise de façon autonome au cortex, induit l'expansion du domaine apical, alors que la surexpression d'aPKC^{CAAXDN} ayant un domaine kinase inactif provoque la perte du domaine apical (Sotillos et al., 2004). De même, la mutation du domaine kinase empêche la spécification du domaine apical dans le FE (**Fig27D**), (Fletcher et al., 2012). L'activité kinase d'aPKC est donc essentielle à la polarisation des cellules épithéliales et doit intervenir de manière polarisée. La question du recrutement apical d'aPKC est donc cruciale. La mutation du domaine PB1 qui se lie à PAR-6, prévient la localisation apicale d'aPKC et induit des défauts de polarité (**Fig.27E**), (Kim et al., 2009). PAR-6 joue donc un rôle clé dans le recrutement d'aPKC. *In vitro* l'association de ces deux

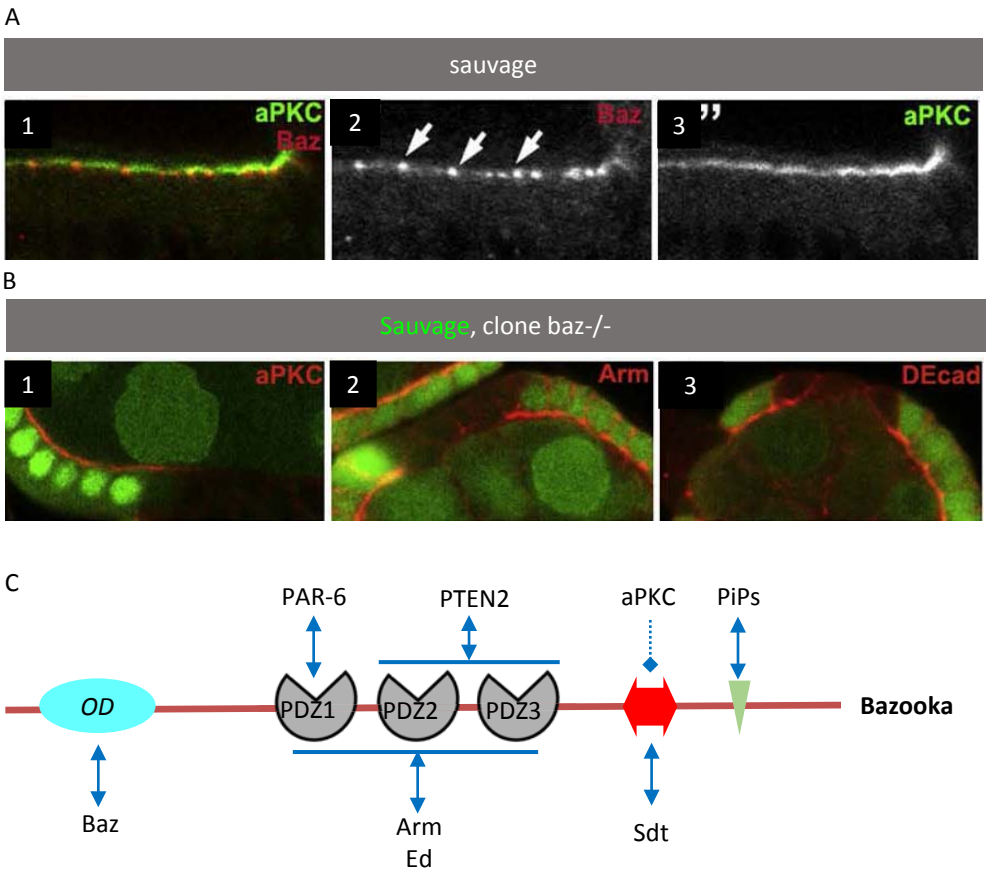


Figure 28 : Bazooka : localisation, fonction, structure et partenaires.

(**A**) Dans les FC, Baz se localise principalement aux AJs (**A1, rouge/A2, blanc**), alors que aPKC est plus haute dans la zone marginale et au cortex apical (**A1, vert /A3, blanc**). Baz ne co-localise donc pas strictement avec PAR-6-aPKC. (**B**) Dans les FC mutantes pour *baz* (**absence de GFP**) on observe la perte d'aPKC (**B1, rouge**), et des AJ visibles par marquage Arm (**B2, rouge**) ou E-cad (**B3, rouge**). Baz est donc requise pour la définition du domaine apical. Le schéma en **C** présente les différents domaines de Baz et leurs partenaires. Chez la drosophile le domaine OD permet sa dimèrisation, les trois domaines PDZs interagissent (**flèche**) avec PAR-6, Arm, Ed, et PTEN. Une région cible de la phosphorylation par aPKC (**flèche carrée**) interagit avec Sdt, et en C-terminal une autre région permet son association aux PIP.

*Panels **A** et **B** D'après (Morais-de-Sá et al., 2010; Wodarz et al., 2000).*

protéines réduit l'activité catalytique d'aPKC et l'ajout de Cdc42 la restaure partiellement (Atwood et al., 2007; Yamanaka et al., 2001). *In vivo* l'association d'aPKC avec PAR-6 et Cdc42 doit donc probablement permettre de l'activer ou de cibler son activité.

Pendant longtemps PAR-6 et aPKC étaient considérées comme formant un complexe obligé avec Baz. Néanmoins, PAR-6-aPKC et Baz ne co-localisent pas strictement : PAR-6-aPKC sont apicales, alors que Baz est accumulée préférentiellement aux AJ dans de nombreux types cellulaires de différentes espèces (**Fig.28A**), (St Johnston and Ahringer, 2010). De plus, PAR-6 interagit à la fois avec Crb, Sdt et potentiellement Patj au sein du complexe Crb (Tepass, 2012).

II.6.3. Bazooka

baz est le premier homologue des protéines PAR de *C.elegans* découvert chez la drosophile (Müller and Wieschaus, 1996). Il a été identifié dans le même crible que *crb* et *sdt* et sa mutation provoque de graves défauts de cuticule. La mutation maternelle et zygotique *baz* montre des défauts dès la cellularisation du blastoderme où il dirige l'assemblage des AJ. Il est requis dans les épithéliums, et les neuroblastes pour leur polarisation (Kuchinke et al., 1998). Baz interagit avec aPKC et PAR-6, ensemble ils forment le complexe PAR (Suzuki and Ohno, 2006). La mutation *baz* prévient la localisation apicale de PAR-6-aPKC dans l'épiderme, les FC et les neuroblastes (FC : **Fig.28B**), (Morais-de-Sá et al., 2010; Petronczki and Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). De plus, sa surexpression induit le recrutement ectopique de PAR-6-aPKC dans les neuroblastes (Wodarz et al., 2000). Baz joue donc un rôle dans le recrutement de PAR-6-aPKC mais ne colocalise pas nécessairement avec elles. Elle se localise à la ZA où elle accomplit des fonctions indépendantes du recrutement de PAR-6-aPKC (**Fig.28A**), (Harris and Peifer, 2004; Harris and Peifer, 2005; Simões et al., 2010). Une de

ses fonctions majeures est d'assurer la localisation des TJ chez les mammifères et la formation de la ZA chez la drosophile (**Fig.28B2,B3**), (Chen and Macara, 2005; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001; McGill et al., 2009; Mizuno et al., 2003; Ooshio et al., 2007).

La régulation de la localisation de Baz est complexe, mais cruciale pour l'intégrité de l'épithélium (Krahn et al., 2010b; Morais-de-Sá et al., 2010). Elle nécessite à la fois son exclusion des domaines latéral et apical (Partie III) et son recrutement aux jonctions (St Johnston and Ahringer, 2010).

Baz possède en N-terminal un domaine d'oligomérisation (OD) très conservé et nécessaire à sa fonction (**Fig.28C**), (Benton and St Johnston, 2003b; Mizuno et al., 2003). Elle possède également une région conservée qui permet son interaction avec aPKC et Sdt, mais qui n'est pas nécessaire pour le recrutement cortical de Baz (Krahn et al., 2010a). En C-terminal une autre région est requise pour son interaction avec les PIP (Phosphatidylinositol phosphate, PtdInsP), (**Fig.28C**). Les PIP sont des lipides qui divergent par le nombre et la position des phosphates qu'ils portent. Ils sont connus pour réguler de nombreux processus cellulaires (Shewan et al., 2011). La répartition des PIP dans la membrane est asymétrique. Par exemple, le PIP2 (PtdIns(4,5)P2) est apical alors que le PIP3 (PtdIns(3,4,5)P2) est baso-latéral. L'insertion forcée de PIP2 dans la membrane conduit à une apicalisation du cortex latéral dans les cellules MDCK (Martin-Belmonte et al., 2007). La phosphatase PTEN apicale catalyse la transformation de PIP3 en PIP2, alors que la kinase PI3K (Phosphatidyl Insositol 3 kinase) latérale réalise la réaction inverse. Baz interagit *in vitro* avec les PIP2 et les PIP3, mais aussi avec PTEN probablement pour réguler l'accumulation apicale de PIP2 (Pinal et al., 2006; von Stein et al., 2005). Dans les FC, la réduction des PIP2 induit une perte de polarité et des défauts morphogénétiques, similaires à ceux résultants de la mutation de *baz* (Claret et al.,

2014). Ainsi les PIP2 sont essentiels pour le recrutement de déterminants apicaux, possiblement via leur association avec Baz.

Les trois domaines PDZ de Baz ont de nombreux partenaires (**Fig.28C**). Chez les mammifères le PDZ1 interagit avec les protéines JAMs et PAR-6, le PDZ2 avec les PIP, et le PDZ3 avec PTEN (Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001; Lin et al., 2000; Wu et al., 2007a). Chez la drosophile, les trois PDZ sont requis pour l'interaction avec Arm et Ed, le PDZ1 interagit avec PAR-6, et les PDZ2-3 avec PTEN (**Fig.28C**), (Pinal et al., 2006; von Stein et al., 2005; Wei et al., 2005). La délétion d'aucun des domaines PDZ, ni des trois ensemble, n'affecte le recrutement cortical de Baz (Krahn et al., 2010a). Cependant la délétion des PDZ1-3 supprime la faible portion membranaire toujours observable lors de la délétion du domaine OD (McKinley et al., 2012). Ceci suggère que si les domaines PDZ ne sont pas nécessaires, ils participent à l'accumulation de Baz aux AJ. Par ailleurs, les PDZ1 et 2 sont requis pour la fonction de Baz, puisque les transgènes délétés de ces domaines ne sauvent pas complètement la mutation *baz* (Krahn et al., 2010a; McKinley et al., 2012).

La délétion d'un seul de ses domaines ne supprime pas totalement le recrutement cortical de Baz. Ils semblent donc redondants pour l'association de Baz au cortex. Cependant, Baz doit aussi être restreint aux AJ. Le rôle des domaines PDZ dans la restriction jonctionnelle de Baz n'a pas été étudié, mais des sites de phosphorylation (cibles d'aPKC et de PAR-1) sont déjà connus pour y participer (Partie III).

II.7. Les protéines de polarité latérales

Plusieurs protéines latérales forment des complexes fonctionnels : le complexe Scribble (Scrib), Disc large (Dlg), et Lethal Giant Larvae (Lgl) et le complexe Nrx-IV, Cor, Yurt,

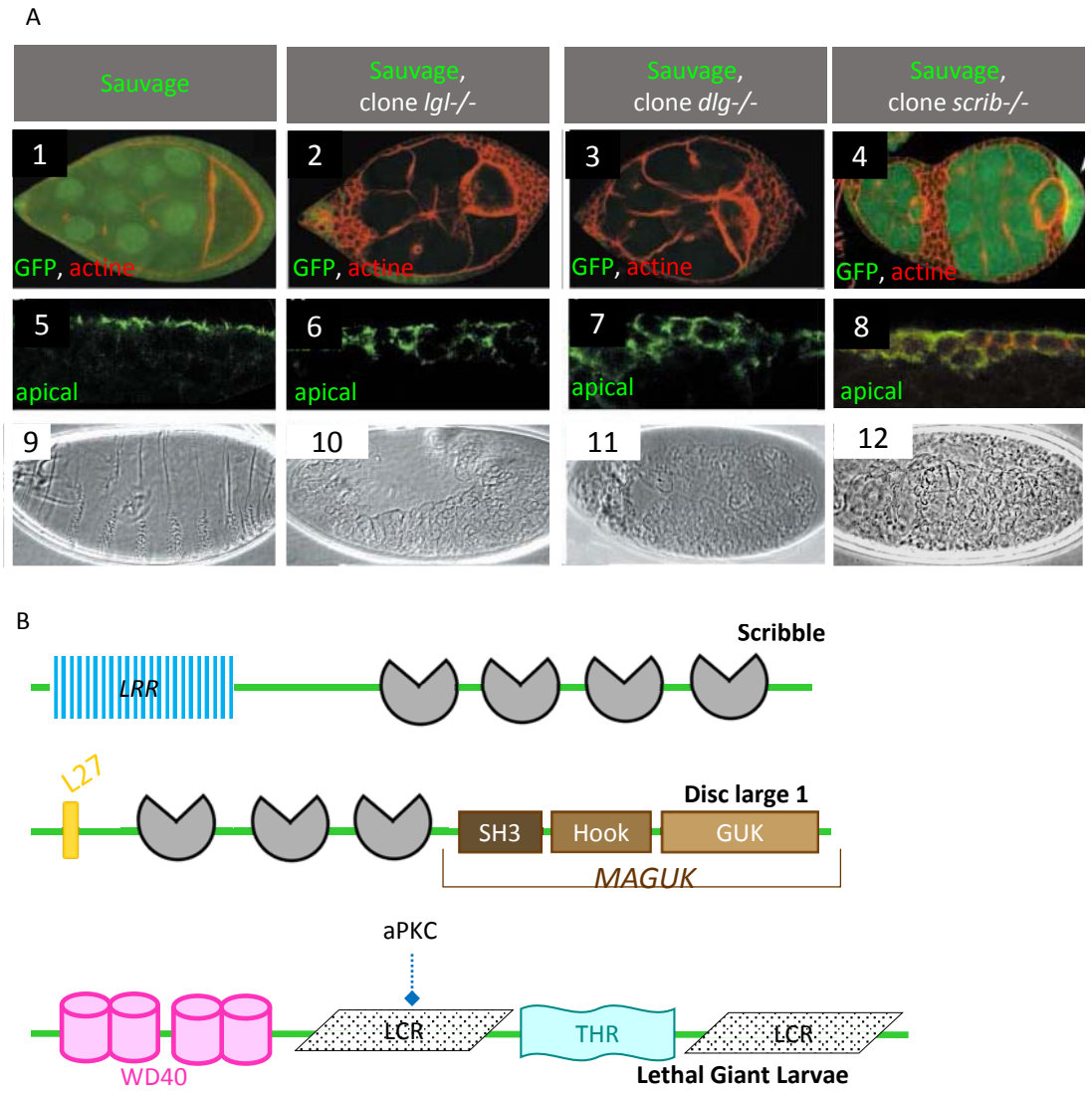


Figure 29 : Le module Scrib-Lgl-Dlg est requis pour le maintien du domaine latéral.

(**A**) La mutation de *lgl* (**A2,6,10**), *dlg* (**A3,7,11**) ou *scrib* (**A4,8,12**), conduit à la perte de polarité des FC et de l'épiderme comme on peut l'observer par la formation d'un épithélium multicouche avec le marquage actine (**A rouge 1,2,3,4**), ou avec un marqueur apical (qui s'étend dans le domaine latéral), (**A vert 5,6,7,8**), ou avec des préparation de cuticules embryonnaires (**A 9,10,11,12**). (**B**) Scrib est composée de 4 domaines PDZ et d'un domaine LRR (Leucin rich repeats). Dlg est une protéine MAGUK à trois domaines PDZ et un domaine L27. Lgl quant à elle possède des domaines WD40, deux régions LCR (low complexity region) dont une contient le site de phosphorylation par aPKC (**flèche carrée**) et un domaine similaire au domaine thomosyne (THR).

*Panel **A** D'après (Bilder and Perrimon, 2000a; Bilder and Perrimon, 2000b).*

NaKATPase (**Fig.20**). De plus d'autres protéines comme PAR-1 et PI3K régulent aussi le domaine latéral.

II.7.1. Le module Scrib/Lgl/Dlg

Avec la découverte du gène *scrib*, la fonction commune de *dlg*, *lgl*, et *scrib* dans la polarisation épithéliale a été révélée (Bilder and Perrimon, 2000a; Bilder and Perrimon, 2000b). Les embryons mutants *scrib* montrent les défauts de cuticule caractéristiques de la perte de polarité de l'épiderme (**Fig.29A**). Cette désorganisation est caractérisée par la localisation ectopique de Crb et d'autres protéines apicales, similaire à celle observée lors de la surexpression de Crb. Scrib se localise à la membrane dès la cellularisation, où elle se répartit tout le long du cortex latéral jusqu'à la zone marginale. Ensuite, Scrib s'accumule en basal des AJ. Plus tard, elle co-localise avec les protéines des SJ. Comme Scrib précède les SJ au cours du développement, elle pourrait être impliquée dans leur formation ou leur localisation. Les SJ sont réduites mais toujours latérales dans les mutants *scrib* et les AJ montrent une localisation ectopique latérale. Scrib agit donc plutôt en limitant la localisation des AJ, qu'en promouvant l'établissement des SJ. La mutation de *lgl* ou de *dlg* conduit à une perte de polarité similaire à celle de *scrib* (**Fig.29A**) (Bilder and Perrimon, 2000b). Scrib, Lgl et Dlg remplissent donc la même fonction d'exclusion des protéines apicales de la membrane latérale. De plus, les trois sont inter-dépendantes pour leur localisation ce qui suggère qu'elles fonctionnent en complexe. Cependant, l'existence d'interactions directes entre ces trois protéines n'est pas encore clairement démontrée. Des interactions indirectes via d'autres partenaires ont été identifiées, mais leur rôle précis dans la régulation de la localisation et de la fonction du module scrib est encore mal connu. Récemment, une interaction directe entre Dlg et Lgl a été proposée (Zhu et al., 2014).

Scrib contient seize domaines LRR (leucine rich repeasts) et quatre domaines PDZ (**Fig.29B**). Dans les cellules MDCK et l'épithélium du disque d'aile de la drosophile, la partie N-terminale contenant les domaines LRR est suffisante et nécessaire pour la localisation latérale de Scrib (Navarro et al., 2005; Zeitler et al., 2004). Dans les mutants *crb* ou *arm*, Scrib est toujours localisée en latéral (Bilder et al., 2003). Elle ne semble donc pas nécessiter la définition du domaine apical ou la formation des jonctions pour restreindre sa localisation, alors que chez les mammifères elle est dépendante de celle d'E-Cad (Navarro et al., 2005). Dans les jonctions neuro-musculaires de la drosophile l'interaction indirecte de scrib avec Dlg via GUK-holder est requise pour la recrutement de Scrib aux SJ (Mathew et al., 2002).

Dlg est une protéine MAGUK qui contient trois domaines PDZ et un domaine L27 (**Fig.29B**). Le domaine Hook est requis pour son recrutement cortical alors que le PDZ2 permet de restreindre sa localisation aux SJ (Hough et al., 1997). L'interaction des domaines SH3 et GUK avec la protéine GUK-holder a été proposée comme modulant la fonction de Dlg (Marcette et al., 2009; Newman and Prehoda, 2009; Qian and Prehoda, 2006). De plus, c'est le domaine GUK qui serait impliqué dans l'interaction avec Lgl lorsque celle-ci est phosphorylée par aPKC (Zhu et al., 2014).

Lgl contient en N-terminal des répétitions WD-40, en C-terminal deux régions LCR (positively charged low complexity region), (la première contenant les sites de phosphorylation par aPKC), et une région d'homologie avec la Tomosyne (**Fig.29B**), (Betschinger et al., 2005). La protéine délétée des domaines WD-40 se localise à la membrane mais est incapable de sauver la létalité des mutants *lgl*. La partie C-terminale de la protéine humaine et de la protéine de drosophile interagissent avec la myosine II (Strand et al., 1994a; Strand et al., 1994b; Strand et al., 1995). Cette interaction pourrait participer à la détermination du

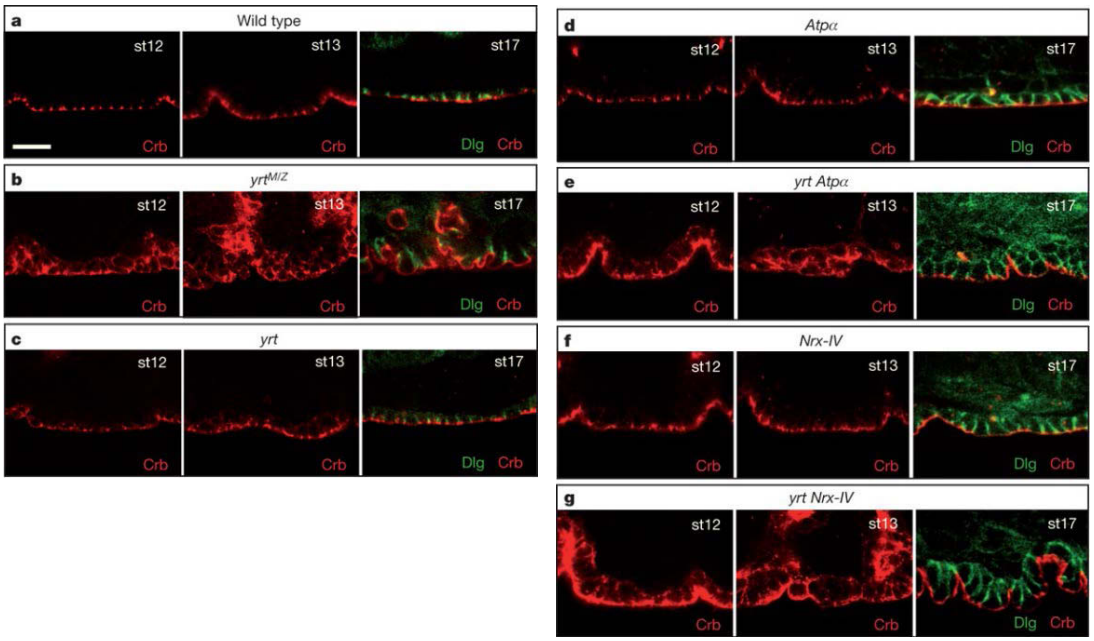


Figure 30 : Yurt et le module Cor-Nrx-IV-NaKATPase sont requis pour le maintien du domaine latéral à partir du stade 12 du développement embryonnaire.

Cette figure présente des épidermes d'embryons au stade 12, 13 et 17, marqués pour Crb (**rouge**) et Dlg (**vert**) ; sauvages (**a**), mutants maternels et zygotiques pour *yurt* (**b**) mutants zygotiques pour *yurt* (**c**), mutants pour une sous-unité de la NaKATPase : *Atpα* (**d**), mutants pour *nrx-IV* **(f)** ou double mutants *yurt, atpα* (**e**) ou *yurt, nrx-IV* (**g**). La mutation M/Z *yurt* provoque la perte de polarité de l'épiderme avec l'expansion de Crb en latéral à partir du stade 12. La double mutation *yurt, atpα* ou *yurt, nrx-IV* zygotique aggrave le phénotype comparé à la mutation de chacun de ces gènes seul. L'épiderme montre alors le même défaut que la mutation M/Z de *yurt*. Ces défauts sont observables au stade 12 et 13, mais sont corrigés au stade 17. Yurt et le module Cor-Nrx-IV-NaKATPase fonctionnent donc en parallèle pour le maintien du domaine latéral pendant un fenêtre de temps du développement de l'embryon de drosophile.
D'après (Laprise et al., 2009).

domaine latéral puisque Lgl régule le cytosquelette d'actine lors de la migration cellulaire et la répartition des déterminants de la polarité dans les neuroblastes (Peng et al., 2000; Ravid, 2014). Chez les mammifères, Lgl interagit avec une protéine du trafic cellulaire (Syntaxine 4) et favorise la sécrétion des protéines latérales (Musch et al., 2002).

Le module Scrib est requis pour la mise en place initiale de la polarité dans l'embryon de drosophile mais il a été montré que les mutants *lgl* récupèrent une polarisation plus tard dans le développement, indiquant qu'il existe un autre un mécanisme capable de définir le domaine latéral pendant cette phase (Bilder et al., 2003; Tanentzapf and Tepass, 2003).

II.7.2. Yurt et le groupe Cor/Nrx-IV/NaKATPase

La protéine FERM Yurt se localise latéralement dans les cellules épithéliales de l'embryon et les photorécepteurs de drosophile et son homologue mammifère est aussi latéral dans les cellules MDCK (Laprise et al., 2006; Laprise et al., 2009). Aucun défaut n'est observable avant le stade 12 de l'embryogénèse en absence de Yurt il est donc dispensable lors de la cellularisation et de la gastrulation pendant lesquelles le module Scrib est requis. Cependant, la mutation maternelle et zygotique *yurt* induit une expansion de Crb en latéral causant la perte de polarité des cellules de l'épiderme dans les stades suivants (**Fig.30b**). La fonction de Yurt apparaît génétiquement indépendante du module Scrib. Les mutants *yurt* zygotiques montrant des défauts mineurs par rapport à la mutation maternelle et zygotique (**Fig.30c**), ils ont été utilisés pour trouver des gènes dont la mutation aggrave ce phénotype. C'est le cas d'*ATPα* et de *nrv2* qui codent deux sous-unités de la NaKATPase, de *nrx-IV* et de *cor* (Laprise et al., 2009). La mutation seule de l'*ATPα*, ou de *nrx-IV* n'a pas d'effet sur la polarité, alors qu'elles induisent des défauts graves dans un contexte mutant zygotique pour

yurt (**Fig.30d,e,f,g**). De plus, aucune aggravation des phénotypes n'a été observée dans les doubles mutants *cor,nrx-IV* et *cor,Atpα* suggérant qu'ils appartiennent à la même voie génétique. Ainsi, Yurt et Nrx-IV/Cor/NaKATPase ont des fonctions similaires mais n'agiraient pas dans la même voie.

II.7.3. PAR-1

Une des protéines effectrices du domaine latéral est la kinase PAR-1. La mutation de *par-1* dans les FC peut conduire à la formation d'un FE désorganisé. Dans ces cellules la polarité est compromise et aPKC se localise ectopiquement en latéral (Benton and St Johnston, 2003a). La région C-terminale de PAR-1 est nécessaire à son recrutement cortical et à la polarisation dans les FC (Doerflinger et al., 2006; Vaccari et al., 2005). Le mécanisme exact permettant le recrutement de PAR-1 au cortex n'est pas encore compris mais pourrait faire intervenir Lgl et Slimb comme dans l'ovocyte de la drosophile. Sa restriction latérale nécessite sa phosphorylation par aPKC (partie III.1.2). PAR-1 participe au maintien du domaine latéral en phosphorylant de nombreuses cibles et en régulant notamment l'orientation des microtubules dans les FC et les MDCK (Benton and St Johnston, 2003a; Cohen et al., 2004).

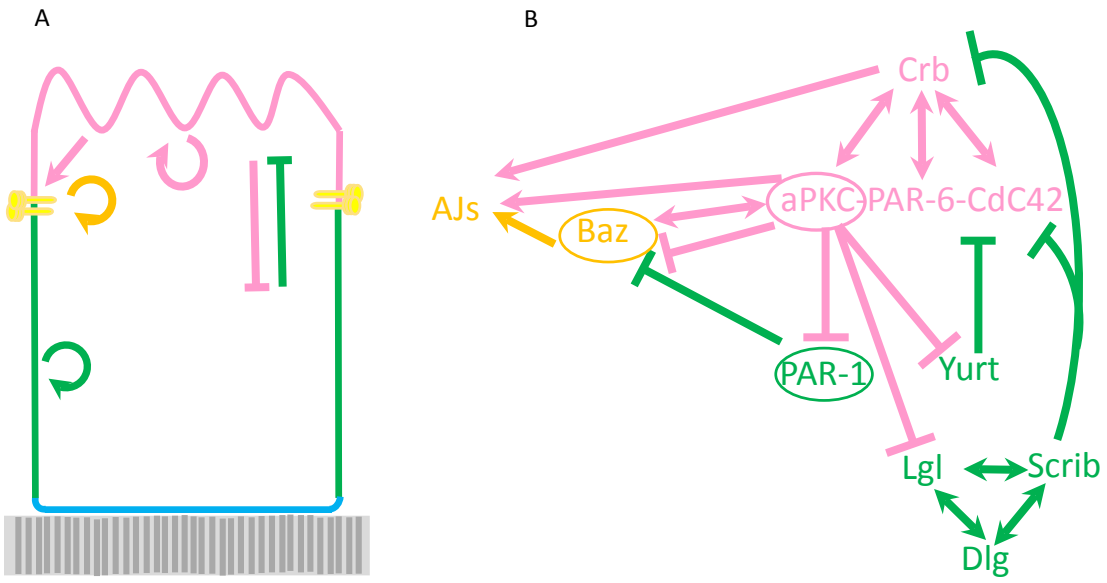


Figure 31 : Régulation et maintien de la polarité : régulations positives et exclusions mutuelles.

Le simple recrutement cortical des déterminants de la polarité, même s'il est asymétrique n'est pas suffisant pour expliquer la mise en place et le maintien de la polarité. La polarisation nécessite des régulations positives au sein des domaines apical et latéral (**A, flèche ronde rose et verte, B flèche rose et verte**), la régulation positive des jonctions en position subapicale par les protéines associées aux jonctions (**A, flèche ronde jaune**) et les protéines apicales (**A, flèche rose, B flèche rose et jaune**), mais aussi l'exclusion mutuelle des domaines apical et latéral pour empêcher leur expansion (**A, flèche d'inhibition rose et verte**). Cette inhibition se fait notamment via les kinases aPKC et PAR-1 qui phosphorylent des protéines apicales ou latérales pour les exclure de leur domaine (**B, flèche d'inhibition**). Le module Scrib inhibe aussi Crb-aPKC-PAR-6 et Cdc42 notamment via la régulation de trafic de Crb. Le maintien des jonctions nécessite Baz qui les régule positivement et l'exclusion de Baz par aPKC et PAR-6 du cortex apical (seul l'exclusion par aPKC est représentée ici).

Ce sont donc de multiples relations dynamiques entre les protéines de polarité qui permettent la mise en place de la polarité apico-basale et son maintien au cours du développement des épithéliums.

III. Formation et maintien de la polarité apico-basale au cours du développement épithélial

Le simple recrutement cortical des déterminants de la polarité, même s'il est asymétrique n'est pas suffisant pour expliquer la mise en place et le maintien de la polarité. La polarisation nécessite plusieurs processus (**Fig.31A,B**) :

1) La restriction des domaines pour éviter leur expansion dans les autres compartiments corticaux. Ceci est réalisé par des exclusions mutuelles entre le domaine apical et latéral.

2) La régulation positive des protéines au sein d'un même domaine pour renforcer celui-ci.

3) La mise en place et la promotion des AJ en position subapicale, où elles définissent la frontière apico-latérale et favorisent la polarisation du cytosquelette et du trafic.

Pour ces trois points de nombreux mécanismes ont été mis en évidence, augmentant la complexité des relations au sein du réseau de polarité. Ces mécanismes ne sont souvent pas entièrement compris, notamment à l'échelle moléculaire. Au cours de la morphogénèse les cellules sont remodelées, le réseau de polarité doit être plastique et permettre la réorganisation du cortex. Comprendre comment la polarité est maintenue et participe à la morphogénèse, ou au développement en général, est un défi qui nécessite la connaissance approfondie de sa régulation.

III.1. Les antagonismes et la régulation positive apicale

L'exclusion mutuelle fait intervenir des modifications post-traductionnelles, principalement des phosphorylations, et la régulation de la dynamique des déterminants corticaux via la modulation de leur trafic cellulaire. Si l'équilibre d'inhibition est rompu alors un domaine pourra s'étendre dans une autre région corticale. Cette rupture de l'équilibre apico-latéral conduit à la délocalisation des jonctions et à la perte de polarité des cellules. Un autre type d'antagonisme au sein du domaine apical va quant à lui permettre la localisation dynamique de Baz, qui doit s'accumuler aux jonctions aux moments adéquats pour favoriser leur assemblage.

III.1.1. Crb/aPKC versus Lgl

Si la mutation de *crb* ou de *lgl* induit une perte de polarité de l'épiderme, les doubles mutants *crb,lgl* ne montrent que peu de défauts (Tanentzapf and Tepass, 2003). Lgl co-immunoprécipite avec PAR-6-aPKC mais pas avec Baz dans des extraits d'embryons ou de cellules en culture de drosophile et dans des extraits de MDCK (Betschinger et al., 2005; Plant et al., 2003; Yamanaka et al., 2003). Lgl interagit directement avec le domaine PDZ de PAR-6 et le domaine kinase d'aPKC. Lgl est phosphorylé par aPKC dans la région LCR proche des domaines WD-40. Alors, que la protéine Lgl sauvage surexprimée reste majoritairement cytoplasmique, Lgl non phosphorylable se localise ectopiquement dans le territoire PAR-6-aPKC dans les neuroblastes, les cellules de l'épiderme et l'ovocyte (Betschinger et al., 2003; Hutterer et al., 2004; Tian and Deng, 2008). La phosphorylation de Lgl par aPKC inhibe donc son association corticale, possiblement en modifiant le repliement de la protéine (Betschinger et al., 2005). Les défauts de polarisation des neuroblastes et des cellules

épithéliales dans les mutants *lgl*, peuvent être supprimés par la mutation d'*aPKC* (Chalmers et al., 2005; Rolls et al., 2003; Yamanaka et al., 2006). L'influence d'aPKC sur Lgl expliquerait indirectement comment Crb inhibe le module Scrib. Reste encore à déterminer comment Lgl inhibe PAR-6-aPKC. Ceci pourrait se faire via le recrutement de PAR-1. En effet, Lgl interagit directement avec PAR-1 et elle est capable de la recruter au cortex postérieur de l'ovocyte, mais une telle fonction n'a pas encore été reportée dans les cellules épithéliales (Tian and Deng, 2008). De plus, aucun rôle pour PAR-1 n'a été proposé à ce jour dans la division asymétrique des neuroblastes.

III.1.2. aPKC et Baz versus PAR-1

PAR-1 phosphoryle Baz sur deux sérines. La protéine $Baz^{S151A,S1085A}$GFP non phosphorylable est anormalement localisée au cortex latéral où elle recrute PAR-6-aPKC, ce qui montre que la phosphorylation de Baz par PAR-1 est essentielle pour restreindre sa localisation. La protéine 14.3.3 (homologue de PAR-5) interagit avec Baz lorsqu'elle est phosphorylée par PAR-1 et inhibe son association avec aPKC, ainsi que son oligomérisation. La phosphorylation de Baz par PAR-1 déstabilise donc la localisation corticale de Baz, chez la drosophile mais aussi chez les vertébrés (Benton and St Johnston, 2003a; Kusakabe and Nishida, 2004). En retour aPKC inhibe PAR-1 en la phosphorylant, ce qui induit aussi son interaction avec PAR-5 et empêche sa localisation corticale (Doerflinger et al., 2010; Hurov et al., 2004; Suzuki et al., 2004).

III.1.3. Crb/aPKC versus Yurt

Une étude menée chez le poisson zèbre a montré que la protéine FERM Yurt s'associe avec le complexe Crb (Jensen and Westerfield, 2004). Cette association est

conservée entre les protéines des vertébrés et de la drosophile. Yurt interagit directement avec le motif FERM de Crb (Laprise et al., 2006). Dans l'épiderme et les photorécepteurs la mutation de *crb* supprime les défauts induits par la mutation de *yurt*, et la mutation de *yurt* sauve partiellement le phénotype *crb*. Ces deux protéines sont donc antagonistes et leur interaction physique régulerait négativement Crb.

aPKC phosphoryle Yurt (Gamblin et al., 2014). La protéine Yurt non phosphorylable se localise ectopiquement en apical et sa surexpression phénocopie la mutation *crb*. A l'inverse, la protéine Yurt phosphomimétique est diffuse dans le cytoplasme. La phosphorylation de Yurt par aPKC inhibe donc Yurt. Cependant le mécanisme moléculaire et le rôle que pourrait y jouer l'interaction directe Crb-Yurt, restent à déterminer.

III.1.4. Crb versus PI3K

Les protéines PTEN et PI3K produisent respectivement des PIP2 et PIP3 en réalisant des réactions enzymatiques inverses. Les PIP2 participent à la définition du domaine apical (notamment par le recrutement de Cdc42 dans les MDCK) et les PIP3 à celle du domaine latéral (Chartier et al., 2011; Claret et al., 2014; Martin-Belmonte et al., 2007). La mutation de *crb* induit une latéralisation de la membrane plasmique corrélée avec un enrichissement en PIP3 ce qui suggère que Crb régule négativement PI3K (Chartier et al., 2011). PI3K active les petites GTPases Rac. La surexpression de Crb réduit l'activation de Rac et l'expression d'un dominant négatif de Rac sauve les défauts *crb*. Crb pourrait donc inhiber de façon concomitante PI3K et Rac pour éviter l'expansion du domaine latéral. Cette régulation pourrait se faire via la βheavy-spectrine, qui interagit avec Crb chez la drosophile et les mammifères et qui régule négativement Rac (Lee and Thomas, 2011; Médina et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Baz régule aussi négativement Rac et interagit directement avec

PTEN. Elle pourrait donc aussi favoriser l'élimination des PIP3 à la membrane apicale (Georgiou and Baum, 2010). Si Crb et Baz répriment Rac, Rac et PI3K semblent aussi réguler négativement Crb pour limiter la taille de la membrane apicale (Chartier et al., 2011).

III.1.5. Crb/Sdt/PAR-6/aPKC versus Baz

Baz est phosphorylé par aPKC sur sa sérine 980 (S980), ce qui conduit à la dissociation de Baz du complexe PAR-6-aPKC (Kim et al., 2009; Morais-de-Sá et al., 2010). Cette phosphorylation est importante pour l'exclusion de Baz du domaine apical.

La protéine phosphomimétique Baz^{S980E}GFP se localise à la ZA, comme BazGFP en basal du complexe Crb et PAR-6-aPKC, et sauve la mutation *baz* (Krahn et al., 2010b; Morais-de-Sá et al., 2010). A l'inverse Baz^{S980A}GFP non phosphorylable est apicale et incapable de sauver la mutation *baz*. Ces observations ont été faites à la fois dans l'épiderme et dans les FC. La surexpression de Baz^{S980A} induit une délocalisation des protéines apicales et des jonctions qui forment des agrégats. Dans l'épiderme cette délocalisation est à l'origine d'une perte de polarité des cellules et conduit à la mort de l'embryon (Morais-de-Sá et al., 2010). Dans les FC l'accumulation de Baz et Arm en apical provoque une constriction. La phosphorylation de Baz par aPKC est donc essentielle pour la formation des jonctions, la localisation de Baz et des marqueurs apicaux.

Dans l'épiderme, Sdt est détectable au stade 6 avant que Crb ne le soit et colocalise avec Baz aux spots d'AJ (Krahn et al., 2010b). Au stade 7 et 8, Sdt colocalise avec Crb en apical alors que Baz demeure jonctionnelle. Initialement, Baz recrute Sdt en interagissant directement avec elle. Cette interaction implique le domaine PDZ de Sdt, et la région de Baz phosphorylée par aPKC. La phosphorylation d'aPKC déstabilise l'interaction Baz-Sdt.

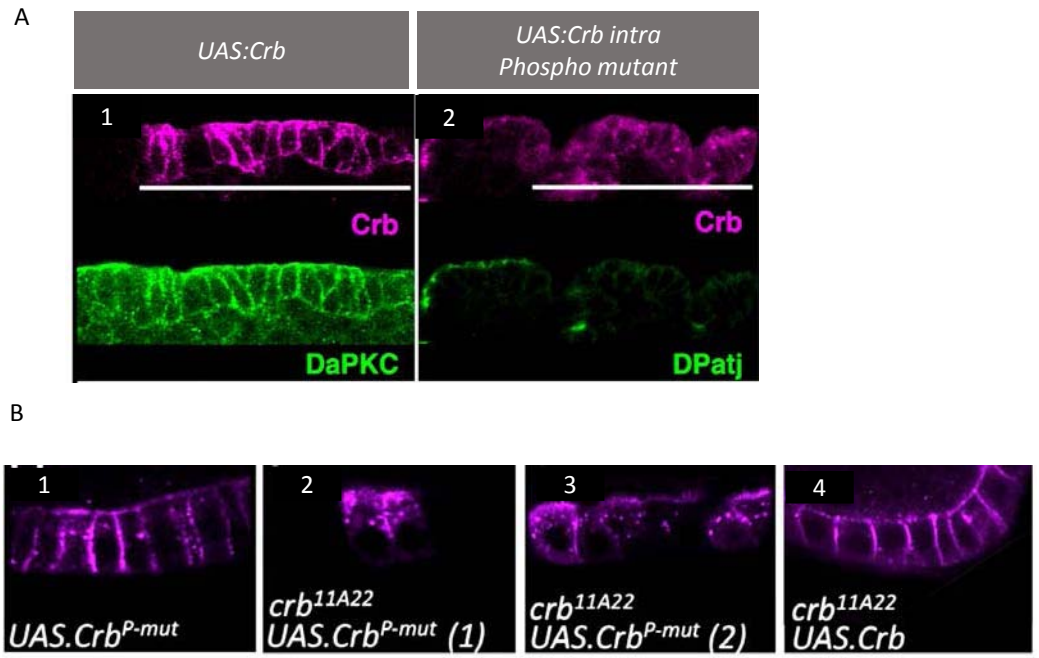


Figure 32 : La phosphorylation de Crb par aPKC est requise pour sa fonction et sa localisation.

(**A**) La surexpression de Crb-intra mutante pour ses sites de phosphorylation par aPKC supprime son effet gain de fonction dans l'épiderme (***A1,A2***). (**B**) Dans les FC la surexpression du phosphomutant (**B1, P-mut, violet**) supprime son effet gain de fonction comme on peut le voir avec le maintien de la forme des cellules, même si Crb est localisée ectopiquement. Si la forme mutante de Crb se localise au cortex en contexte sauvage (**B1**) elle en est incapable en contexte mutant pour *crb* (***crb^{11A2}*** **B2, B3**) alors que la protéine Crb non mutée y parvient (**B4**). La phosphorylation de Crb par aPKC est donc requise pour la fonction de Crb et son maintien à la membrane. aPKC régule positivement Crb.

D'après (Fletcher et al., 2012; Sotillos et al., 2004).

Ensemble ces données ont permis aux auteurs de proposer un modèle dans lequel Baz seraist requise pour le recrutement initial de Sdt et la phosphorylation d'aPKC pour dissocier Baz de Sdt et permettre l'interaction de ce dernier avec Crb.

Une autre équipe à proposer un second modèle (Morais-de-Sá et al., 2010). Leurs données indiquent que PAR-6-aPKC peut se localiser en apical via Baz ou via Crb, et que l'exclusion apicale de Baz est dépendante à la fois de sa phosphorylation par aPKC et de Crb. Il avait déjà été montré que PAR-6 interagit avec Sdt et avec le motif ERLI de Crb (Hurd et al., 2003; Lemmers et al., 2004). Ici les auteurs ont montré que *in vitro* le domaine intracellulaire de Crb entre en compétition avec le PDZ1 de Baz pour fixer PAR-6 (Morais-de-Sá et al., 2010). *In vivo* la surexpression de la protéine chimérique Baz-PAR-6 phénocopie la surexpression de Baz^{S980A}GFP dans les cellules folliculaires. Ceci montre qu'en plus de la phosphorylation, la liaison de PAR-6-aPKC avec Crb est nécessaire à l'exclusion apicale de Baz. Ainsi, durant une phase de maintien de la polarité, PAR-6-aPKC semble appartenir d'avantage au complexe Crb qu'à un véritable complexe Baz.

III.1.6. La phosphorylation de Crb par aPKC la régule positivement

Afin de maintenir un domaine fort, et de recruter aPKC continuellement, Crb doit être stable et actif à la membrane apicale. Crb est régulée à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, Crb est phosphorylée par aPKC (Sotillos et al., 2004). Cette phosphorylation se fait sur les thréonines 6 et 9 du domaine intracellulaire de Crb, au niveau du motif FERM. La surexpression de $Crb^{intraT6DT9D}$ phosphomimétique, induit les mêmes défauts que la surexpression de Crb^{intra} sauvage alors que la mutation des sites de phosphorylation supprime cet effet gain de fonction (**Fig.32A**). De plus, l'expression concomitante d'un

dominant négatif d'aPKC sauve le défaut de surexpression de Crb^{intra} mais pas celui de $Crb^{intraT6DT9D}$. Ceci indique que la phosphorylation de Crb par aPKC est importante pour sa fonction. Dans les FC, la protéine Crb phosphomutante s'accumule dans des vésicules intracellulaires (**Fig.32B**), (Fletcher et al., 2012). Le rôle de la phosphorylation serait d'inhiber l'endocytose de Crb et donc de promouvoir sa stabilité au cortex apical.

III.2. Le réseau de polarité régule les jonctions et le cytosquelette lors de la morphogénèse

Lors des processus morphogénétiques le réseau de polarité doit être régulé finement pour permettre le maintien de l'intégrité de l'épithélium, définir la taille des domaines corticaux dans les cellules qui changent de forme, ou autoriser les transitions épithélium-mésenchyme et la migration cellulaire. Plusieurs travaux soulignent le rôle des protéines de polarité dans la régulation de la dynamique des jonctions et du cytosquelette en faisant une composante obligée de la morphogénèse. Plusieurs exemples de régulation des jonctions et du cytosquelette par les protéines de polarité et plus particulièrement pour les protéines apicales sont décrites dans cette partie, excepté pour Crb dont la fonction est décrite dans la partie IV.1.

III.2.1. Formation de la zonula adherens et régulation des jonctions au cours de la gastrulation

Les AJ sont formées initialement dans le blastoderme, de façon dépendante de Baz et des microtubules. Ensuite, au cours de la gastrulation, ces AJ doivent être régulées positivement et restreintes en position subapicale pour permettre leur agrégation en ZA. La mutation *crb* n'affecte pas la localisation première des AJ mais empêche leur assemblage en

ZA (Tepass, 1996). CdC42-Par6-aPKC favorise le maintien des jonctions en inhibant leur endocytose (Harris and Tepass, 2008). La ségrégation des jonctions en subapical nécessite aussi les protéines latérales puisque la mutation du module *scrib* ou *yurt* induit leurs localisation ectopique, en spot denses, tout le long du cortex latéral. Un rôle direct des protéines latérales dans la ségrégation des AJ n'est pas montré, et ce défaut pourrait être expliqué par l'expansion des territoires Crb-Par6-aPKC.

La réorganisation de l'actine est cruciale pour la mise en place de la ZA, et il a été montré que Baz joue un rôle important dans ce processus. En effet, après la cellularisation Baz et les PIP2 permettent le recrutement de la protéine Bitesize aux jonctions sub-apicales (Pilot et al., 2006). La perte de fonction de *bitesize* induit une réduction de l'actine, qui ne parvient pas à former un anneau linéaire à la ZA. Bitesize interagit physiquement avec la Moésine, et l'expression d'un dominant négatif de la Moésine (incapable de lier l'actine) phénocopie la perte de *bitesize*. Baz via le recrutement de Bitesize permet la formation de l'anneau d'actine essentielle à la formation et au maintien de la ZA.

Une invagination est causée généralement par une constriction apicale due à la contraction de l'acto-myosine apicale, mais lors des repliements dorsaux dans l'embryon de drosophile, aucun enrichissement de myosine apicale n'est détecté, montrant que l'invagination n'est ici pas initiée par la myosine II (Wang et al., 2012). Dans les cellules qui vont s'invaginer, E-Cad change de position en se déplaçant basalement sur le cortex latéral. Ce « shift » d'E-Cad est aussi observé pour Baz, et il est concomitant avec une réduction du niveau de PAR-1. Les expériences génétiques conduisent à un modèle où l'invagination est donc initiée par un remodelage des jonctions dépendant de l'antagonisme Baz/PAR-1. Les

protéines de polarité sont donc essentielles pour la dynamique des jonctions au cours de la morphogénèse.

III.2.2. Régulation du cytosquelette

Le rôle des protéines de polarité dans la régulation du cytosquelette a été reporté dans le zygote de *C.elegans* et l'ovocyte de la drosophile (St Johnston and Ahringer, 2010). Elles le régulent aussi dans les cellules épithéliales. Plusieurs études ont montré que PAR-1 et aPKC sont essentielles à l'orientation correcte des microtubules. Tout d'abord, dans les FC mutantes pour *par-1* les extrémités + des microtubules sont délocalisées du domaine basal (Doerflinger et al., 2003). Lors de la cellularisation les microtubules partent des centrosomes vers le domaine basal en arc de cercle autour du noyau, mais sont ensuite réorganisés pour établir les deux axes caractéristiques des cellules épithéliales. La mutation d'*aPKC* provoque le maintien des microtubules au sein des centrosomes, ce qui forment des microtubules en astre comme on peut en observer dans des cellules non-polarisées (Harris and Peifer, 2007).

On a vu précédemment le rôle de Baz sur l'actine via Bitesize (Pilot et al., 2006). Mais Baz est aussi en étroite relation avec la myosine II. L'amioséreuse se forme par un aplatissement de cellules épithéliales cuboïdes pendant la gastrulation. Les cellules sont squameuses et recouvrent le dos de l'embryon, bordées par l'épiderme. Lors de la fermeture dorsale, les cellules de l'amioséreuse pulsent par une contraction apicale de l'acto-myosine et tractent les deux bords médio-latéraux de l'épiderme jusqu'à ce qu'ils se rejoignent (Solon et al., 2009). *Zipper* qui code pour une des chaines de la myosine II interagit génétiquement avec *aPKC, PAR-6* et *baz* lors de la fermeture dorsale. Ils sont tous impliqués dans la

contraction des cellules de l'amioséreuse mais à des phases différentes de l'assemblage/désassemblage de l'acto-myosine (David et al., 2010).

L'élongation de la bandelette germinative se fait par intercalation cellulaire. Lors de ce processus Baz est planaire polarisée (Simões et al., 2010; Zallen and Wieschaus, 2004). La mutation de Baz induit un défaut d'intercalation des cellules et d'élongation du tissu. Baz est enrichie aux jonctions D-V alors que de la myosine II s'accumule aux jonctions A-P. La mutation hypomorphique de *baz*, qui n'affecte pas la localisation subapicale de la myosine II, induit une perte de sa polarisation planaire et de celle des AJ (Simões et al., 2010). Baz est donc requis pour la polarisation planaire et l'intercalation des cellules. Baz doit donc réguler négativement la myosine II aux jonctions D-V. ROCK est requise pour la polarisation planaire de Baz. Baz est phosphorylée par ROCK au niveau de son domaine d'interaction avec les PIP, ce qui est proposé comme inhibant son recrutement cortical (Krahn et al., 2010a; Simões et al., 2010). PTEN, qui interagit avec Baz, a aussi été montré comme ayant un rôle dans l'intercalation cellulaire dans l'aile de la drosophile (Bardet et al., 2013). Les cellules mutantes pour *pten* sont incapables d'allonger les jonctions nouvellement formées car l'activité de la myosine II et de ROCK n'y est pas réduite.

III.3. Le réseau de polarité régule la croissance, la survie et la prolifération

Le développement des épithéliums nécessite une régulation coordonnée de la morphogénèse avec la prolifération, la survie et la croissance des cellules. Les protéines de polarité participent à cette régulation. En effet, les gènes *scrib*, *lgl* et *dlg* sont des suppresseurs de tumeurs. Leur mutation est néoplasique, c'est-à-dire qu'elle provoque une sur-prolifération des cellules accompagnée par la perte de l'intégrité de l'épithélium (Bilder,

2004). Les mutants zygotiques pour le module Scrib se développent normalement jusqu'au stade larvaire, la contribution maternelle étant suffisante pour éviter la perte de polarité des épithéliums embryonnaires (Bilder, 2004; Zeitler et al., 2004). Cependant les larves n'entrent jamais en pupe et continuent de grossir anormalement pendant deux semaines avant de mourir. Dans ces larves géantes, les disques et les lobes optiques sont beaucoup plus grands que dans les larves sauvages, en raison de l'incapacité des cellules à arrêter de proliférer. De la même façon la surexpression de *crb* et la sur-activation d'aPKC ont un effet néoplasique (Grzeschik et al., 2010; Lu and Bilder, 2005). Cet effet pourrait être simplement la conséquence de la perte de polarité des cellules, mais plusieurs études montrent l'implication des protéines de polarité dans la régulation de la prolifération/survie de façon indépendante de leur rôle dans la polarité.

Un crible génétique cherchant à identifier des régulateurs de la Cycline-E, a mis en évidence le rôle de Scrib, Lgl et Dlg dans la progression du cycle cellulaire (Brumby, 2004). L'induction de clones mutants pour *lgl* dans le disque d'œil n'a pas d'effet sur la polarité apico-basale mais induit une sur-prolifération corrélée à une accumulation de Cycline-E (Grzeschik et al., 2007). A l'inverse, dans les photorécepteurs la mutation de *lgl* provoque une perte de polarité sans défaut de prolifération. Ceci suggère que les fonctions de Lgl dans la polarité et le contrôle de la prolifération seraient indépendantes.

Plusieurs protéines du trafic cellulaire ont été identifiées comme suppresseur de tumeur. Leur mutation induit le plus souvent un défaut de localisation corticale du récepteur Notch, ce qui explique en partie leur impact sur la prolifération (Lu and Bilder, 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari and Bilder, 2005; Windler and Bilder, 2010). Ainsi, les protéines de polarité régulant le trafic cellulaire, pourrait influencer la croissance et la prolifération par ce biais

(Shivas et al., 2010). En effet, il a récemment été montré le rôle Lgl dans le trafic de Notch (Parsons et al., 2014).

Plusieurs protéines du réseau de polarité ont été décrites comme affectant directement la voie de survie et prolifération Hippo. La voie de signalisation Hippo inhibe le facteur de transcription Yorkie qui active la transcription de gènes favorisant la prolifération. En amont, de la cascade de signalisation les protéines FERM Expanded (Ex) et Merlin, et la protéine Kibra activent la voie et agissent donc comme des suppresseurs de tumeur (Genevet and Tapon, 2011). La mutation de *lgl* ou la surexpression d'aPKC dans le disque d'aile conduit à la délocalisation du cortex de Hippo et à la sur-activation de Yorkie (Grzeschik et al., 2010).

Les protéines de polarité ont aussi un effet positif sur la survie. Dans le disque d'œil, si l'apoptose est bloquée, le phénotype néoplasique de la mutation *scrib* est aggravé ce qui indique qu'une partie des cellules mutantes pour *scrib* sont éliminées par apoptose (Brumby and Richardson, 2003). Dans l'épiderme, cet effet sur la survie se fait via la voie JNK de façon dépendante des protéines apicales mais pas des protéines latérales (Kolahgar et al., 2011). Enfin, la perte de Cdc-42, PAR-6 ou aPKC conduit à l'activation de la voie JNK de façon dépendante de Rho (Warner et al., 2010).

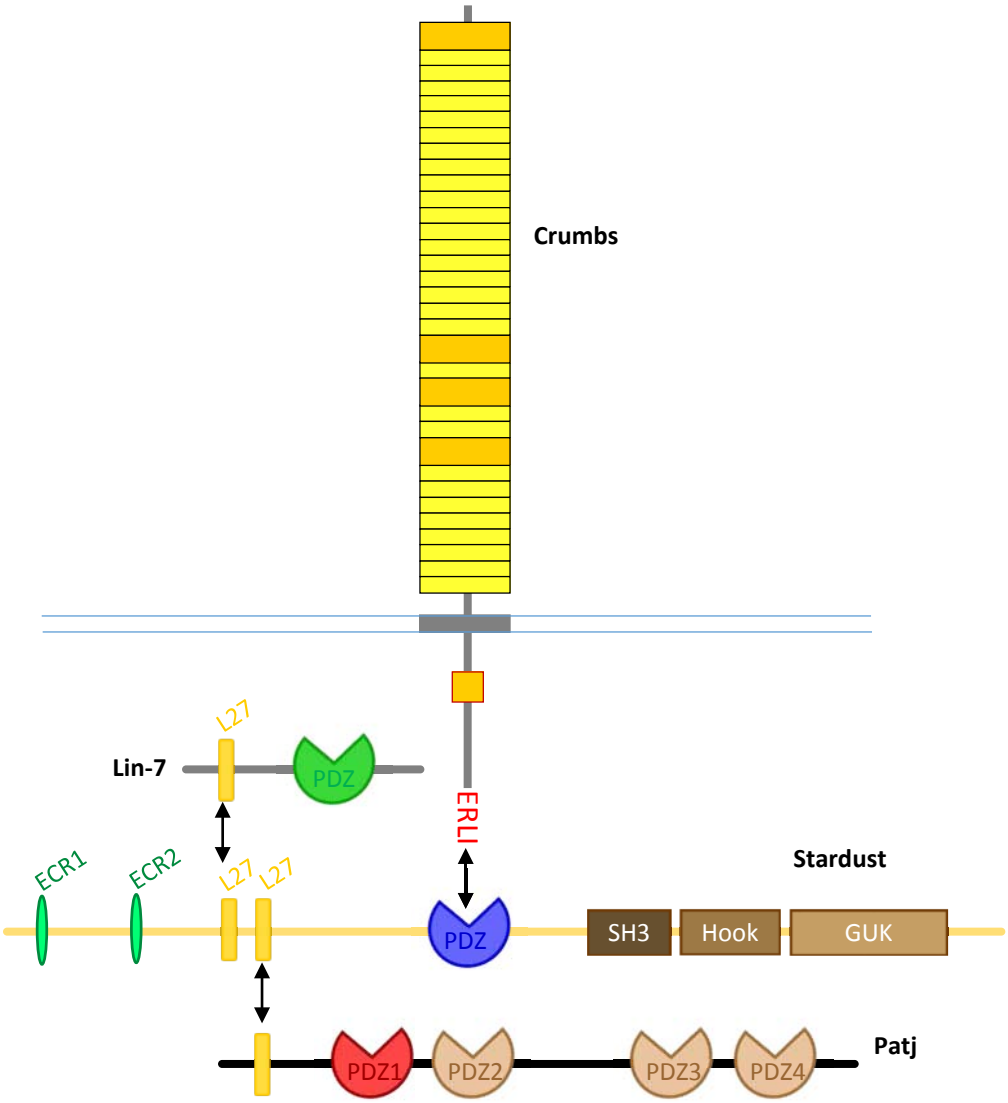


Figure 33 : Le complexe Crumbs.
Le complexe Crb est composé de Crb et de Sdt, qui via son domaine PDZ, interagit avec le motif ERLI de Crb. Sdt recrute Patj et Lin-7, deux protéines PDZs dont les fonctions sont mal connues, au sein du complexe .

IV. Le complexe Crumbs

Sdt, Lin-7 et Patj font partie biochimiquement du complexe Crb, et sont considérées comme des partenaires obligés de Crb puisqu'elles co-localisent avec Crb dans toutes les cellules épithéliales où Crb est exprimée (**Fig.33**). Sdt interagit avec le motif ERLI via son domaine PDZ, et recrute Lin-7 et Patj via ses domaines L27N et L27C respectivement. La localisation de Sdt, Patj et Lin-7 est dépendante de Crb dans les cellules épithéliales. Celle de Crb nécessite Sdt mais pas Lin-7 (Bachmann et al., 2008; Tepass and Knust, 1993).

IV.1. Les nombreuses fonctions de Crumbs

La protéine Crb possède de nombreux partenaires et réalise des fonctions diverses, ces interactions et fonctions étant dépendantes des différents domaines de Crb (**Fig.34**).

Le motif ERLI est requis pour la polarisation des cellules, et interagit avec le PDZ de Sdt et le PDZ de PAR-6, ces deux interactions étant requises pour sa fonction dans la polarité (Klebes and Knust, 2000; Morais-de-Sá et al., 2010).

Le motif FERM est aussi important pour la fonction de Crb. En effet, sa mutation ponctuelle (qui n'affecte pas la phosphorylation par aPKC) est létale homozygote. Cependant elle ne cause pas de défauts de polarité, ce qui indique que sa fonction est indépendante de la fonction de polarisation (Klose et al., 2013). Le motif FERM interagit avec Yurt, Expanded, la Moésine et la βheavy-spectrine (Laprise et al., 2006; Ling et al., 2010; Médina et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Les interactions avec la Moésine et la βheavy-spectrine sont requises pour la stabilité du cytosquelette apical. Elle sont dépendantes du motif FERM, mais il n'est

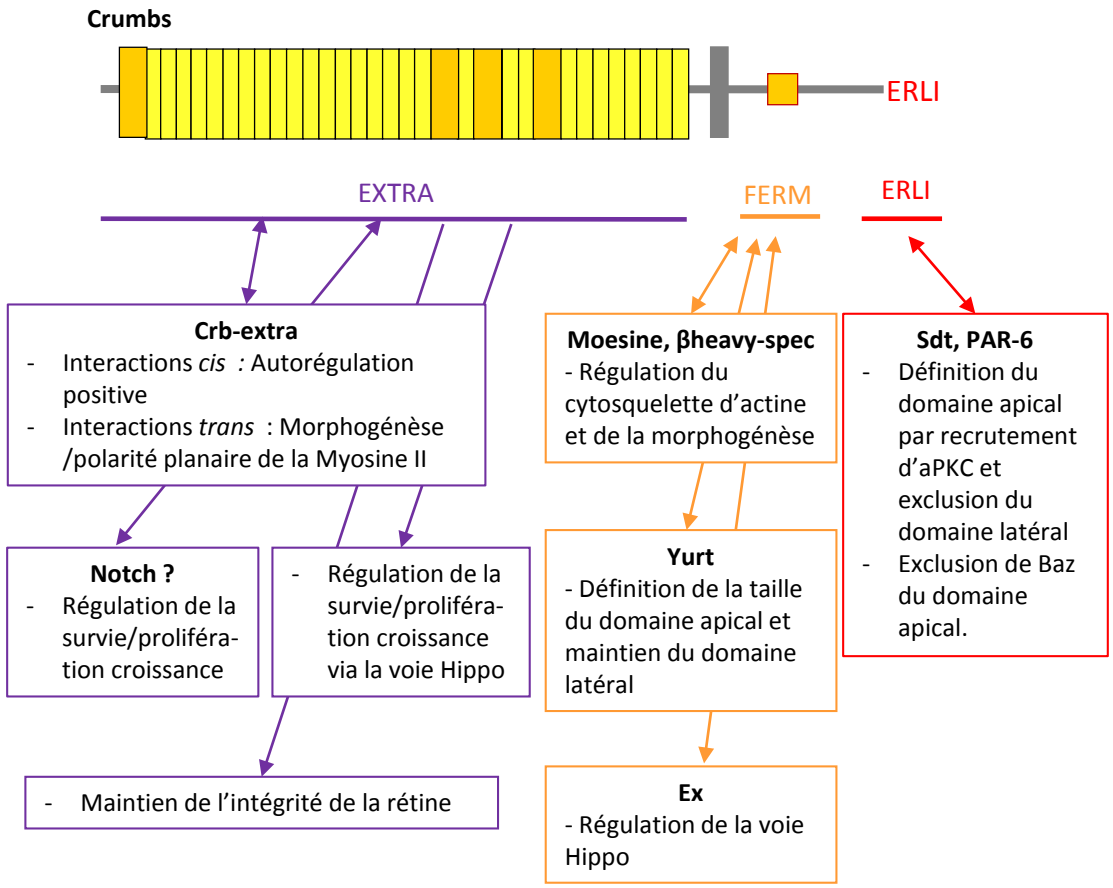


Figure 34 : Les multiples partenaires et fonctions de Crumbs

Ce schéma présente les partenaires et les fonctions des différents domaines de Crb : extracellulaire (**violet**), le motif FERM (**orange**) et le motif ERLI (**rouge**). Via ces partenaires Crb régule la polarité, la morphogénèse et la survie/prolifération/croissance.

pas démontré si elles sont directes (Médina et al., 2002; Pellikka et al., 2002). L'interaction de Crb avec Expanded intervient dans la régulation de la voie de prolifération et de survie Hippo (Chen et al., 2010; Ling et al., 2010; Robinson et al., 2010).

Par ailleurs, le domaine extracellulaire participe aussi à la fonction de Crb. Il a pendant longtemps été ignoré en raison des études menées sur le domaine intracellulaire qui proposaient ce dernie comme suffisant à la fonction de Crb. Cependant ces études reposaient sur l'utilisation de gains de fonction mais pas de mutations ciblées. Une analyse récente a montré que le domaine extracellulaire serait dispensable dans les épithéliums embryonnaires (Klose et al., 2013). Néanmoins il est requis dans d'autres tissus pour la polarité, la régulation de la voie Notch, de Hippo et la morphogénèse de la glande salivaire.

Les fonctions de Crb sont conservées chez les mammifères puisque la réduction de CRB2 ou CRB3 conduit à des défauts de morphogénèse au cours du développement de la souris, celle de CRB1 à des défauts dans la rétine et celle de CRB3 à des défauts de polarité en cellules MDCK ou Caco2 (Le Bivic, 2013). CRB1 et CRB2 sont principalement exprimées dans le système nerveux et les yeux, alors que CRB3 qui a le domaine extracellulaire le plus court semble spécifique des épithéliums (Assémat et al., 2008). L'expression exogène de CRB3, dans des cellules en culture, induit le recrutement des protéines apicales et la formation des TJ dans la zone marginale (Fogg et al., 2005; Whiteman et al., 2014).

IV.1.3. Crumbs au cœur de la morphogénèse

La mutation de *crb* n'induit pas de défauts majeurs avant le stade 9 de l'embryogénèse et il n'est pas requis de la même façon dans tous les épithéliums (Grawe et al., 1996; Tepass, 1996). En fait, Crb serait essentielle dans les épithéliums pendant leur

morphogénèse pour maintenir le domaine apical lors des réarrangements cellulaires. L'inhibition des réarrangements cellulaires est capable de sauver partiellement les défauts de polarité induits par la mutation *crb* dans la bandelette germinale et les tubes de Malpighi (Campbell et al., 2009).

Lors de la formation des ommatidies de l'œil de drosophile, les photorécepteurs développent des replis qui effectuent une rotation de 90° et se différencient en rhabdomères, les organes photosensibles de la drosophile. Le domaine apical est à la surface des replis. La mutation de *crb* n'induit pas de défaut précoce dans le développement des photorécepteurs. Dans ces cellules la polarisation est assurée par Baz cependant Crumbs est ensuite requise pour exclure Baz du repli et favoriser la formation des AJ le long du repli (Nam and choi, 2003). Dans les mutants *crb* les jonctions ne parviennent pas à se répartir le long du repli, ce qui empêche l'élongation du rhabdomère. De plus, les photorécepteurs mutants montrent une perte de la βheavy-spectrine de la membrane apicale (Pellikka et al., 2002). Crb et la βheavy-spectrine interagissent génétiquement. Crb pourrait donc réguler la morphogénèse des photorécepteurs via son interaction avec la Moésine et les spectrines. En accors avec cette idée, le rôle de Crb dans l'allongement des rhabdomères est en partie dépendant du motif FERM (Izadoost et al., 2002). De plus, la Moésine est aussi requise pour la morphogénèse des rhabdomères (Karagiosis and Ready, 2004).

La fonction de Crb dans la formation des rhabdomères est aussi dépendante du domaine extracellulaire (Izadoost et al., 2002). Cependant, il n'est pas seulement requis pour la morphogénèse des photorécepteurs mais aussi pour leur intégrité à l'âge adulte (Johnson et al., 2002; Mishra et al., 2012; Richard et al., 2009). En effet, les yeux mutants pour *crb* montrent une dégénération progressive si ils sont exposés à la lumière, et sa mutation chez

l'humain est retrouvée dans une maladie de dégénérescence de la rétine. Cette fonction de Crb dans le maintien de l'intégrité des photorécepteurs est liée à sa capacité à réduire la production de radicaux libres d'oxygènes délétères pour la cellule, et à inhiber la mort cellulaire (Chartier et al., 2012).

Un autre exemple du rôle de Crb dans la morphogénèse est retrouvé dans les trachées (Laprise et al., 2010; Letizia et al., 2011). La cellule trachéale s'invagine par une constriction apicale caractérisée par l'accumulation de l'actine et des AJ. En absence de Crb cette accumulation ne se produit pas et les cellules ne parviennent pas à s'invaginer (Letizia et al., 2011). Cette action de Crb est dépendante de la Moésine.

Crumbs est capable d'établir des interactions homophiles entre ces domaines extracellulaires en *trans* et en *cis*, et pourrait donc agir comme une molécule d'adhésion (Zou et al., 2012; Röper, 2012; Chen et al., 2010; Fletcher et al., 2012). Crb est responsable de la mise en place de l'anisotropie de la myosine II nécessaire à la tubulogénèse de la glande salivaire (Röper, 2012). De façon intéressante, il a été proposé que l'anisotropie de la myosine serait induite négativement par une anisotropie de Crb médiée par des interactions *trans* à la surface apicale des cellules.

IV.1.4. La régulation de la voie Hippo

Ex, un des régulateurs de la voie Hippo est localisé en apical des cellules épithéliales. Son recrutement est dépendant de son interaction avec le motif FERM de Crb. La mutation de *crb* ou sa surexpression délocalisent Ex et induisent une hyperplasie des disques qui indique que la voie Hippo n'est plus active (Chen et al., 2010; Ling et al., 2010; Robinson et al., 2010). De façon intéressante la voie Hippo est régulée par plusieurs

molécules d'adhésion comme les cadhérines atypiques Fat (Genevet and Tapon, 2011). L'adhésion cellule-cellule entre les molécules de Crb pourrait donc induire l'activation de la voie Hippo (Chen et al., 2010). Le mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation positive de la voie par Crb reste encore à déterminer.

IV.1.5. Régulation de la voie Notch

Notch est une protéine transmembranaire qui régule de nombreux processus cellulaires comme la différenciation ou la croissance. Notch possède deux ligands : Delta et Serrate. Leur fixation en *trans* à Notch induit le clivage de son domaine extracellulaire qui conduit à l'internalisation par la γ-sécrétase de la portion intracellulaire. Ensuite la partie intracellulaire peut gagner le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles. La régulation de Notch est complexe et fait notamment intervenir des interactions *cis* et *trans* à la surface des cellules (del Álamo et al., 2011). En 2006, une étude a montré que Crb régule négativement l'activité de la γ–sécrétase (Herranz et al., 2006). La mutation de *crb* dans la tête de la drosophile ne perturbe pas son organisation (excepté dans les photorécepteurs), mais sa taille (Richardson and Pichaud, 2010). La tête apparaît plus grosse que dans les conditions sauvages et l'expression d'un rapporteur de la voie Notch y est augmentée. De plus, Notch et Crb interagissent génétiquement. Crb régule donc négativement la signalisation Notch. La surexpression du domaine extracellulaire de Crb sauve le défaut de taille de la tête, suggérant qu'il serait responsable de l'effet sur Notch. Chez le poisson zèbre, le domaine extracellulaire de Crb interagit avec le domaine extracellulaire de Notch (Ohata et al., 2011). Si cette interaction est conservée, des interactions *cis* et/ou *trans* entre Crb et Notch pourrait moduler l'activité de Notch et/ou de Crb.

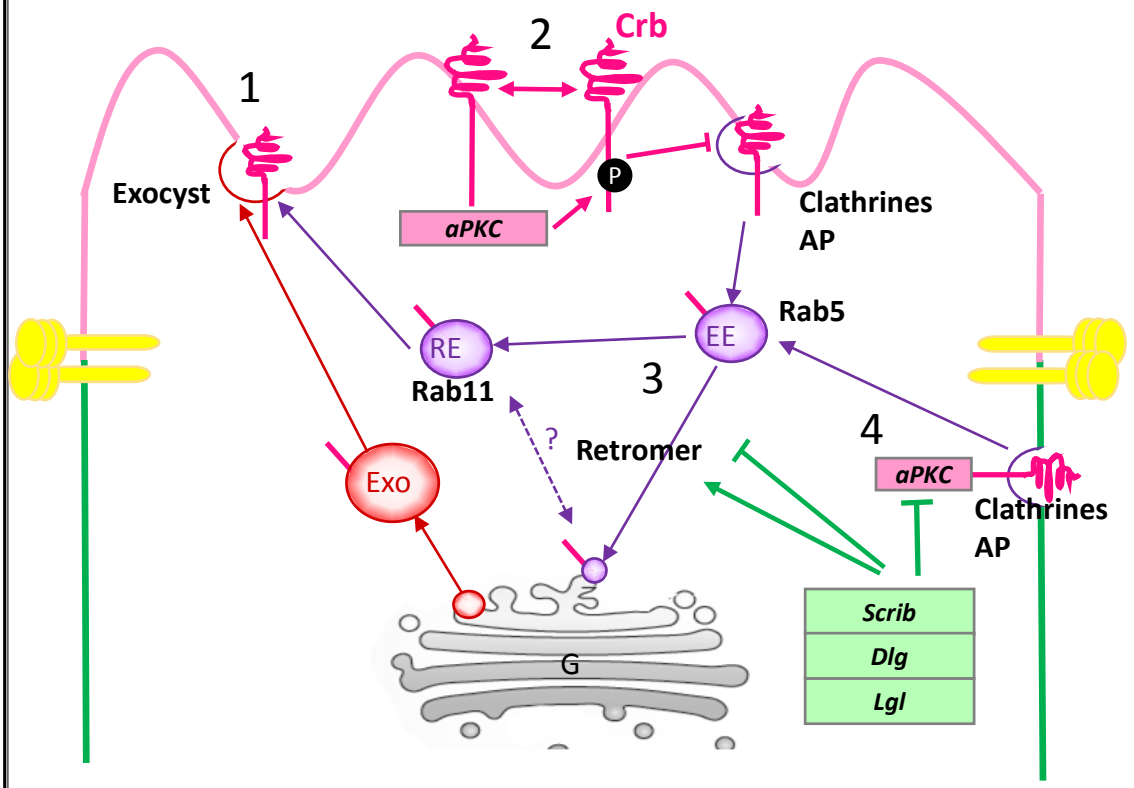


Figure 35 : La régulation de Crb nécessite sa régulation positive à la membrane et son trafic cellulaire.

L'adressage de Crb (**rose fuchsia**) à la membrane nécessite tout d'abord l'exocyst (**1**). Ensuite, il doit être maintenu au cortex apical et éliminé du cortex latéral. (2) Son maintien apical nécessite sa dimèrisation extracellulaire et sa phosphorylation par aPKC. (**3**) Si Crb est endocytée elle peut être régulée positivement en étant recyclée et en retournant à la membrane apicale plutôt qu'en étant dégradée. Cette action est remplie par Rab11 et le complexe Retromer qui sont tous deux nécessaires au maintien du niveau normal de Crb au cortex apical. Le recyclage de Crb est donc un élément important de sa régulation. (**4**) Les protéines Crb au cortex latéral doivent être endocytée. L'endocytose est dépendante des APs et des clathrines, si elle est bloquée Crb se localise ectopiquement au cortex latéral. L'endocytose de Crb est probablement favorisée par l'inhibition d'aPKC par les protéines latérales, puisque qu'aPKC participe au maintien de Crb au cortex. Enfin, le module Scrib régule le complexe Retromer : même s'il n'est pas clair si cela se fait par une activation ou une inhibition, le module Scrib joue un rôle dans le trafic de Crb.

IV.2. Régulation et maintien de Crumbs

Etant une protéine transmembranaire, la régulation de Crb est dépendante du trafic cellulaire. L'adressage initial de Crb au cortex est mal connu mais dépend de l'exocyst (**Fig.35,1**), (Blankenship et al., 2007). Lorsqu'elle est surexprimée, Crb se localise tout le long du cortex ce qui suggère que son adressage n'est pas restreint au domaine apical (Fletcher et al., 2012; Wodarz et al., 1995). La régulation de Crb doit probablement se faire préférentiellement par la régulation différentielle de son endocytose et de son recyclage entre les différents domaines corticaux. A noter que la localisation asymétrique de l'ARNm et la traduction localisée de Crb, mais aussi de Sdt, serait une composante de son ciblage vers l'apical (Horne-Badovinac and Bilder, 2008; Li et al., 2008).

L'endocytose et le recyclage de Crb

La mutation d'*avalanche* qui code pour une syntaxine ou de *rab5*, induit une perte de polarité dans les FC et une sur-prolifération dans les disques d'ailes (Fletcher et al., 2012; Lu and Bilder, 2005). Ce défaut est caractérisé par l'accumulation ectopique d'aPKC dans les FC et une accumulation de Crb dans les disques d'aile. Les syntaxines sont requises pour la fusion des vésicules avec leur compartiment cible et sont donc impliquées à la fois dans l'exocytose et dans l'endocytose. Rab5 est un marqueur des endosomes précoces. Dans les FC la mutation d'*ap-2* induit aussi l'accumulation corticale de Crb (de Vreede et al., 2014). L'endocytose est donc requise pour limiter le niveau cortical de Crb (**Fig.35,4**).

A l'inverse l'expression d'un dominant négatif de Rab11, un régulateur des endosomes de recyclage, phénocopie la mutation de *crb* et induit une perte corticale de Crb dans l'épiderme (Roeth et al., 2009). Le recyclage serait donc important pour le maintien de

Crb au cortex (**Fig.35,3**). Cette idée a été démontrée en 2011 par deux études analysant le rôle du complexe Retromer (Pocha et al., 2011; Zhou et al., 2011).

La mutation *vps35* qui code un des composants du complexe Retromer phénocopie la mutation de *crb* dans l'épiderme de l'embryon et dans les FC et Crb nétant plus localisée au domaine apical (Pocha et al., 2011; Zhou et al., 2011). Lorsque que la partie cytoplasmique de CRB2 est incluse dans des liposomes, elle interagit avec deux membres du complexe Retromer : Vps35 et Vps26, ce qui montre que Crb est bien ciblée par le complexe (Pocha et al., 2011). Dans les mutants *vps35*, le recyclage de Crb est donc défectueux et doit être probablement dégradé dans les lysosomes. L'incubation d'ovaires avec de la leupeptine, qui bloque l'activité des lysosomes, permet dans des FC mutantes pour *vps35* la détection de spots intracellulaires de Crb qui co-localisent avec un marqueur des lysosomes. Le blocage du recyclage de Crb conduit donc à sa dégradation. La double mutation de *vps35* et de *shibire* qui contrôle l'endocytose, montre le même défaut d'accumulation de Crb à la membrane que celle de *shibire* seule. Retromer agit donc après l'internalisation de Crb dans des endosomes.

Régulation de trafic de Crb par le réseau de polarité

Le trafic de Crb est régulé par les protéines du réseau de polarité. Le mécanisme moléculaire par lequel le module Scrib inhibe l'expansion des protéines apicales est mal connu. Une étude récente a soulevé l'idée que ces protéines latérale régulent le trafic de Crb (de Vreede et al., 2014). Dans les disques d'aile la mutation de *scrib, lgl,* ou *dlg* induit, comme il a été précédemment montré dans d'autres épithéliums une expansion de Crb ectopique. Néanmoins, le niveau cortical de Crb dans ces disques mutants est beaucoup plus faible que dans des mutants pour *ap-2* ou *avalanche*, et est associée à une accumulation

sub-corticale de Crb. Cette réduction de Crb cortical pourrait être causée par un défaut dans le trafic de Crb dans les mutants pour le module Scrib. Par des approches génétiques les auteurs ont montré que le module scrib n'affecte pas l'endocytose de Crb mais régule le complexe Retromer, de façon à la fois dépendante et indépendante d'aPKC. Les phénotypes des mutants pour le Retromer et *scrib* étant opposés, Scrib ne régule pas positivement le retromer. Cependant la réduction de Retromer aggrave les phénotypes des mutants hypomorphiques *scrib*, le module Scrib ne régule donc pas non-plus négativement Retromer. Ainsi Scrib aurait un rôle subtil dans la régulation du Retromer.

Au cortex apical, l'endocytose doit être inhibée pour permettre le maintien d'une dose suffisante de Crb à la membrane (**Fig.35,2**). Dans le neuro-ectoderme exprimant un dominant négatif de Cdc42, Crb est délocalisé du cortex et retrouvée dans des vésicules intracellulaires endocytiques qui co-localisent avec un marqueur des endosomes (Harris and Tepass, 2008). Cdc42 se localise en spots dans la zone marginale, aux AJ et dans le cytoplasme, suggérant une association à des vésicules. De plus, le blocage de l'endocytose précoce par un dominant négatif de Rab5 restaure le niveau de Crb cortical. Ensemble ces données montrent que Cdc42 régule négativement l'endocytose de Crb pour le maintenir à la membrane. Les défauts associés au dominant négatif de Cdc42 étant sauvés partiellement par la surexpression d'aPKCCAAX, l'inhibition de l'endocytose de Crb par Cdc42 passe donc en partie par le recrutement d'aPKC.

Autorégulation, et stabilité de Crb dans les cellules folliculaires

Un autre niveau de régulation de Crb qui semble tissu spécifique a été mis en évidence (Fletcher et al., 2012). Dans les FC, la protéine mutée pour les sites de phosphorylation par aPKC (Crb^{pmut}), est incapable de se localiser au cortex lorsqu'elle est

surexprimée dans un fond génétique mutant pour *crb*, alors qu'elle y parvient en condition sauvage (aussi mentionné dans la Partie III.1.6, **Fig.32B**). La présence de Crb sauvage est donc capable de recruter Crb^{pmut} et la phosphorylation de Crb par aPKC est requise pour la localisation *de novo* de Crb à la membrane. A l'inverse, le domaine extracellulaire seul parvient à s'accumuler au cortex apical et latéral, dans les deux fonds génétiques. Le domaine extracellulaire est donc autonome pour sa localisation et son maintien au cortex. Crb^{intra} n'est pas capable de se localiser à la membrane si elle est surexprimée dans un contexte sauvage. Ces données montrent que Crb s'autorégule positivement via son domaine extracellulaire, mais nécessite aussi d'être phosphorylée par aPKC pour sa localisation corticale. Basé sur le fait que le domaine extracellulaire de Crb s'homo-dimèrise, les auteurs ont proposé un modèle dans lequel le domaine extracellulaire de Crb permet la formation de dimère qui avec « l'activation » de Crb par aPKC participerait à son maintien au cortex dans les FC. Dans l'embryon le domaine extracellulaire de Crb est dispensable et la surexpression de Crb^{intra} est suffisante pour localiser ectopiquement Crb et induire un effet gain de fonction (Klebes and Knust, 2000; Klose et al., 2013; Wodarz et al., 1995). Cette régulation de Crb est donc requise de manière tissu spécifique.

IV.3. Stardust : structure et fonction

Sdt possède, en C-terminal, les trois domaines SH3, Hook, et GUK caractéristiques de la famille protéique MAGUK (**Fig.36A**). Sdt contient un domaine PDZ, deux domaines d'interaction protéine-protéine L27 (lin2-Lin-7 binding) et aussi deux séquences conservées au cours de l'évolution ERC1/ERC2 dans sa partie N-terminale qui lient PAR-6 (**Fig.36A**). Sdt interagit directement avec Crb via son domaine PDZ Crb et les deux protéines sont interdépendantes. Cependant, la surexpression de Sdt n'a que peu d'impact.

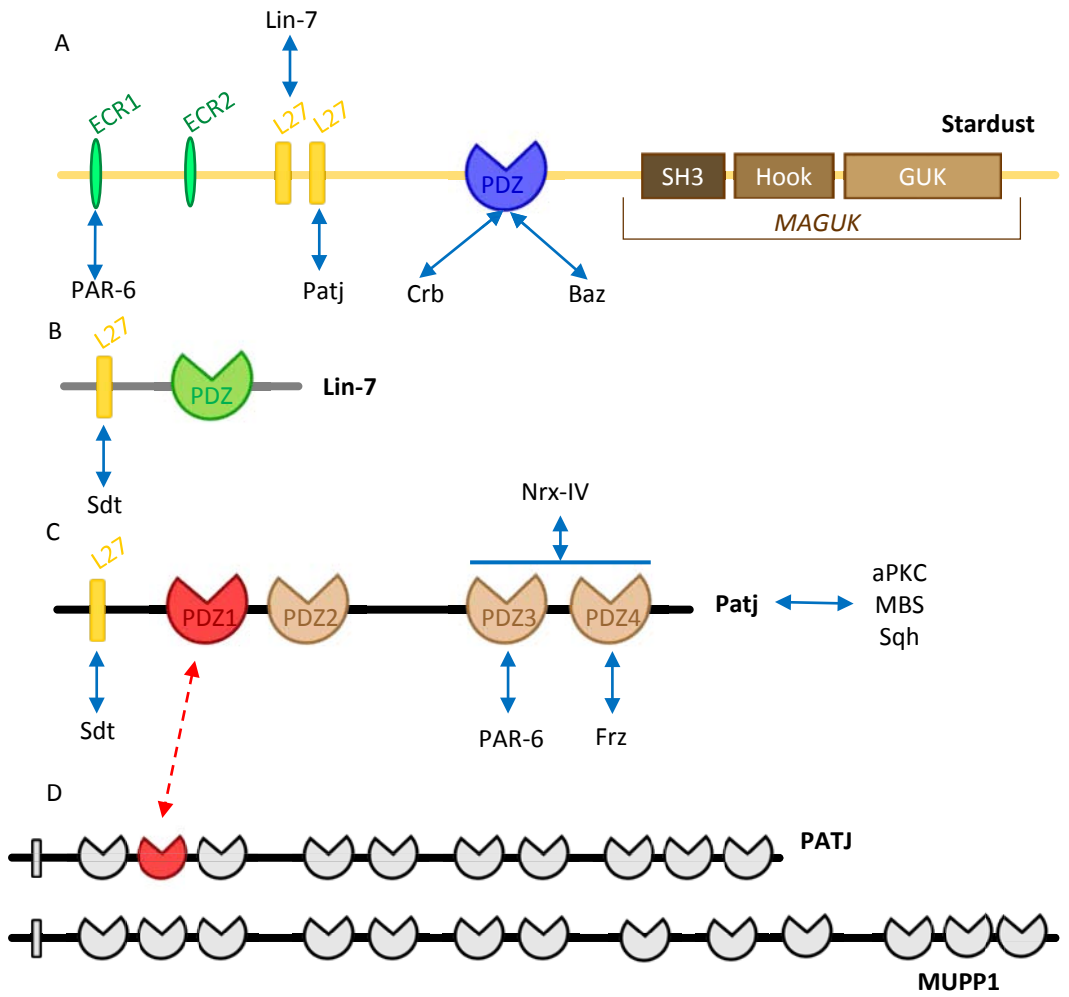


Figure 36 : Structure et partenaires de Sdt, Lin-7 et Patj.

(**A**) Sdt possède deux régions conservées dont une interagit avec PAR-6, deux domaines L27 qui interagissent avec les domaines L27 de Patj et de Lin-7, et un domaine PDZ qui s'associe à Crb ou à Baz. (**B**) Lin-7 est composé d'un domaine L27 et un domaine PDZ. (**C**) Patj en plus de son domaine L27 possède quatre domaines PDZ chez la drosophile. Les PDZ3 et PDZ4 s'associent à PAR-6, Frz et la Nrx-IV.

Aucun partenaire n'est connu pour le PDZ de Lin-7, le domaine MAGUK de Sdt ou les PDZ1 et PDZ2 de Patj. (**D**) Chez les mammifères il existe deux paralogues de Patj : PATJ et MUPP1. Les deux conservent le domaine L27 mais contiennent 10 et 13 domaines PDZ respectivement.

Sdt interagit avec Patj et Lin-7 via ces deux domaines L27 qui sont situés en tandem. Des analyses structurales sur des domaines L27 isolés indiquent qu'ils forment des hétérotétramères (deux L27N Sdt avec deux L27 PATJ et deux L27C Sdt avec deux L27 Lin-7), (Feng et al., 2004; Feng et al., 2005). Néanmoins, si les deux domaines L27 de Sdt sont conservés en tandem et que PATJ et Lin-7 sont tous les deux présents, alors il y a formation d'héterotrimères Sdt/PATJ/Lin7 (Zhang et al., 2012).

Sdt possède cinq isoformes : Sdt-A, Sdt-B, Sdt-D, Sdt-H et Sdt-F (Bachmann et al., 2001; Berger et al., 2007; Bulgakova et al., 2010; Hong et al., 2001; Wang et al., 2004). Sdt-F et Sdt-B sont exprimées dans les épithéliums de l'embryon, dans les FC et les photorécepteurs, même si Sdt-B n'est exprimée que précocement dans les épithéliums (Bachmann et al., 2001; Berger et al., 2007; Bulgakova et al., 2010; Hong et al., 2001; Tanentzapf et al., 2000; Wang et al., 2004). Sdt-A qui ne possède pas de domaine PDZ et de domaine MAGUK complet n'a été détectée que dans des extraits d'embryon. Sdt-H et Sdt-D sont toutes deux exprimées dans la rétine où elles y accomplissent des fonctions différentes l'une de l'autre (Bulgakova et al., 2010). En effet la surexpression de Sdt-H augmente la longueur du rhabdomère, celle de Sdt-D réduit la taille du rhabdomère et induit une dégénérescence de la rétine lumière-dépendante comme la mutation de *crb*. Ces deux isoformes de Sdt remplissent donc des fonctions antagonistes au sein des photorécepteurs. De la même façon une analyse structure—fonction de Sdt, a montré que les domaines de Sdt sont différemment requis en fonction des stades de développement des photorécepteurs (Bulgakova et al., 2008). Une telle analyse n'a pas été réalisée dans les épithéliums, mais ces données suggèrent que l'incorporation de différentes isoformes de Sdt au sein du complexe Crb pourrait permettent de moduler de façon tissu spécifique l'activité de Crb, voire de faire coexister différentes formes du complexe.

IV.4. Lin-7 : structure et fonction

Lin-7 comporte un domaine L27 et un domaine PDZ (**Fig.36B**). Le gène *veli* a été identifié comme codant l'homologue de *C*LIN-7 et *m*Lin-7. Son domaine L27 interagit avec Sdt et dans les cellules épithéliales Lin-7 est recrutée en apical par Sdt (donc indirectement par Crb). (Bachmann et al., 2004; Bachmann et al., 2008). La fonction de son domaine PDZ n'est pas connue.

Les mutants pour le gène *veli* sont viables homozygotes et fertiles. Dans les FC et les photorécepteurs, la mutation de *veli* n'a pas d'effet sur la localisation de Crb, Sdt ou Patj, et n'induit ni défaut de polarité, ni défaut de morphogénèse bien que la protéine soit présente en apical (Bachmann et al., 2008). Lin-7 est donc dispensable pour polarité épithéliale et le développement de la drosophile. Sa mutation ne perturbe pas la morphogénèse des rhabdomères des photorécepteurs, mais conduit à l'âge adulte à une dégénérescence progressive de la rétine lorsqu'elle est exposée à la lumière. Crb est aussi requis pour l'intégrité de la rétine adulte, cependant la fonction de Lin-7 n'est pas liée à sa présence au sein du complexe Crb. En effet, une analyse clonale a révélé que Lin-7 n'est pas requise dans les photorécepteurs, mais dans les neurones associés à ces photorécepteurs. Dans les neurones sa localisation ne dépend pas de Crb mais du complexe CASK/Dlg-S97, qui est aussi requis pour le maintien de l'intégrité de la rétine (Soukup et al., 2013).

IV.5. Patj : structure et fonction

IV.5.1. Structure de Patj

Patj possède un domaine L27 qui interagit avec Sdt, et quatre domaines PDZ. Chez les mammifères, Patj possède deux homologues : PATJ qui contient le domaine L27 et dix domaines PDZ et MUPP1 (Multi-PDZ Protein 1) qui a treize domaines PDZ. Ces deux homologues montrent des pourcentages de similitude de leurs domaines élevés, et leur PDZ sont aussi proches de ceux de dPATJ. Par exemple le PDZ1 de Patj est similaire au PDZ2 de PATJ et MUPP1 (Fig.36D). PATJ et MUPP1 s'associent toutes deux à Sdt, mais forment des complexes Crbs différents puisque Sdt n'interagit pas simultanément avec les deux (Assémat et al., 2013).

Chez la drosophile, le PDZ3 de Patj interagit avec PAR-6 et le PDZ4 avec Frizzled (Djiane et al., 2005; Nam and choi, 2003). Les domaines PDZ3-4 interagissent avec la Nrx-IV (Bhat et al., 1999). Patj interagit aussi avec aPKC mais les domaines impliqués dans cette interaction ne sont pas connus (Sotillos et al., 2004). Chez les mammifères, les domaines PDZ de PATJ interagissent notament avec des protéines des TJ comme la Claudine1 ou ZO-3, avec AMOT un régulateur de la voie Hippo, ou encore avec TSC2 un régulateur de la voie de croissance TOR (Massey-Harroche et al., 2007; Roh et al., 2002; Wells et al., 2006).

IV.5.2. La fonction de PATJ dans les cellules mammifères

Le gène *dlt* (*disc lost*) a été identifié comme codant une protéine PDZ qui co-immunoprécipite avec Crb de façon dépendante du motif ERLI (Bhat et al., 1999; Klebes and Knust, 2000). En 2002, une recherche in silico visant à prédire l'homologue de *dlt* chez

l'humain a identifié les gènes *hInadl* et *hMupp1* (Lemmers et al., 2002). La protéine INADl est localisée au TJ des cellules Caco2 et sa surexpression induit des défauts de formation des TJ. De plus, INADl co-immunoprécipite avec *d*Crb et CRB3 de façon dépendante du motif ERLI. Cette protéine a été nommée PATJ pour *Protein Associated to Tight Junctions*. En parallèle une autre étude a aussi montré qu'INADL fait partie du complexe Crb (Roh et al., 2002). Le domaine L27 de PATJ interagit directement avec le domaine L27C de PALS1/Sdt. PATJ est donc lié à Crb de façon indirecte chez les mammifères comme chez la drosophile (Bulgakova et al., 2008; Roh et al., 2002).

Dans les MDCK, la mutation du L27 de PALS1 prévient sa localisation aux TJ, ce qui montre qu'elle est dépendante de PATJ. Respectivement la réduction de PALS1 prévient la localisation apicale de PATJ (Straight et al., 2004). L'ARN interférence de PATJ dans les cellules caco2 et les cellules MDCK induit la délocalisation de PALS1, de Crb, de l'occludine et de ZO-3, qui résulte en un délai dans la formation des TJ (Michel et al., 2005; Shin et al., 2005). Dans ces cellules Crb est relocalisée dans des endosomes, PATJ favorise donc la stabilité de Crb (Michel et al., 2005). Si les cellules sont cultivées en 3D, elles forment des cystes polarisés, et la réduction de PATJ empêche cette polarisation (Shin et al., 2005). PATJ joue donc un rôle dans la polarité épithéliale.

MUPP1 s'associe aussi avec le plupart des partenaires de Patj, cependant elle ne semble pas jouer de rôle dans la polarité des cellules épithéliales (Adachi et al., 2009).

IV.5.3. La génétique autour de Patj : une succession d'erreurs.

En 1999, un crible en double hybride visant à identifier des partenaires de la Nrx-IV, a isolé une protéine contenant quatre domaines PDZ et interagissant avec son motif PDZ

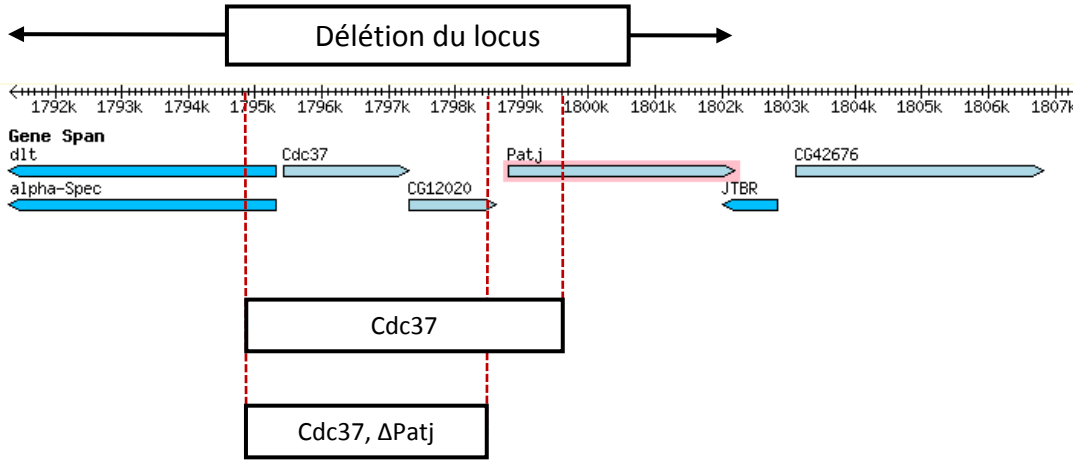


Figure 37 : La génétique autour de Patj.

Image issue de Flybase et présentant la structure du locus contenant Patj. Plusieurs gènes s'y trouvent : l'*α-spectrine*, *dlt* inséré dans un intron de l' *α-caténine*, *Cdc37*, *CG12020*, *Patj*, *JTBR* et *CG42676*. La délétion utilisée par Pielage et al., va de l' *α-spec* à *Patj* et a été complémentée par le les ANDc de l'*α-spec* et de *dlt* sous contrôle d'un promoteur ubiquitine, et par la séquence génomique Cdc37. Cette portion Cdc37 contient cependant la partie N-terminale de Patj comprenant les domaine L27 et PDZ1. Une nouvelle complémentation a été réalisée par Nam et al., avec la séquence Cdc37, ΔPatj et a montré que l'absence de Patj est létale.

(EIFI) (Bhat et al., 1999). Les auteurs ont identifié le gène *disc lost* comme codant la protéine isolée. In vitro, en précipitation GST (Glutathione-S-Transferase), Dlt interagit directement avec Crb et dimèrise via ses domaines PDZ3-4. Plus tard, il a été mis en évidence que Dlt co-immunoprécipitait avec Crb de façon dépendante du motif ERLI (Klebes and Knust, 2000). Dlt fait donc partie biochimiquement du complexe Crb.

La protéine Dlt est exprimée dès la cellularisation et se localise en basal des cellules. Ensuite elle devient apicale et co-localise avec Crb dans plusieurs épithéliums. Dans cette étude un mutant *dlt* a été généré par excision d'élément P. La mutation *dlt* provoque des défauts de polarité dans l'embryon. Ainsi Dlt serait requise pour la polarité épithéliale et participerait à la fonction du complexe Crb.

Les travaux chez les mammifères ont permis d'identifier Dlt comme l'homologue de PATJ. Cependant, la mutation de *dlt* qui est homozygote létale en larve dans l'étude de 1999, n'est plus létale en larve combinée en trans-hétérozygote avec d'autres allèles mutants de *dlt*. Cette létalité n'est donc peut-être pas causée par la mutation de *dlt* mais par une autre mutation sur le chromosome (Pielage et al., 2003). Ce constat fait en 2003 a poussé les auteurs à analyser de nouveau les mutants *dlt* et à s'apercevoir que *dlt* ne code pas l'homologue de PATJ mais l'homologue de la Codanine-1. *d*Patj est codé par un autre gène présent dans le même locus. Ce locus contient les gènes *α-spectrine*, *dlt*, *Cdc37*, *CG1202*, *Patj* et *JTBR*, le gène *dlt* étant inséré dans le premier intron de l'α-spectrine un déterminant connu de la polarité (**Fig.37**). La mutation générée en 1999 affecte non seulement *dlt* mais aussi l'ATG de l'α-spectrine, conduisant à une double mutation (**Fig.37**). La production de nouveaux mutants *dlt* a montré que sa perte n'induit pas de perte de polarité, mais des défauts de prolifération. Le phénotype observé précédemment est donc

dû à la mutation de l'*α-spectrine*. Afin de déterminer la fonction de Patj, les auteurs ont complémenté une délétion du locus s'étendant de l'*α-spectrine* à *Patj*, avec plusieurs transgènes comportant chacun des gènes du locus excepté *Patj*. La délétion de *Patj* ainsi générée, n'a pas d'effet sur la viabilité ni sur la polarité des cellules, Patj serait donc dispensable pour le développement et la polarité épithéliale.

Néanmoins, cette étude contient elle aussi une erreur génétique. En effet, le transgène utilisé pour restaurer *cdc37* et *CG12020* ne contient pas uniquement ces deux gènes, mais aussi 780 paires de bases de la partie 5' de Patj (**Fig.37**), (Nam and Choi, 2006). Ces 780 pb correspondent aux 280 premiers acide-aminés de Patj qui contiennent le domaine L27 et le premier domaine PDZ. Dans ce test de complémentation *Patj* est donc toujours présente mais tronquée pour les PDZ2 à 4. Pielage et al., avaient conclu que la complémentation du locus ne comprenait plus *Patj*, puisque que la protéine Patj n'était plus détectable en immuno-marquage, l'anticorps utilisé étant dirigé contre la partie C-terminale de Patj. Un nouvel anticorps a donc été utilisé et a permis de montrer que dans les mutants de 2003, Patj, bien que tronquée, est toujours présente et correctement localisée en apical dans les photorécepteurs.

Une nouvelle délétion de *Patj* a donc été produite par une complémentation propre. La perte de Patj induit une létalité en larve, et conduit à une réduction de Crb et Sdt de la membrane apical des photorécepteurs. Dans la lignée ne contenant que les domaines L27 et PDZ1, les photorécepteurs montrent des défauts de morphogénèse et dégénèrent sous l'effet de la lumière (Nam and Choi, 2006; Richard et al., 2006). Un ou plusieurs des PDZ2 à 4 sont donc requis pour la fonction de Patj dans l'œil de la drosophile. Cette fonction pourrait être expliquée par l'interaction du PDZ3 avec Par6, et/ou du PDZ4 avec Frizzled. Frizzled

(Frz1) est un des récepteurs de la voie de la polarité planaire. Il interagit avec Patj, et constitue une cible d'aPKC (Djiane et al., 2005). La phosphorylation de Frz1 par aPKC nécessite l'interaction Patj-Frz1 et conduit à l'inhibition de Frz1. Ainsi, Patj régule la polarité planaire de l'œil.

IV.5.4. Objectifs de la thèse

Les analyses visant à analyser la fonction de Patj déjà réalisées en conditions hypomorphes et en culture chez les mammifères, ou via une génétique complexe chez la drosophile, montrent que Patj est essentielle et jouerait un rôle au sein du complexe Crb. Néanmoins, sa fonction précise reste à déterminer. Mon projet de thèse vise donc à comprendre la fonction de Patj. Pour cela des mutants nuls de *Patj* ont été générés au sein du laboratoire. Au cours de ma thèse j'ai voulu atteindre plusieurs objectifs.

1) Tout d'abord, j'ai caractérisé le phénotype causé par la mutation *Patj*. Ces travaux m'ont permis de confirmer que *Patj* est essentiel pour la viabilité, mais dispensable en embryon. J'ai ensuite analysé *Patj* dans les cellules folliculaires, et mis en évidence son rôle dans la régulation de la polarité et du maintien de la forme des cellules épithéliales.

2) Afin de déterminer quel(s) domaines de Patj sont nécessaires et/ou suffisants pour sa fonction, j'ai mené une analyse structure-fonction. De plus, j'ai testé une possible redondance d'une part entre les domaines de Patj et d'autre part entre Patj et Lin-7.

3) J'ai recherché par un crible d'interactions protéiques et des recherches bio-informatiques quel partenaire de Patj pourrait expliquer comment cette protéine réalise sa fonction à l'échelle moléculaire. Cette recherche m'a permis de proposer un modèle mécanistique que j'ai tenté de montrer par des approches biochimiques et génétiques.

CHAPITRE II : RÉSULTATS

I. Patj régule positivement le complexe Crb

Afin d'étudier la fonction de Patj, des mutants nuls pour le gène *Patj* ont été générés au sein du laboratoire par mobilisation d'un élément P. Plusieurs allèles délétant le site d'initiation de la traduction de Patj ont été isolés. Ces mutants sont « protéine nuls » et sauvés par un transgène Patj sous contrôle d'un promoteur ubiquitine. La mutation maternelle et zygotique ou la mutation zygotique de *Patj* sont létales à l'état homozygote, mais autorisent le développement jusqu'au stade pupal. Patj est donc dispensable en embryon et en larve. Chez l'adulte, la mutation de *Patj* dans le FE entraîne une diminution des niveaux apicaux de Crb et Sdt, corrélée à une diminution d'aPKC. Cette déstabilisation du complexe Crb n'est cependant pas suffisante pour induire une perte de polarité. Dans 20% des follicules contenant un clone mutant, on observe un défaut morphogénétique avec l'aplatissement de cellules *Patj-/-*. Cet aplatissement est plus sévère dans les clones *sdt* et *crb* suggérant qu'il serait une conséquence de la fragilisation de la polarité. Ainsi, Patj joue un rôle plus subtil que celui de Crb et Sdt dans la polarité épithéliale. Par une analyse structure-fonction, j'ai déterminé que les domaines L27 et PDZ1 sont ensemble suffisants à la fonction de Patj. Le transgène codant L27-PDZ1 sauve à la fois la létalité des mutants *Patj* et la localisation de Crb dans le FE. Dans les FC, la surexpression de *crb* et la mutation *Patj* se suppriment l'une l'autre. Patj régule donc positivement Crb dans ce tissu. Ensemble ces données suggèrent que la fonction majeure de Patj est de réguler positivement l'activité

et/ou la stabilité du complexe Crb et ce de façon tissu spécifique. Ce travail a donné lieu à une publication, en 2012, dans la revue *Development*, présentée ci-desous.

Development 139, 4549-4554 (2012) doi:10.1242/dev.085449
© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

Tissue-specific function of Patj in regulating the Crumbs complex and epithelial polarity

Clothilde Pénalva and Vincent Mirouse*

SUMMARY

Patj is described as a core component of the Crumbs complex. Along with the other components, Crumbs and Stardust, Patj has been proposed as essential for epithelial polarity. However, no proper in vivo genetic analysis of Patj function has been performed in any organism. We have generated the first null mutants for *Drosophila Patj*. These mutants are lethal. However, Patj is not required in all epithelia where the Crumbs complex is essential. Patj is dispensable for ectoderm polarity and embryonic development, whereas more severe defects are observed in the adult follicular epithelium, including mislocalisation of the Crumbs complex from the apical domain, as well as morphogenetic defects. These defects are similar to those observed with *crumbs* and *stardust* mutants, although weaker and less frequent. Also, gain-of-function of Crumbs and *Patj* mutation genetically suppress each other in follicular cells. We also show that the first PDZ domain of Patj associated with the Stardust-binding domain are sufficient to fully rescue both *Drosophila* viability and Crumbs localisation. We propose that the only crucial function of Patj hinges on the ability of its first two domains to positively regulate the Crumbs complex, defining a new developmental level of regulation of its dynamics.

KEY WORDS: Crumbs, Epithelium, Follicular cells, Polarity

INTRODUCTION

Epithelial polarity relies on the dynamic interplay of several protein complexes that define the different cortical domains (Laprise and Tepass, 2011; St Johnston and Ahringer, 2010). Among these, the Crumbs (Crb) complex plays key roles in the definition of the apical domain and in the organisation and positioning of the first apical junction, which are adherens junctions in *Drosophila* and tight junctions in mammals (Tepass et al., 1990; Wodarz et al., 1995; Bulgakova and Knust, 2009; Morais-de-Sá et al., 2010; Bazellieres et al., 2009; Hurd et al., 2003). At the molecular level, essential components of the Crb complex are Crb, Stardust (Sdt; PALS1) and Patj. Crb is a transmembrane protein; its cell polarity function depends on a C-terminal PDZ binding motif (ERLI) that binds Sdt (Klebes and Knust, 2000; Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Roh et al., 2002). Patj has been isolated as a component of the Crb complex via direct interaction with Sdt, involving heterodimerisation of their L27 domains (Roh et al., 2002; Bulgakova et al., 2008). To mediate its function in polarity, the Crb complex also interacts in multiple ways with other polarity determinants, including the PAR6/aPKC complex (Hurd et al., 2003; Kempkens et al., 2006; Lemmers et al., 2004; Krahn et al., 2010). These interactions together reflect the intricate dynamics of these complexes, which have yet to be fully elucidated.

There are genetic data clearly showing the importance of Crb and Sdt, but less is known about Patj. Reducing PATJ protein levels in mammal cell culture leads to destabilisation of the Crb complex and to defects in tight junction assembly (Lemmers et al., 2002; Michel et al., 2005; Shin et al., 2005). However, this phenotype is mild compared with those of *Crb* or *Sdt* mutants, and one could assume that the difference reflects hypomorphic conditions. Genetic data in fruit flies have failed to produce any clear picture of *Patj* function, although the gene appears to be essential for viability (Bhat et al., 1999; Nam and Choi, 2006; Pielage et al., 2003; Richard et al., 2006).

Here we present the first null mutants for the *Drosophila Patj* gene. This analysis reveals a tissue-specific requirement for the stability of the Crb complex at the apical membrane.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila genetics

Patj mutants were generated by imprecise excision of *P{GSV2}GS50262*. Excisions that were lethal when crossed with the *Df(3L)My10* deficiency were analysed at the molecular level. Only deletions exclusively affecting *Patj* were retained ($Patj^{53}$, $Patj^{58}$, $Patj^{63}$) and recombined with *FRT2A*. Rescue by a *Patj* transgene was assessed for all alleles.

Clonal analyses were performed using the flp/FRT or MARCM systems with GFP as marker for wild-type or mutant cells, respectively. Flies were dissected 4 days after clone induction by heat shock. Mutant stocks are *FRT2A*, *Patj*, *FRT19A*, sdt^{K85} (Berger et al., 2007) and *FRT82B*, crb^{1} (Tepass et al., 1990). Overexpression was performed using Tub:Gal4 flip-out or MARCM systems. UAS transgenes are *UASt:Patj* (Bhat et al., 1999) and $UASt:crb^{WT\text{-}30.12e}$ (Wodarz et al., 1995). For embryo analysis, maternal contribution was removed using the flp/FRT Ovo^{D1} system and zygotic mutants were selected by the absence of *TM3, twi:Gal4, UAS:eGFP*.

Transgenes

The *Patj* genomic rescue transgene was produced by cloning a genomic PCR fragment into the pCASPER4 vector. *Patj* transgenes for structure/function analysis, including a full-length transgene, were produced by PCR on *Patj* cDNA and cloning with and without GFP for C-terminal fusions in pWRpAUbiqP, which contains a *Ubiquitin-63E* promoter. Transgenic flies were generated by Fly Facility.

Immunostaining

Immunofluorescent staining was performed according to standard protocols using the following primary antibodies: rabbit anti-PKCz (1/500; C-20, Santa Cruz), mouse anti-Dlg (1/50; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), rabbit anti-Baz (1/1000) (Wodarz et al., 1999),

GReD Laboratory, UMR CNRS 6293, Clermont Université, INSERM U1103, Faculté de Médecine, place Henri-Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France.

*Author for correspondence (vincent.mirouse@u-clermont1.fr)

Accepted 21 September 2012

rat anti-Crb (1/500) (Pellikka et al., 2002), and rabbit anti-Patj (1/500) (Tanentzapf et al., 2000). Images were acquired on a Leica SP5 microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Patj null mutations are lethal

No proper mutation of the *Patj* gene was available, limiting its genetic manipulation. In order to generate *Patj* mutants, 100 excisions of a *P*-element-based transgene inserted in the 5' region of *Patj* were produced (Fig. 1A). We identified three internal deletions of *Patj* associated with lethality. $Patj^{58}$ and $Patj^{63}$ delete start codons, whereas $Patj^{53}$ shows complete deletion of the coding sequence. A rescue construct containing the *Patj* gene and 300 bp upstream of its transcription start site perfectly rescued the lethality and fertility of *Patj* mutants. We therefore assumed these alleles to be null mutations for *Patj*, and we confirmed the absence of Patj protein in mutant follicle cells as compared with the surrounding wild-type cells (Fig. 1B). Our results confirm previous findings that *Patj* is an essential gene (Nam and Choi, 2006; Richard et al., 2006). However, despite previous reports that *Patj* mutants die during the second instar larval stage, we found that *Patj* homozygotes or transheterozygotes could reach the pupal stage, highlighting the utility of bona fide null mutants. We also produced maternal *Patj* germline clones to test whether maternal contribution could mask embryonic phenotype. However, maternal and zygotic null mutants were able to reach the pupal stage, like the zygotic mutants, indicating that *Patj* is dispensable for embryonic development. In addition, we failed to detect polarity defects in the embryonic ectoderm upon examining the localisation of Crb and other polarity markers (Fig. 1C,D; data not shown).

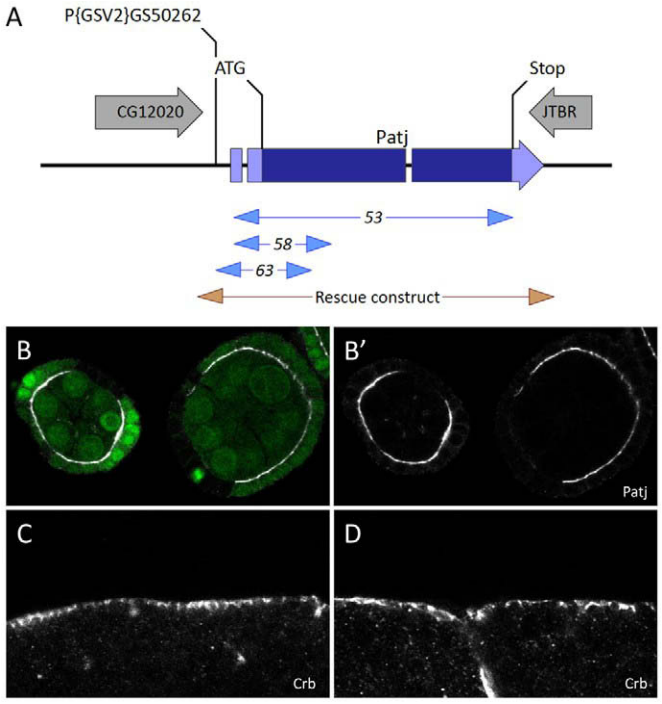


Fig. 1. Null mutants for *Patj*. (**A**) The *Drosophila Patj* locus. The site of the *P{GSV2}GS50262* insertion, deletion mutations and the rescue transgene are indicated. (**B**,**B'**) Mutant clones for $Patj^{53}$ in follicular cells stained for Patj (white). Mutant cells are marked by the absence of GFP (green). (**C**,**D**) Normal apical localisation of Crb in zygotic (C) or maternal zygotic (D) embryos mutant for *Patj*.

Patj regulates Crb complex stability

We therefore analysed *Patj* function in another tissue; we looked at the follicular epithelium that surrounds the germline cysts of the ovary. We first investigated the localisation of the other Crb complex members Crb and Sdt. Both showed partial mislocalisation from the apical domain in *Patj* mutant as compared with wild-type cells. This phenotype is usually weak during early stages (1-5), but tends to gain strength later, leading in some cases to a complete apical loss of both Sdt and Crb, thus indicating that Patj is required for Crb complex stability at the apical domain (Fig. 2A,B). Absence of Crb and Sdt from the apical domain is not associated with a strong cytoplasmic accumulation of these proteins, suggesting that they might be degraded. Because Crb and Sdt are important for defining the apical domain of epithelial cells, we also looked at the localisation of other polarity markers. aPKC is also less apically enriched in *Patj* mutant cells than in wild-type cells, although the effect on this key polarity determinant is weaker than that observed for Sdt and Crb (Fig. 2C,D). Baz protein is also globally absent from the apical domain, but remains in subapical spots that might correspond to adherens junctions (Fig. 2E) (Morais-de-Sá et al., 2010). Also, we did not observe any lateral markers, such as Discs large (Dlg), extending apically in *Patj* mutant cells, which is usually the case when the apical domain is no longer specified (Fig. 2F).

In agreement with these results, we found extremely rare cases (<1%) in which a loss of polarity of *Patj* mutant cells was indicated by the formation of multilayers or round cells (Fig. 2H). However, we observed a cell flattening in *Patj* mutant clones compared with wild-type cells in ~20% of the follicle-containing clones (Fig. 2F,G). This flattening always affected cells on the lateral side of the follicles. We compared the *Patj* phenotype with those of *crb* and *sdt* mutants (Fig. 2I; supplementary material Figs S1, S2). As previously described, *crb* mutation frequently induced multilayers (42%) and cell flattening (22%) (Tanentzapf et al., 2000). *sdt* mutation also induced the same defects, with multilayers (31%) and some flat cells in the epithelium (37%). Moreover, *crb* and *sdt* mutant cells showed a greater loss of apical markers than *Patj* cells (supplementary material Figs S1, S2). Taken together, our data suggest that the flattening is a mild phenotype, whereas multilayer formation corresponds to a stronger polarity phenotype. Our results therefore suggest that the loss of any one of the three core components of the Crb complex leads to similar phenotypic traits, but with the severity of defects decreasing in the order *crb*, *sdt*, *Patj*. The importance of Crb as a polarity determinant is also apparent through the extension of the apical domain and disruption of epithelial architecture when Crb is overexpressed (Tanentzapf et al., 2000; Wodarz et al., 1995). Mirroring the loss-of-function experiments, Sdt overexpression in follicle cells leads to less pronounced defects than Crb overexpression (Horne-Badovinac and Bilder, 2008). Similar clonal overexpression of Patj did not induce any polarity defect in follicle cells (Fig. 2J; data not shown), confirming that Patj plays a more subtle role in epithelial polarity than Crb and Sdt.

The L27 and first PDZ domain are sufficient for Patj function

It has been shown that the L27 domain and the first of the four PDZ domains of Patj are able to rescue lethality associated with *Patj* deletion (Nam and Choi, 2006). We produced several *Patj* transgenes to provide a more accurate structure-function analysis. A full-length *Patj* transgene compared with a transgene encoding these two domains exhibited no differences; both were able to fully

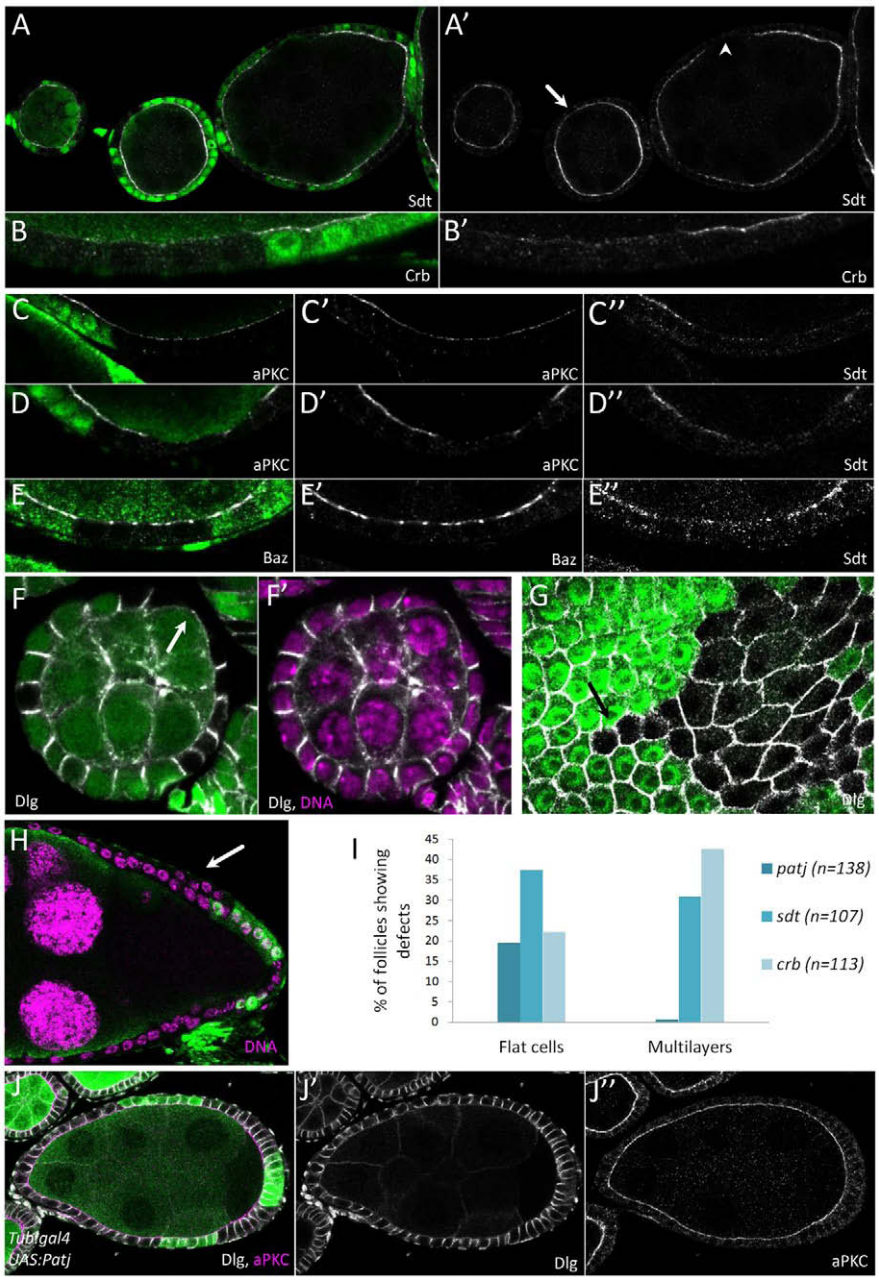


Fig. 2. *Patj* mutant phenotype in the follicular epithelium. (**A-H**) *Patj* null mutation clones viewed in transverse (A-F,H) or planar (G) section stained (white) for Sdt (A,A',C",D",E"), Crb (B,B'), aPKC (C,C',D,D'), Baz (E,E'), Dlg (F-G) and for DNA (purple, F',H). Mutant cells are marked by the absence of GFP (green). (A,A') Sdt loss from the apical domain can be partial (arrows) or complete (arrowhead). (B-E") Reduction in the apical domain of Crb, aPKC and Baz is also observed. (F-G) *Patj* mutant clones showing a cell flattening defect. This defect is not observed in all the cells, which is in part owing to the genotype of the surrounding cells (arrow in G). (H) *Patj* mutant clone forming a multilayer (arrow). (**I**) Quantification of *Patj*, *sdt* and *crb* phenotypes in follicular cells. Percentages of follicles containing mutant clones and showing multilayers or cell flattening. (**J-J"**) Clonal overexpression of Patj (green cells) does not induce any polarity defect in follicular cells as visualised with Dlg (J', white in J) and aPKC (J", purple in J).

rescue *Patj* mutant-associated lethality (Fig. 3A,B). In addition, we investigated Crb localisation in follicle cells mutant for *Patj* in flies carrying these transgenes. The presence of full-length Patj or L27-PDZ1 proteins fully rescued the Crb complex localisation and cell flattening phenotype (Fig. 3A,B). By contrast, transgenes encoding only L27 or only PDZ1 failed to rescue lethality, Crb localisation or cell flattening in follicle cells mutant for endogenous *Patj* (Fig. 3C,D). A similar inability to rescue the lethality was observed in flies expressing L27 and PDZ1 as encoded by two distinct transgenes (Fig. 3E). Taken together, these results show that all the essential functions of Patj are concentrated in these two domains and that they have to be linked together. Also, the ability of *Patj* transgenes to rescue lethality is correlated with their ability to restore apical localisation of the Crb complex, suggesting that this constitutes the main function of Patj.

Analysis of the subcellular localisation of the different Patj domains fused to GFP indicates that the PDZ1 domain localises on its own to the apical domain, although less efficiently than proteins containing the L27 domain, suggesting that PDZ1 can bind an apical protein (Fig. 3A-D). Whereas L27 domain binding to Sdt is well established, what binds to the PDZ1 domain is far less clear. No partner has been identified in flies, and only a few proteins are proposed to link to the mammalian PATJ PDZ2 domain, which corresponds to fly PDZ1. One of these is TSC2 (Massey-Harroche et al., 2007), but we failed to find similar interaction between the *Drosophila* proteins. Mammalian PATJ PDZ2 also interacts with angiomotin (AMOT), and this interaction seems robust because it is conserved with the other members of the AMOT protein family and the mammalian paralogue of PATJ called MUPP1 (MPDZ) (Sugihara-Mizuno et al., 2007; Wells et al., 2006). However, the *Drosophila* genome does not contain any member of the AMOT family. These data suggest the existence of an as yet unidentified apical ligand of PDZ1 that is essential for Patj function.

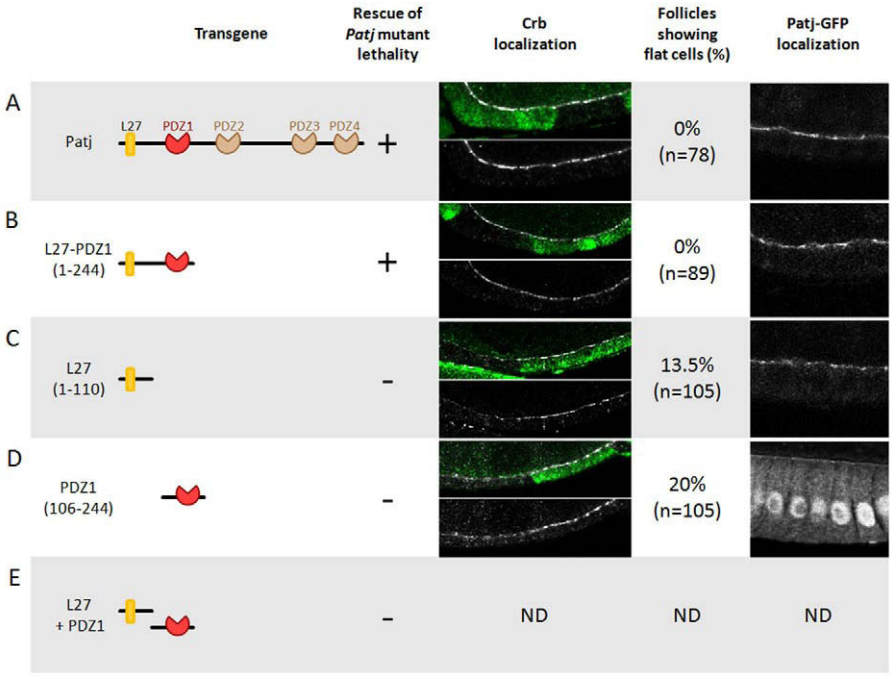


Fig. 3. Structure-function analysis of Patj. (**A**) Full-length Patj, (**B**) L27 + PDZ1 domains, (**C**) L27 domain, (**D**) PDZ1 domain, (**E**) L27 and PDZ1 domains encoded by two independent transgenes. The ability of these transgenes to rescue *Patj* mutant lethality is indicated. *Patj* mutant clones in the follicular epithelium are marked by the absence of GFP and stained for Crb (white) in flies containing the different transgenes. Quantification of the cell flattening phenotype is shown. The L27 and PDZ1 domains are necessary and sufficient for rescue of Crb localisation and lethality. The final column illustrates the subcellular localisation in the follicular cells of the different Patj proteins as visualised by GFP. ND, not determined.

Genetic interaction between *Patj* and Crb

All the defects caused by *Patj* mutation are therefore also present in other mutants of the Crb complex, and at least one of the two key domains of Patj interacts directly with Sdt. Taken together, these results suggest that the main function of Patj is to regulate the Crb complex. We took advantage of the moderate effect of *Patj* mutation on follicle cell polarity to look for genetic interaction with a Crb gain-of-function. We analysed the phenotype of *Patj* MARCM mutant clones overexpressing Crb, and compared their effects with both *Patj* mutant and Crb overexpression on their own. As previously described, Crb overexpression disrupts follicular cell polarity, as seen by extension of aPKC localisation to the lateral domain and from the spheroidal shape of the cells, and can lead to multilayer formation (Fig. 4A; data not shown) (Tanentzapf et al., 2000). Crb overexpression also blocks the cuboid-to-squamous transition of a subpopulation of follicular cells, termed stretched

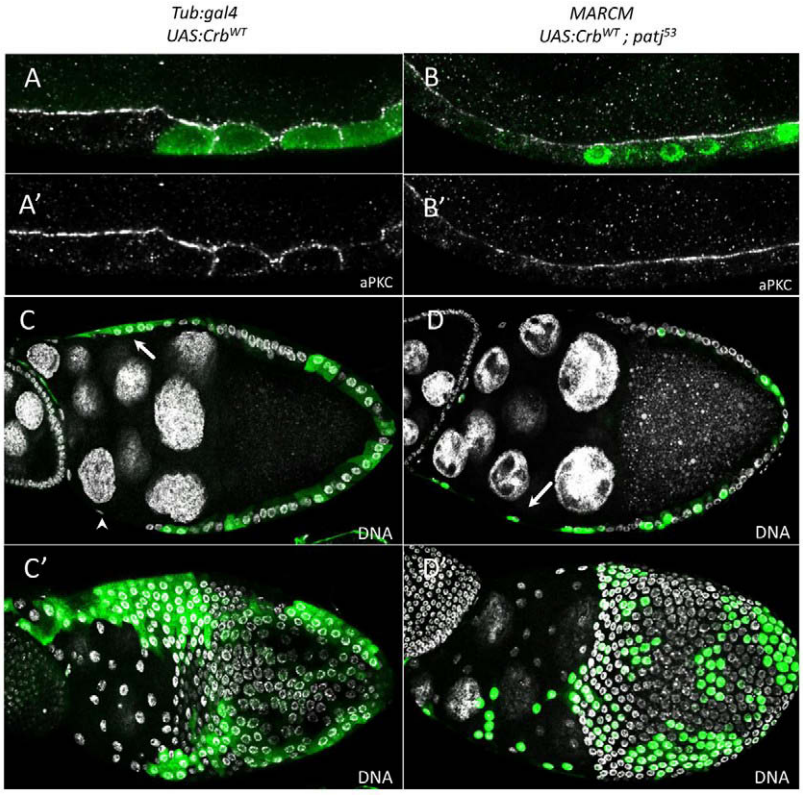


Fig. 4. Genetic interaction between *Patj* and *crb*. Clonal overexpression (green, positive cells) of Crb in wild-type (A,C) or *Patj* mutant (B,D) cells. (**A**,**A'**) Crb overexpression induces a loss of cell polarity that can be visualised by an extension of aPKC cortical staining and by the spheroidal shape of the cells. (**B**,**B'**) This phenotype is suppressed when the cells are mutant for *Patj*. (**C**,**C'**) Transverse section (C) and top view (C'). Crb overexpression blocks cell flattening of anterior cells at stage 9 of oogenesis (arrow compared with arrowhead). (**D**,**D'**) Transverse section (D) and top view (D'). This defect is suppressed when the cells are mutant for *Patj*. Also, Crb overexpression rescues the various *Patj* mutant defects observed in follicular cells (see Fig. 2).

cells, at stage 9 of oogenesis (Fig. 4C) (Grammont, 2007). *Patj* MARCM mutant clones overexpressing Crb exhibit normal morphology, and aPKC no longer extends to the lateral domain of the cells, even though it is slightly more enriched on the apical domain (Fig. 4B). Thus, we never observed a reduction in aPKC at the apical domain, in contrast to *Patj* mutant cells. In addition, Crb overexpression also fully rescues the cell flattening that results from the loss of Patj, whereas the absence of Patj restores the normal stretching of anterior cells at stage 9 (Fig. 4D). Thus, Crb overexpression and null mutation for *Patj* suppress each other for all the defects that we observed in follicle cells. These genetic data lead to the conclusion that the essential function of Patj is to positively regulate the Crb complex.

The *Patj* mutant phenotype suggests that it might be important for delivering or stabilising Crb at the apical membrane or for promoting its recycling from endosomes. PATJ knockdown in human cells leads to CRB mislocalisation from the apical cortex and its accumulation in early endosomes (Michel et al., 2005). Interestingly, Rab11 and the retromer are both important for Crb recycling in *Drosophila* (Pocha et al., 2011; Roeth et al., 2009; Zhou et al., 2011). However, they exercise this function in the embryo, where Patj is largely dispensable, indicating that Patj is not essential for Crb recycling.

Patj requirement appears stronger in some epithelia than in others, with no impact on embryonic ectoderm polarity but stronger defects in the follicular epithelium. Structure-function analyses of Sdt and Crb lead to similar conclusions, with the requirements for Sdt or Crb domains seeming to differ from one epithelial tissue to another (Wodarz et al., 1995; Bit-Avragim et al., 2008; Bulgakova and Knust, 2009; Fletcher et al., 2012). The reason for such differences remains to be elucidated. The Crb complex is also involved in the control of cell proliferation and cell morphogenetic processes other than the establishment or maintenance of epithelial polarity (Bulgakova and Knust, 2009; Grusche et al., 2010; Kerman et al., 2008; Laprise et al., 2010; Letizia et al., 2011; Xu et al., 2008). Modulation of its activity by Patj might participate in these developmental functions of the Crb complex.

Note added in proof

During the editorial process, another article was published describing *Drosophila Patj* mutants and their phenotypic analysis (Zhou and Hong, 2012).

Acknowledgements

We thank E. Knust, U. Tepass, A. Wodarz, K. W. Choi and S.-C. Nam for providing flies and reagents. We also thank the ICCF Confocal Microscopy Facility at Clermont University.

Funding

C.P. and V.M. are supported by an ATIP-Avenir grant, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material available online at
http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.085449/-/DC1

References

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E. (2001). Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-643.

Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J. P., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2009). Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front. Biosci.* **14**, 2149-2169.

Berger, S., Bulgakova, N. A., Grawe, F., Johnson, K. and Knust, E. (2007). Unraveling the genetic complexity of Drosophila stardust during photoreceptor morphogenesis and prevention of light-induced degeneration. *Genetics* **176**, 2189-2200.

Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. and Bellen, H. J. (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833-845.

Bit-Avragim, N., Hellwig, N., Rudolph, F., Munson, C., Stainier, D. Y. and Abdelilah-Seyfried, S. (2008). Divergent polarization mechanisms during vertebrate epithelial development mediated by the Crumbs complex protein Nagie oko. *J. Cell Sci.* **121**, 2503-2510.

Bulgakova, N. A. and Knust, E. (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J. Cell Sci.* **122**, 2587-2596.

Bulgakova, N. A., Kempkens, O. and Knust, E. (2008). Multiple domains of Stardust differentially mediate localisation of the Crumbs-Stardust complex during photoreceptor development in Drosophila. *J. Cell Sci.* **121**, 2018-2026.

Fletcher, G. C., Lucas, E. P., Brain, R., Tournier, A. and Thompson, B. J. (2012). Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize crumbs in the Drosophila follicle cell epithelium. *Curr. Biol.* **22**, 1116-1122.

Grammont, M. (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in Drosophila melanogaster oogenesis. *J. Cell Biol.* **177**, 139-150.

Grusche, F. A., Richardson, H. E. and Harvey, K. F. (2010). Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Curr. Biol.* **20**, R574-R582.

Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001). Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634-638.

Horne-Badovinac, S. and Bilder, D. (2008). Dynein regulates epithelial polarity and the apical localization of stardust A mRNA. *PLoS Genet.* **4**, e8.

Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**, 137-142.

Kempkens, O., Médina, E., Fernandez-Ballester, G., Ozüyaman, S., Le Bivic, A., Serrano, L. and Knust, E. (2006). Computer modelling in combination with in vitro studies reveals similar binding affinities of Drosophila Crumbs for the PDZ domains of Stardust and DmPar-6. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 753-767.

Kerman, B. E., Cheshire, A. M., Myat, M. M. and Andrew, D. J. (2008). Ribbon modulates apical membrane during tube elongation through Crumbs and Moesin. *Dev. Biol.* **320**, 278-288.

Klebes, A. and Knust, E. (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in Drosophila. *Curr. Biol.* **10**, 76-85.

Krahn, M. P., Bückers, J., Kastrup, L. and Wodarz, A. (2010). Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J. Cell Biol.* **190**, 751-760.

Laprise, P. and Tepass, U. (2011). Novel insights into epithelial polarity proteins in Drosophila. *Trends Cell Biol.* **21**, 401-408.

Laprise, P., Paul, S. M., Boulanger, J., Robbins, R. M., Beitel, G. J. and Tepass, U. (2010). Epithelial polarity proteins regulate Drosophila tracheal tube size in parallel to the luminal matrix pathway. *Curr. Biol.* **20**, 55-61.

Lemmers, C., Médina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A. (2002). hINADl/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5408-5415.

Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Médina, E., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1324-1333.

Letizia, A., Sotillos, S., Campuzano, S. and Llimargas, M. (2011). Regulated Crb accumulation controls apical constriction and invagination in Drosophila tracheal cells. *J. Cell Sci.* **124**, 240-251.

Massey-Harroche, D., Delgrossi, M. H., Lane-Guermonprez, L., Arsanto, J. P., Borg, J. P., Billaud, M. and Le Bivic, A. (2007). Evidence for a molecular link between the tuberous sclerosis complex and the Crumbs complex. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 529-536.

Michel, D., Arsanto, J. P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J. and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4049-4057.

Morais-de-Sá, E., Mirouse, V. and St Johnston, D. (2010). aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in Drosophila epithelial cells. *Cell* **141**, 509-523.

Nam, S. C. and Choi, K. W. (2006). Domain-specific early and late function of Dpatj in Drosophila photoreceptor cells. *Dev. Dyn.* **235**, 1501-1507.

Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143-149.

Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. and Klämbt, C. (2003). The Drosophila cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev. Cell* **5**, 841-851.

Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. and Knust, E. (2011). Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr. Biol.* **21**, 1111-1117.

Richard, M., Grawe, F. and Knust, E. (2006). DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the Drosophila eye. *Dev. Dyn.* **235**, 895-907.

Roeth, J. F., Sawyer, J. K., Wilner, D. A. and Peifer, M. (2009). Rab11 helps maintain apical crumbs and adherens junctions in the Drosophila embryonic ectoderm. *PLoS ONE* **4**, e7634.

Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. and Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* **157**, 161-172.

Shin, K., Straight, S. and Margolis, B. (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* **168**, 705-711.

St Johnston, D. and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* **141**, 757-774.

Sugihara-Mizuno, Y., Adachi, M., Kobayashi, Y., Hamazaki, Y., Nishimura, M., Imai, T., Furuse, M. and Tsukita, S. (2007). Molecular characterization of angiomotin/JEAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes Cells* **12**, 473-486.

Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J. and Tepass, U. (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during Drosophila oogenesis. *J. Cell Biol.* **151**, 891-904.

Tepass, U., Theres, C. and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787-799.

Wells, C. D., Fawcett, J. P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C. et al. (2006). A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* **125**, 535-548.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. *Cell* **82**, 67-76.

Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature* **402**, 544-547.

Xu, N., Keung, B. and Myat, M. M. (2008). Rho GTPase controls invagination and cohesive migration of the Drosophila salivary gland through Crumbs and Rho-kinase. *Dev. Biol.* **321**, 88-100.

Zhou, B., Wu, Y. and Lin, X. (2011). Retromer regulates apical-basal polarity through recycling Crumbs. *Dev. Biol.* **360**, 87-95.

Zhou, W. and Hong, Y. (2012). Drosophila Patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability. *Development* **139**, 2891-2896.

DEVELOPMENT

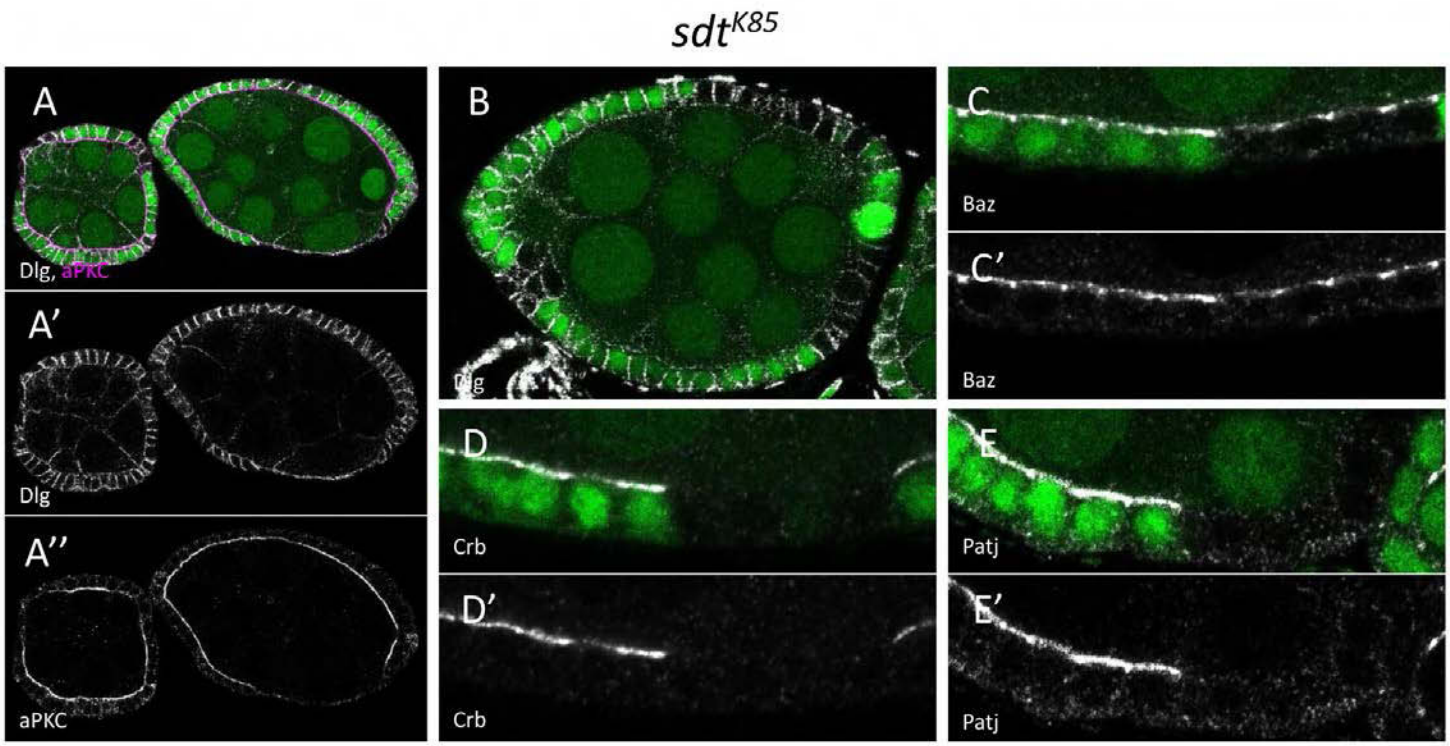


Fig. S1. Defects observed in *sdt* mutants in follicular cells. Follicular cell mutant clones for sdt^{K85} marked by the absence of GFP. (**A-A0**) Clones showing a cell stretching defect and decrease of aPKC from the apical domain. (**B**) One of the mutant clones shows a multilayer and Dlg spreading all around the cells. (**C**,**C9**) Decrease in Baz from the apical domain in *sdt* mutant cells. (**D**,**D9**) Complete loss of Crb from the apical domain in *sdt* mutant cells. (**E**,**E9**) Complete loss of Patj from the apical domain in *sdt* mutant cells.

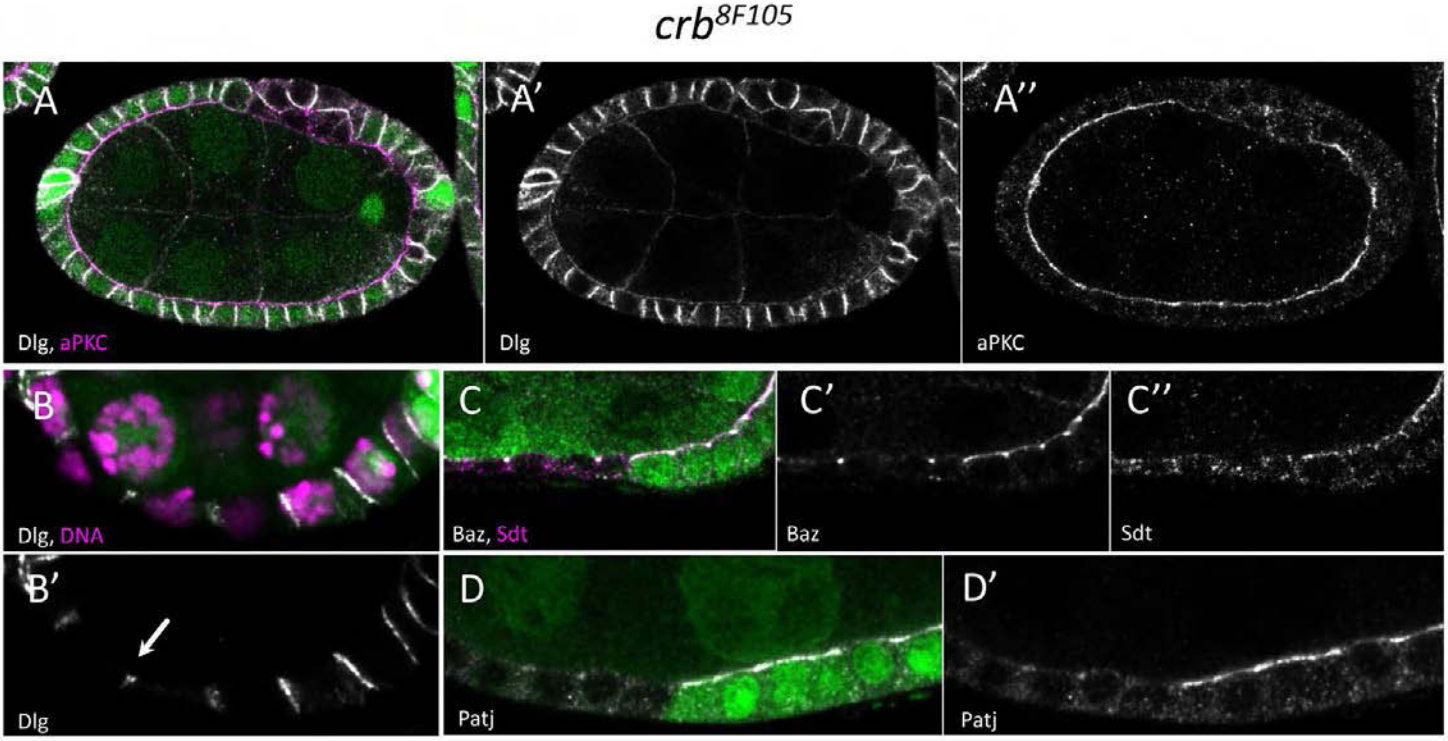
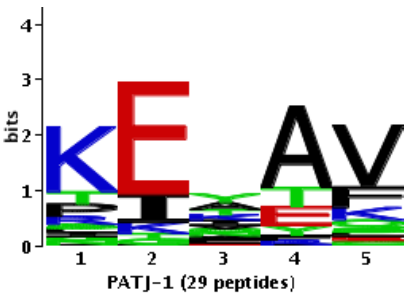


Fig. S2. Defects observed in *crb* mutants in follicular cells. Follicular cell mutant clones for *crb*^{8F105} marked by the absence of GFP. (**A-A**0) Mutant clone showing multilayers of cells, mislocalisation of aPKC and spreading of Dlg. (**B**,**B**9) Mutant clones with flat cells that can be seen by the reduced size of the lateral domain stained for Dlg (arrow on B9). (**C-C**0) Loss of apical Baz (white on C, and C9) and Sdt (pink on C, and white on C0) in *crb* mutant cells. (**D**,**D**9) Complete loss of Patj from the apical domain in *crb* mutant cells.

A

Nombre Total de clones testés	153
Clones ne codant pas des protéines en phase de lecture	37
Clones codant des protéines extracellulaires	44
Protéines intracellulaires dont un seul clone a été isolé	50
Protéines intracellulaires dont plus d'un clone ont été isolés	5
Protéines présentes dans le crible et la prédiction croisée humain/droso	1

B



C

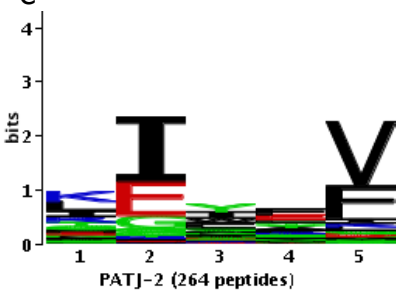


Figure 38 : Recherche de partenaire(s) pour le PDZ1.

La **table A** résume les résultats d'un crible d'interaction en double hybride en levures, réalisé pour identifier les partenaires du PDZ1 de Patj. La liste des protéines intracellulaires isolées dans le crible a été comparée avec une prédiction bio-informatique de partenaires potentiels, et possiblement conservés entre le PDZ1 de la drosophile (**B, PATJ-1**) et son équivalent humain (**C, PATJ-2**). Les diagrammes **B** et **C**, présentent les cinq acides aminés d'un motif PDZ putatif reconnu pour ces deux domaines PDZ. Plus la lettre représentant l'acide aminé est grande plus il a de probabilité d'être présent dans le motif PDZ favori du domaine PDZ étudié. En comparant les deux prédictions on constate que les motifs prédits sont similaires et contiennent préférentiellement un K en position 1 du motif, un I ou un E en position 2, et un V ou un F en position 5.

II. Comment Patj régule Crb à l'échelle moléculaire ?

Comme Crb est un déterminant clé du domaine apical et qu'il participe à la morphogénèse et à la croissance/prolifération, sa régulation est cruciale pour le développement des épithéliums. J'ai donc cherché à comprendre comment Patj participe à la fonction du complexe Crb. Patj régule positivement Crb via ses domaines L27 et PDZ1 (**Papier, Fig.3**). Le domaine L27 interagit avec Sdt, mais aucun partenaire n'est connu pour le domaine PDZ1 chez la drosophile. La première étape pour comprendre le mécanisme moléculaire de la régulation de Crb est d'identifier le ou les partenaire(s) du PDZ1.

II.1. Recherche de(s) partenaire(s) du PDZ1 de Patj

Afin de trouver un ou des partenaire(s) pour le PDZ1, j'ai réalisé un crible d'interactions protéiques en double hybride en levure. Ce crible a été fait avec une banque d'ADNc d'embryons de drosophile. L'ADNc des clones positifs pour une éventuelle interaction a été analysé par séquençage. 150 clones ont été testés. Parmi eux, 37 correspondent à des séquences non-codantes, des UTRs (UnTranslated Region) ou à des protéines qui ne sont pas dans le bon cadre de lecture (**Fig.38A**). Le reste des clones codent bien pour des protéines dans le bon cadre de lecture, dont 42 protéines extracellulaires et 55 protéines intracellulaires (**Fig.38A**). Patj étant intracellulaire, les protéines extracellulaires n'ont pas été considérées. Pour 5 des protéines intracellulaires, plusieurs clones différents ont été isolés (**Fig.38A**). Cependant aucun candidat évident ne ressort du crible. Afin de

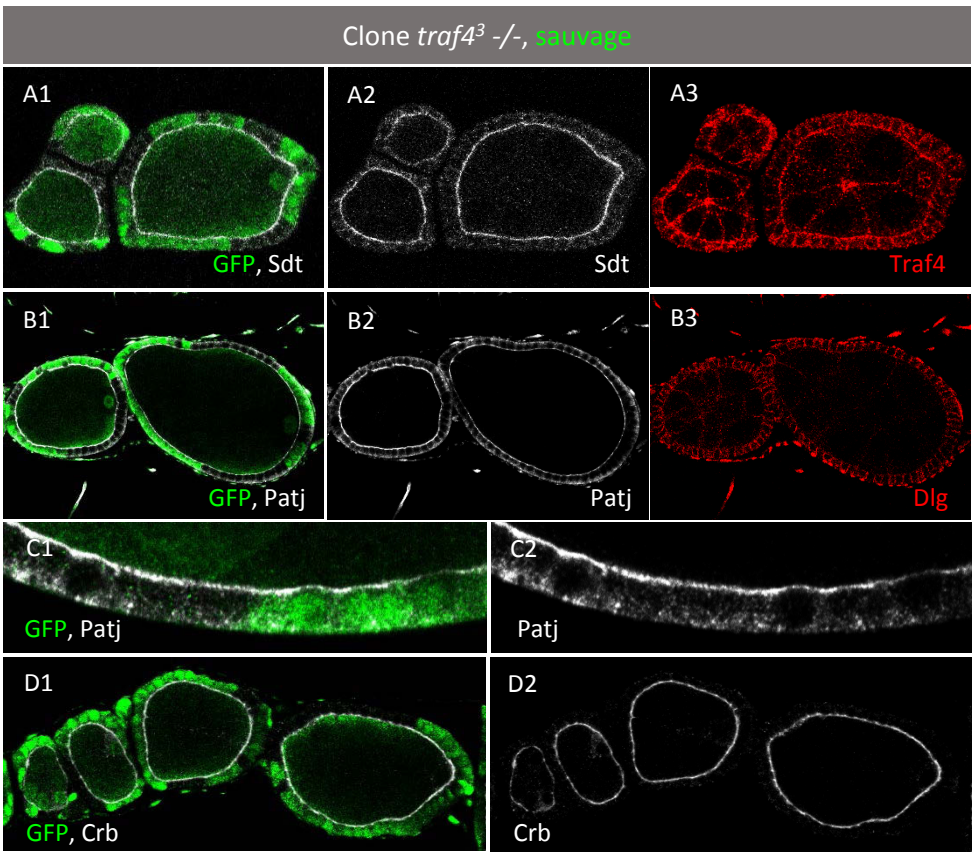


Figure 39 : Analyse des clones mutants *traf4* dans les FC.

Des clones mutants pour *traf4* ont été induits. Les cellules exprimant la GFP sont homozygotes sauvages ou hétérozygotes pour la mutation, et les cellules n'exprimant pas la GFP sont homozygotes mutantes pour *traf4*. Les follicules ont été immuno-marqués contre Sdt (**A1,A2**), Traf4 (**A3**), Patj (**B1,B2, puis zoom C1,C2**), Dlg (**B3**) et Crb (**D1,D2**). Les cellules mutantes ne présentent pas de différence de niveau ou de localisation pour aucune de ces protéines, comparées aux cellules sauvages adjacentes. La mutation de *traf4* n'affecte pas la polarité apico-basale des FC. L'absence de disparition du marquage Traf4 dans les clones mutants indique que l'anticorps n'est pas spécifique.

sélectionner un des candidats, nous avons croisé les données obtenues dans le crible avec une prédiction bio-informatique de potentiels partenaires du PDZ1.

La prédiction a été réalisée par l'équipe de Gary D. Bader, qui a développé un outil bio-informatique permettant de prédire les motifs PDZ putatif pour un PDZ donné et de lister les protéines qui pourraient donc interagir avec ce domaine PDZ (Hui and Bader, 2010). Nous leur avons soumis la séquence du PDZ1 de *d*Patj, et la séquence du PDZ2 de *h*Patj qui correspond au PDZ1 de la drosophile. Pour les deux PDZ, le motif prédit contient préférentiellement un K en position 1 du motif, un I ou un E en position 2, et un V ou un F en position 5 (**Fig.38.B,C**). La liste des protéines retrouvées à la fois avec le *d*PDZ1 et le *h*PDZ2 a été comparée aux résultats du crible en double hybride. Une seule protéine est présente dans le crible et dans la prédiction (croisée drosophile/humain) : Traf4 (TNF-receptor-associated factor 4). Même si Traf4 n'a été isolée qu'avec un seul clone dans le crible, c'est elle qui présente le meilleur score dans la prédiction, avec le motif PDZ putatif « KEVAV ».

Chez la drosophile, Traf4 participe à la constriction apicale lors de l'invagination ventrale du blastoderme, de façon indépendante de sa fonction dans la voie TNF et JNK (Mathew et al., 2011). Traf4 colocalise avec Sdt dans ces cellules et participe à la localisation d'Arm. J'ai induit des clones mutants pour un allèle délété de tous les domaines protéiques fonctionnels de Traf4 (**Fig.39**), (*traf4*^{3}, (Mathew et al., 2009)). Le perte de Traf4 n'a pas d'effet sur la localisation de Crb, Sdt, Patj et Dlg, et n'altère pas la forme des FC (**Fig.39**). Le marquage de Traf4 est cortical, apical et latéral, mais n'est pas altéré par la mutation *traf4*^{3} (**Fig.39A3**), alors que dans le blastoderme il est fortement réduit en contexte mutant (Mathew et al., 2011). L'anticorps ne semble donc pas être spécifique. De plus, un nouveau test en double

hybride, puis en précipitation *in vitro* montre que Traf4 ne se fixe pas au PDZ1 mais semble interagir avec le PDZ2 de Patj (non montré).

En parallèle du crible, j'ai recherché des candidats dans la littérature. Chez les mammifères, le PDZ2 de PATJ interagit avec TSC2 (Massey-Harroche et al., 2007). Chez la drosophile, Patj et TSC2 ne co-immunoprécipitent pas (extrait d'ovaires) et n'interagissent pas en double hybride (non montré). PATJ interagit aussi avec AMOT via ses PDZ2 et PDZ3 (Sugihara-Mizuno et al., 2007; Wells et al., 2006). AMOT n'a pas d'homologue chez la drosophile. Les trois paralogues d'AMOT interagissent à la fois avec MUPP1 et PATJ via leurs motifs PDZ : EYLI, EVLI, et EILI. Sur les quatre acides aminés de ces motifs trois sont présents dans les trois motifs. Nous avons donc cherché dans le protéome de la drosophile si une protéine possède le motif E-x-L-I-stop (x pour n'importent quel acide aminé). De manière frappante, il n'existe qu'une seule occurrence pour ce motif parmi toutes les protéines de la drosophile et elle correspond à Crb avec son motif ERLI. Patj pourrait donc interagir directement avec Crb. De façon intéressante le PDZ1 seul est capable de se localiser au cortex apical. De plus, une interaction directe Crb-Patj avait déjà été montrée dans le papier décrivant les premiers mutants *Patj*, mais n'avait pas été prise en considération en raison des erreurs que contenait cette étude (Bhat et al., 1999).

II.2. Hypothèse de travail

Patj interagit déjà avec Crb indirectement via Stardust. Quel serait donc le rôle d'une interaction directe entre Patj et Crb ?

Patj est dispensable dans l'épiderme pour la localisation de Crb, alors qu'elle est requise dans le FE. Dans les FC, la localisation apicale de Crb est dépendante de son domaine

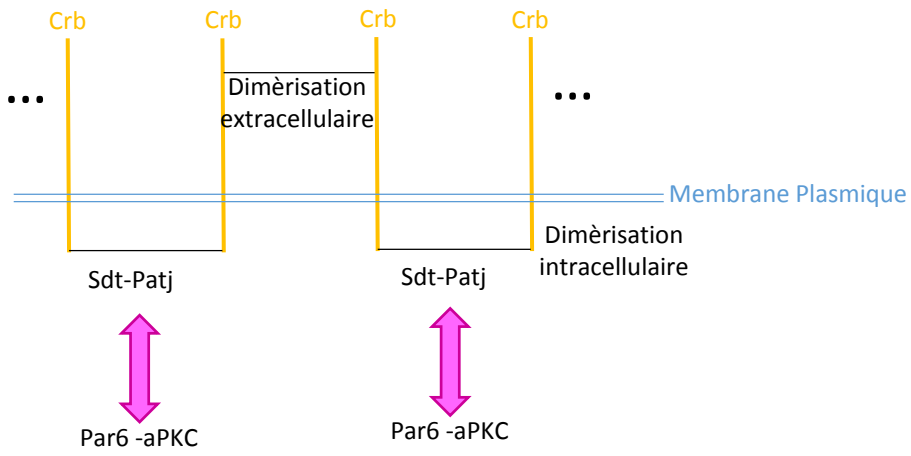


Figure 40 : Hypothèse de travail : Patj permettrait l'oligomérisation de Crb.
Une molécule de Crb interagit avec Sdt, Sdt avec Patj, Patj interagirait avec Crb, Crb avec Crb en extracellulaire, puis Crb avec Sdt en intracellulaire, Sdt avec Patj et ainsi de suite… Ainsi Patj pourrait participer au rétrocontrôle Crb-Crb et favoriser sa stabilisation et/ou son activité pour définir de façon robuste le domaine apical.

extracellulaire qui est proposé comme permettant sa dimèrisation (Fletcher et al., 2012). Patj pourrait donc participer aussi à ce rétrocontrôle positif de Crb, via son interaction directe avec Crb. Une molécule de Crb interagit avec le PDZ de Sdt, Sdt avec Patj via leur domaine L27 et Patj interagirait avec une nouvelle molécule Crb par l'intermédiaire du domaine PDZ (**Fig.40**). Cette dimèrisation de Crb intracellulaire associée à sa dimèrisation extracellulaire permettraient la formation d'oligomères de Crb à la membrane apicale. L'oligomèrisation pourrait soit favoriser le maintien de Crb à la membrane en inhibant son endocytose ou en favorisant son recyclage, soit réguler l'activité du complexe Crb dans la définition du domaine apical notamment via le recrutement d'autres protéines.

Les expériences que j'ai réalisées ensuite dans ce manuscrit ont pour but d'avancer dans la compréhension de la mécanistique par laquelle Patj régule Crb et de vérifier ce modèle d'oligomèrisation. Pour cela plusieurs points devaient être étudiés :

1) En 2012, deux autres études sur Patj ont été publiées (Sen et al., 2012; Zhou and Hong, 2012). L'une d'entre elle confirme nos résultats (Zhou and Hong, 2012). Patj est dispensable en embryon et en larve, même si une sub-létalité est observée à ces stades de développement. Les mutants trans-hétérozygotes pour $Patj^{\Delta}$ et une délétion du locus (recouvrant de l'α-spec à CG42676) meurent en pupe et présentent des malformations de la tête, des yeux, des ailes et des pattes. Dans l'épiderme, la mutation *Patj* n'affecte ni la localisation de Crb ni la polarité épithéliale, alors qu'elle induit une diminution de Crb apicale dans les FC. De plus, Crb est aussi diminuée dans les clones $Patj^{\Delta}$ des disques imaginaux et des photorécepteurs.

La seconde étude propose une fonction de Patj dans la régulation de la myosine II via l'inhibition de la phosphatase MBS (Sen et al., 2012). Cette fonction serait responsable de la

sub-létalité embryonnaire et du défaut de morphogénèse des disques imaginaux. Plusieurs expériences conduisent les auteurs à cette conclusion : la perte d'une copie d'une des chaînes de la myosine aggrave le défaut *Patj* dans l'épiderme, la perte d'une copie de *mbs* diminue la létalité embryonnaire et le défaut de morphogénèse des disques, la surexpression de *Patj* augmente le recrutement cortical de Sqh-GFP et enfin Patj interagit directement avec MBS et Sqh en précipitation *in vitro*. Comme Patj interagit avec MBS et la Myosine II, les auteurs proposent un rôle direct de Patj dans la régulation de la myosine, mais n'ont pas testé si cette régulation est dépendante de Crb, notamment dans les disques d'ailes où la mutation de *Patj* affecte Crb. J'ai donc étudié l'effet de Patj sur la Myosine II dans les FC et testé si cet effet était dépendant de Crb ou de MBS. La Myosine II est requise pour le maintien de la forme de FC (Wang and Riechmann, 2007). J'ai donc utilisé le phénotype d'aplatissement des cellules mutantes pour *Patj* comme modèle pour analyser la régulation de la Myosine II.

2) Dans les cellules mammifères en culture la diminution de *Patj* provoque une délocalisation de Crb dans des endosomes (Michel et al., 2005). La perte de Crb dans les FC mutantes pour *Patj* pourrait être due à une perturbation de son trafic. J'ai tenté de savoir si Patj régule l'endocytose et/ou le recyclage de Crb.

3) Ensuite, j'ai testé si l'interaction directe entre Crb et Patj existe, si elle est dépendante du motif ERLI et quel(s) domaine(s) de Patj elle implique. Pour cela j'ai réalisé des précipitations *in vitro*.

4) Dans le but d'identifier si les domaines de Patj capables d'interagir avec Crb sont aussi requis pour la viabilité, j'ai poursuivi l'analyse structure-fonction. Au sein de cette

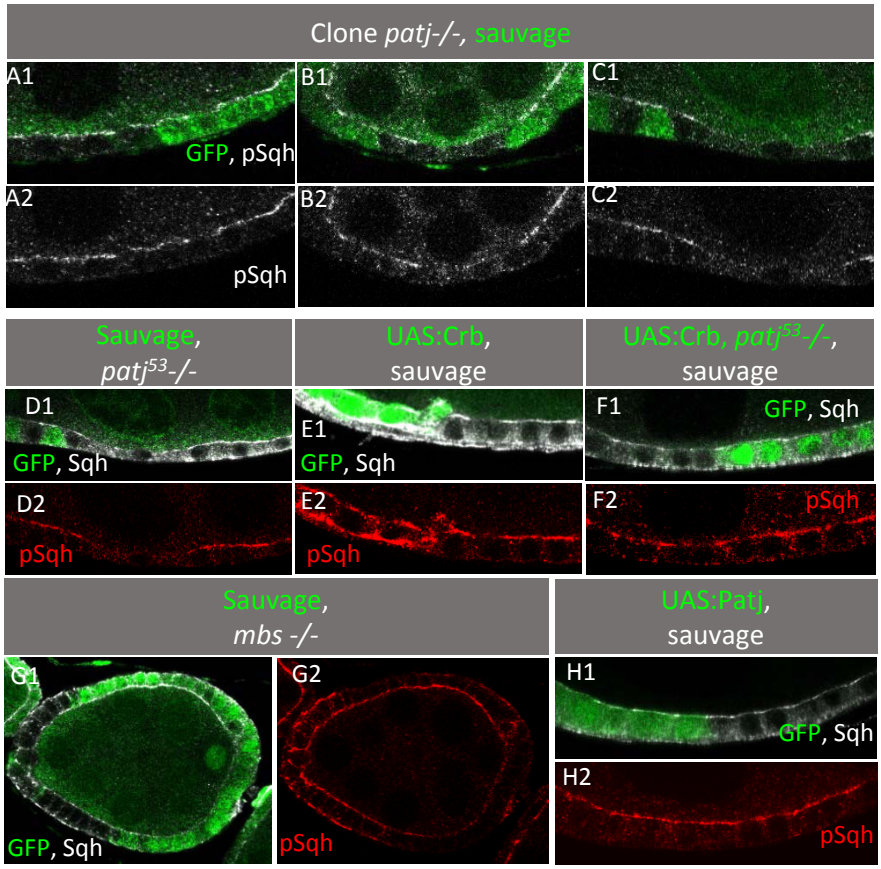


Figure 41 : Etude de la relation entre Patj, Crb, MBS et la Myosine II.

Follicules contenant des clones mutants pour *Patj* (**A,B,C,D, cellules négatives pour la GFP**), pour *mbs* (**G**), surexprimant *crb* dans un contexte sauvage (**E, cellules positives pour la GFP**) ou dans un contexte mutant pour *Patj* (**F, cellules positives pour la GFP**), ou surexprimant *Patj* (**H, cellules positives pour la GFP**). Les follicules ont été immuno-marqués contre Sqh ou sa forme phosphorylée pSqh. La mutation de *Patj* n'induit pas de défaut dans le niveau de phosphorylation de Sqh lorsque que les cellules ne s'aplatissent pas (**A**), alors que pSqh est diminuée dans les cellules qui commencent à s'aplatir (**B**). La sévérité de la perte de pSqh augmente avec la sévérité de l'aplatissement (**C,D**). La surexpression de *crb* induit une augmentation forte du recrutement (apical et ectopique en basal) et de la phosphorylation de Sqh (**E**). La surexpression de *crb* et la mutation de *Patj* se suppriment l'une l'autre, restaurant le niveau sauvage de Sqh et pSqh (**F**). La mutation de *mbs* provoque le recrutement et la phosphorylation ectopique de Sqh au cortex basal alors qu'elle n'a pas d'effet évident sur le domaine apical (**G**). La surexpression de *Patj* n'a pas d'effet sur le niveau ou la localisation de Sqh et pSqh (**H**).

analyse j'ai inclus des transgènes permettant de démontrer génétiquement le modèle d'oligomérisation.

5) Ensuite je me suis interrogée sur une éventuelle redondance entre Patj et d'autre(s) protéine(s). Une candidate particulièrement intéressante pour une possible redondance est Lin-7. J'ai donc généré des doubles mutants *Patj, lin-7* et analysé leur phénotype.

II.2.1. Patj régule les jonctions d'adhérence et la Myosine II de façon dépendante de Crb

Les FC sont soumises à une forte tension issue de la croissance de la lignée germinale (Wang and Riechmann, 2007). Pour résister à cette tension elles doivent maintenir une adhésion et une activité de la myosine II (Tanentzapf et al., 2000; Wang and Riechmann, 2007). Ainsi, l'induction de clones mutants pour *sqh* provoque un aplatissement des FC (Wang and Riechmann, 2007). De la même façon, la mutation de *Patj* peut entraîner un aplatissement (**Article Fig.2,F,G**). J'ai donc analysé l'effet de la mutation de *Patj* sur la myosine II. Le niveau apical de phosphorylation de Sqh (pSqh) est diminué dans les cellules qui commencent à s'aplatir et dans les cellules très aplaties (**Fig.41B,C**). La mutation *Patj* affecte donc négativement la myosine II. A l'inverse, la surexpression de *crb* induit un recrutement cortical important de Sqh en apical, mais aussi ectopiquement en basal. Le niveau de phosphorylation de Sqh y est augmentée fortement (**Fig.41E**). Ce défaut est sauvé par la mutation *Patj* (**Fig.41F**). De plus, la surexpression de *crb* sauve la perte de Sqh apical des cellules *Patj-/-,* conduisant à un niveau normal de pSqh (**Fig.41F**). L'effet de Patj sur la Myosine II est donc probablement dépendant de Crb. Mais ceci n'exclut pas que Patj puisse réguler la myosine aussi via MBS. J'ai donc analysé le phénotype de cellules mutantes pour

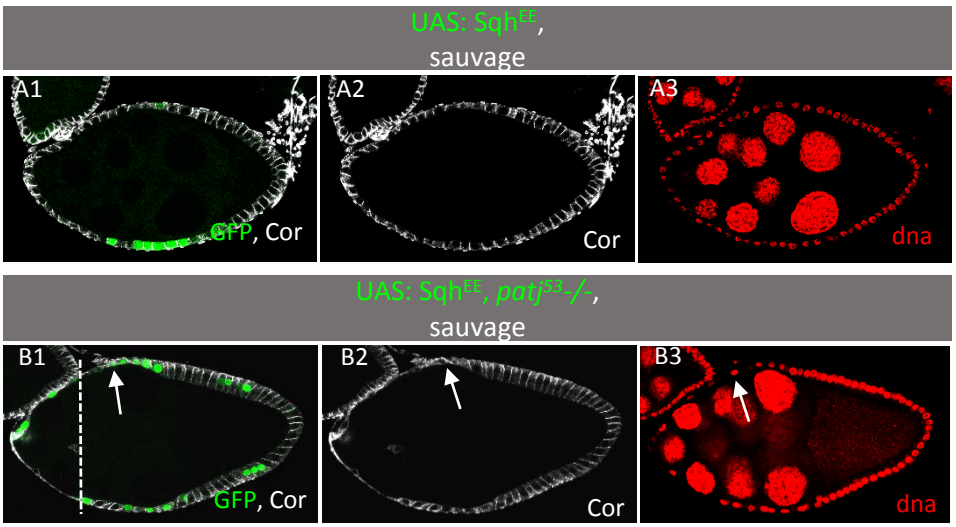


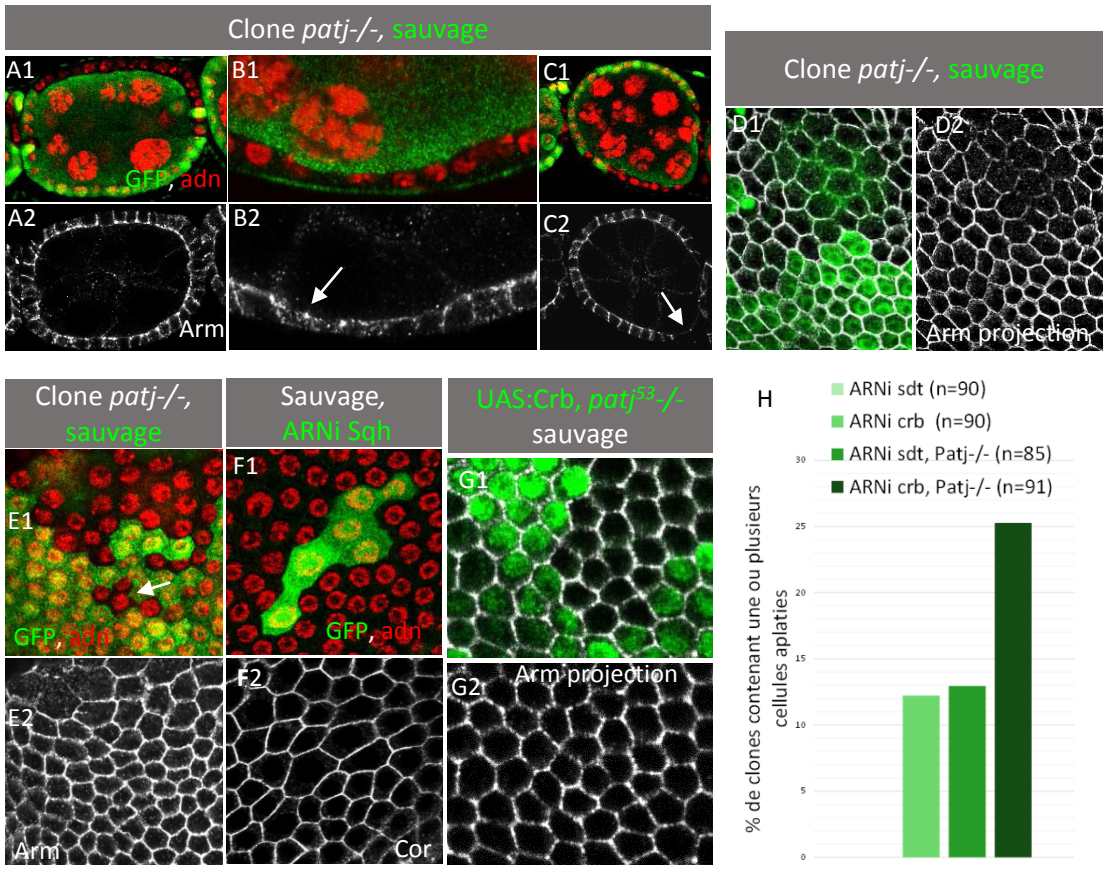
Figure 42 : La surexpression de la forme active de Sqh n'est pas suffisante pour bloquer l'aplatissement des FC mutantes pour *Patj*.

Follicules contenant des clones surexprimant une forme phosphomimétique de Sqh (**Sqh^{EE}**) en contexte sauvage ou en contexte mutant pour Patj et marqués contre Cor (**1,2**) ou l'ADN (**3**). La surexpression de Sqh^{EE} ne provoque pas de constriction des FC (**A**). Certaines cellules surexprimant Sqh^{EE} et mutantes pour *Patj* s'aplatissent (**B, flèche**). Au stade 9 ces cellules s'aplatissent alors qu'elles ne le devraient pas encore : le front d'aplatissement des cellules squameuses est indiqué par la position des cellules de bordures (**B, ligne blanche en pointillés**). La surexpression de Sqh constitutivement active n'est donc pas suffisante pour empêcher le défaut d'aplatissement *Patj*.

mbs. La mutation *mbs* induit une augmentation importante du niveau de phosphorylation de la myosine corrélée avec un recrutement excessif au domaine basal, mais semble avoir un effet mineur et peu pénétrant au niveau du domaine apical (**Fig.41G**). J'ai généré des doubles mutants *Patj,mbs*. Si Patj est en amont de MBS alors la double mutation devrait être similaire à celle de MBS seule. Cette double mutation n'a pas encore été analysée. Si Patj inhibe MBS qui inhibe Sqh, la surexpression de Patj devrait conduire à l'augmentation du niveau de pSqh, ce qui n'est pas le cas (**Fig.41H**).

De plus, j'ai testé si l'aplatissement est causé par la perte de l'activité de la Myosine II. J'ai surexprimé une forme phosphomimétique de Sqh (Sqh^{EE}) dans les cellules *Patj-/-*. Cette expérience nécessite d'être plus amplement analysée, mais j'ai pu observer des cellules qui s'aplatissent dans les clones (**Fig.42,B**). La figure 45B montre un follicule de stade 9 qui contient des cellules squameuses qui s'aplatissent. Si l'on regarde le front d'aplatissement on peut voir des cellules qui surexpriment Sqh^{EE} et mutantes pour Patj qui s'aplatissent alors qu'elles ne le devraient pas encore. La surexpression de la myosine activée n'empêche pas l'aplatissement ni des cellules mutantes pour *Patj*, ni des cellules squameuses, alors qu'elle est bien surexprimée et recrutée au cortex (non montré). L'observation d'un plus grand nombre de clones est nécessaire pour déterminer si elle diminue la pénétrance du phénotype, néanmoins ce résultat suggère que l'altération de l'activité de la myosine II n'est pas la cause du défaut d'aplatissement des cellules *Patj-/-*.

Alternativement, l'aplatissement pourrait être aussi dû à une altération des jonctions. En effet, la mutation *arm* induit aussi l'aplatissement des FC. Dans les clones *Patj-/-*, Arm est diminuée du domaine latéral dans les cellules qui s'aplatissent (**Fig.43B,C**). Toutefois, même dans les cellules très aplaties un spot subapical d'Arm (qui colocalise avec



<u>Figure 43 : L'aplatissement des cellules *Patj* corrèle avec une altération de la ZA, et il est dépendant de la définition du domaine apical.</u>

Dans les cellules mutantes pour *Patj* qui s'aplatissent, Arm est réduit du cortex apical et latéral (**B,C**). Cependant des spots d'AJs sont conservés en subapical même dans les cellules très aplaties (**B,C flèche**). (**D**) Projections planaires de l'épithélium présentant des cellules *Patj-/-* sans GFP (**D1**). Si les cellules sont aplaties le signal GFP provenant de la lignée germinale est détectable. Les cellules sauvages montrent une GFP nucléaire. On observe une irrégularité de la ZA dans les cellules mutantes qui s'aplatissent (**D2**). Si les cellules mutantes sont entourées de cellules sauvages elles ne s'aplatissent pas (**E, flèche**). L'aplatissement Patj peut donc être sauvé de façon non-cellulaire autonome par la présence de cellules sauvages. Ce n'est pas le cas de cellules exprimant l'ARNi contre Sqh (**cellules GFP positives**), qui s'aplatissent même quand elles sont entourées de cellules sauvages (**F**). Les défauts morphogénétiques liés à l'altération de Patj ou de Sqh ne sont donc pas identiques. La surexpression de Crb sauve le défaut de ZA de la mutation *Patj* et le défaut d'aplatissement (**G**). De plus le pourcentage de cellules aplaties au sein des clones augmente lorsque les ARNi de Sdt et de Crb sont combinés à la mutation *Patj*, en comparaison avec les ARNi seuls. Le défaut d'aplatissement est donc lié à la définition du domaine apical (**H**).

Baz, non montré) est encore présent (**Fig.43C**). En projection de plusieurs coupes confocales imagées dans le plan de l'épithélium, le marquage Arm apparaît plus ponctué que dans les cellules sauvages, et l'anneau d'adhésion présente même des trous lorsque que l'aplatissement est sévère (**Fig.43D,E**). La mutation de *Patj* affecte donc l'intégrité de la ZA de façon corrélée avec la sévérité de l'aplatissement. Comme la ZA et la myosine II sont interdépendantes, il est difficile de savoir si l'aplatissement est dû à la myosine, aux AJ ou aux deux. Au sein des clones *Patj-/-* seul un petit nombre de cellules sont aplaties (**Fig.43B,C,D,E**). Elles sont toujours en contact avec d'autres cellules mutantes, et je n'ai jamais observé de cellules aplaties dans les petits clones entourés de cellules sauvages (**Fig.43E**). L'aplatissement n'est donc pas totalement cellulaire autonome. Si les cellules Patj-/- ont une ZA perturbée et sont probablement moins adhérentes. Les cellules sauvages via des interactions *trans* avec les cellules mutantes, favoriserait la stabilisation des jonctions dans la cellule mutante, ce qui serait suffisant pour maintenir localement sa forme. Le sauvetage non cellulaire autonome serait alors cohérent avec un rôle des jonctions dans le défaut d'aplatissement. A l'inverse, les cellules qui expriment un ARNi contre *sqh* s'aplatissent de façon cellulaire autonome (**Fig.43F**). Le défaut d'aplatissement *Patj-/-* serait donc une conséquence de la perte d'intégrité de la ZA plutôt que de la diminution de pSqh.

La perte d'intégrité de la ZA pourrait être dûe à la fragilisation du domaine apical dans les cellules *Patj-/-*. Des cellules anormalement aplaties sont aussi observées dans des clones *sdt* ou *crb* (**Papier Fig.2,I**). De plus, dans les clones *Patj-/-* ce défaut est corrélé avec la sévérité de la diminution de Crb (non montré). J'ai réalisé un test d'interaction génétique entre l'ARNi de *crb* ou *sdt* et la mutation de Patj qui montre une augmentation de la pénétrance du défaut d'aplatissement comparé aux ARNi seuls (**Fig.43H**). De plus, le défaut

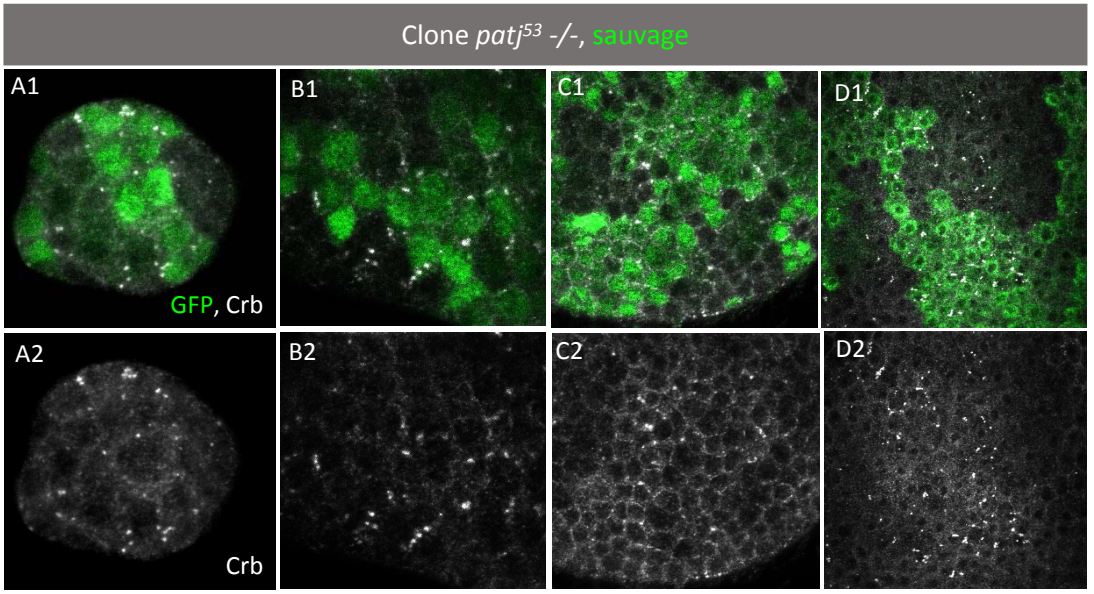


Figure 44 : Localisation de Crb dans les cellules mutantes pour *Patj*.
Ces images présentent des projections de plusieurs coupes confocales imagées dans le plan de l'épithélium sur toute la hauteur des cellules. Les follicules contiennent des clones mutants pour *Patj* marqués par l'absence de la GFP, et sont immuno-marqués contre Crb (**blanc**). Aucune différence majeure du nombre de spots intracellulaires de Crb n'est observée entre les cellules mutantes et sauvages.

d'aplatissement *Patj-/-* et la perte d'intégrité de la ZA sont sauvés par la surexpression de Crb (**Fig.43G**). Ce défaut morphogénétique est donc dépendant de Crb.

En conclusion le défaut d'aplatissement semble être causé par une perte de l'intégrité de la ZA. Le défaut de myosine des cellules *Patj* pourrait être une conséquence de l'altération du domaine apical et de la ZA. De plus, l'effet de Patj sur les jonctions et la myosine est dépendant de Crb.

II.2.2. Patj régule t'elle le trafic de Crb ?

Dans les cellules *Patj-/-* le niveau de Crb apical est réduit mais aucune augmentation cytoplasmique flagrante n'est observée. J'ai donc réalisé des projections d'images prises sur toute la hauteur des FC dans le plan de l'épithélium. En comparant les spots de Crb entre les cellules sauvages et mutantes, aucune tendance claire ne se dégage (**Fig.44A,B,C,D**). Si Patj régule l'endocytose de Crb alors le blocage de l'endocytose devrait empêcher la perte de Crb dans les cellules mutantes. Pour cela j'ai surexprimé un dominant négatif de Shibire. Seule, l'altération de Shibire n'a qu'un effet modéré qui est insuffisant pour améliorer le défaut *Patj* (non montré). Cette expérience n'est donc pas concluante. J'ai ensuite incubé les ovaires contenant des clones mutants pour *Patj* avec de la leupeptine qui bloque l'activité des lysosomes. Le blocage de la dégradation ne restaure pas Crb en apical dans les cellules *Patj-/-* (**Fig.45B2**). Crb n'est pas non plus observée au niveau des lysosomes (**Fig.45A4,B4**). Le blocage des lysosomes est pourtant capable de sauver le défaut Crb associé à la perte du complexe Retromer (Pocha et al., 2011; Zhou et al., 2011). Ceci suggère que Patj ne régulerait pas le recyclage de Crb. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer si Patj régule le trafic de Crb.

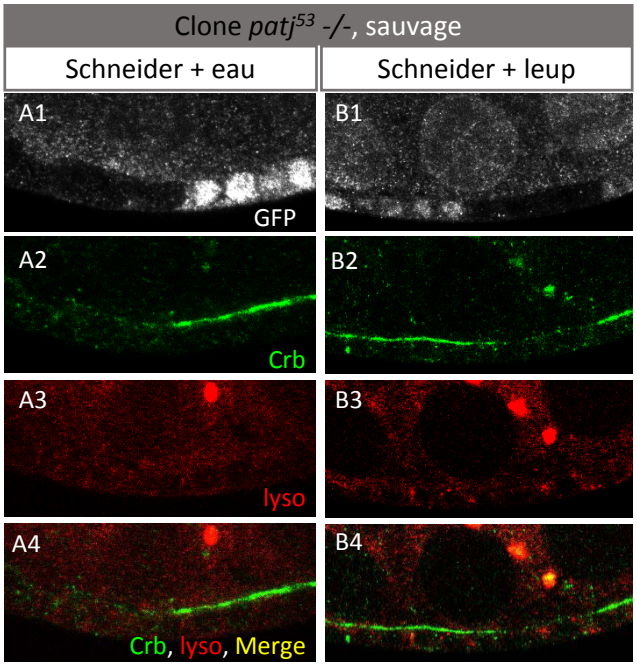


Figure 45 : Patj ne semble pas réguler le recyclage de Crb

Les follicules ont été incubés 3h dans du milieu schneider enrichi et additionné d'eau (contrôle négatif, **A**) ou de leupeptine (**B**). La leupeptine bloque les lysosomes, ces derniers sont plus gros et plus facilement détectables après traitement (**rouge, comparer A3 et B3**). La mutation *Patj* (**A1, B1 cellule non blanche**) induit une perte de Crb (**vert, A2,B2,A4,B4**) du domaine apical qui est similaire entre le contrôle et le test leupeptine (**A2,B2**). Crb ne co-localise pas plus avec les lysosomes dans les cellules *Patj-/-* que dans les cellules sauvages (**A4, co-localisation en jaune sur le merge**).

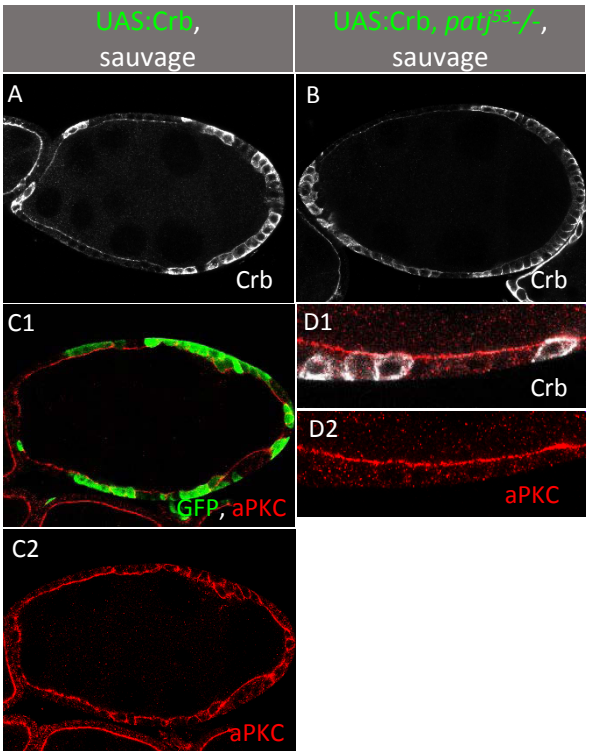


Figure 46 : La mutation *Patj* n'élimine pas le recrutement ectopique de Crb surexprimée.

Les follicules contenant des clones de surexpression Crb dans un contexte sauvage ou mutant pour *Patj* sont immuno-marqués contre Crb (**A,B,D1**) et aPKC (**C,D**). La surexpression de *crb* (**A,C**) est identifiable par l'augmentation de Crb au cortex et dans le cytoplasme des FC (**A**). Il se localise ectopiquement en latéral où il recrute aPKC (**A, C1, C2**). La mutation de *Patj* n'élimine pas la surexpression de Crb ni sa localisation ectopique (**B, D1**). Cependant elle supprime l'effet gain de fonction de Crb puisque les cellules ne perdent pas leur polarité (**B, D**) et aPKC n'est plus recrutée ectopiquement (**D**).

Cependant j'ai analysé le niveau et la localisation de Crb surexprimée en contexte sauvage ou mutant pour *Patj*. Comme attendu Crb surexprimé s'accumule au cortex apical et latéral (**Fig.46A**), ce qui conduit à la localisation ectopique d'aPKC (**Fig.46C**). Etonnamment la mutation de Patj qui supprime l'effet gain de fonction de Crb, n'affecte pas Crb, qui est toujours en excès, et surtout toujours présent au cortex latéral (**Fig.46B,D**). Cependant, dans ces cellules aPKC n'est plus ectopiquement localisé en latéral (**Fig.46D**). Patj influence donc l'activité de Crb, c'est-à-dire sa capacité à définir le domaine apical.

II.2.3. Interaction Directe Crb-Patj.

Pour tester une éventuelle interaction directe Crb-Patj j'ai réalisé des précipitations *in vitro*. Crb^{intra} et $Crbi^{intra\Delta ERLI}$ ont été fusionnées à la GST et produites en bactéries puis purifiées. Différentes constructions codant les différents domaines de Patj, ont été clonées dans un vecteur d'expression permettant la production de protéines radio-marquées au S^{35} *in vitro* en lysat de réticulocytes.

Les protéines Patj et Crb sont incubées une nuit à 21°c dans un tampon de liaison. Ensuite les lavages sont effectués avec le même tampon. Patj précipite avec GST-Crb^{intra} de façon plus importante qu'avec la GST seule et GST-$Crb^{intra\Delta ERLI}$ (**Fig.47A**). Patj interagit donc directement avec Crb, et cette interaction est dépendante du motif ERLI de Crb.

Cette interaction est très reproductible puisque je l'ai observée dans la majorité de nombreuses précipitations que j'ai réalisées par la suite. Cependant cette expérience ne semble pas optimale. En effet, la fraction de Patj qui interagit avec Crb est très faible, et le signal aspécifique détecté avec la GST seule est important. J'ai donc tenté d'améliorer les précipitations par plusieurs approches (non montré). Tout d'abord, j'ai fait varier la quantité

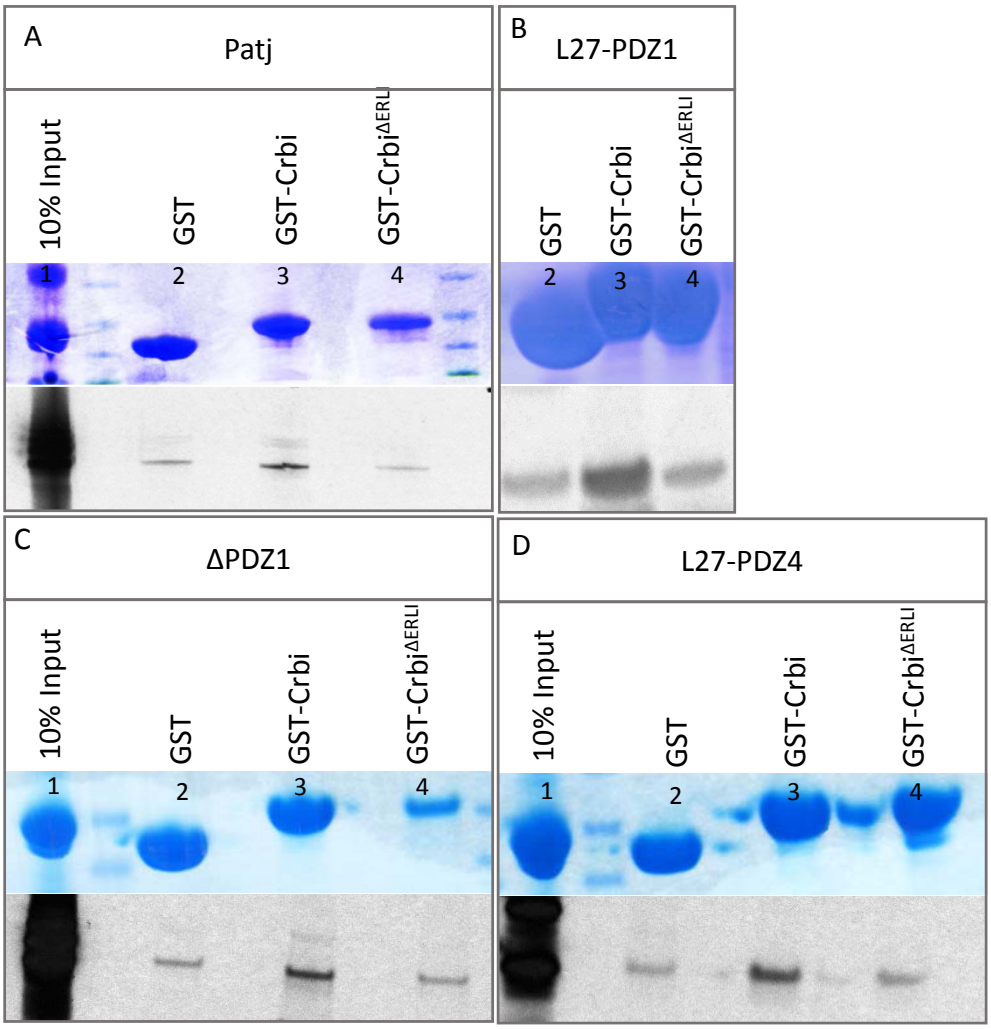


Figure 47 : Interaction directe du motif ERLI de Crb avec les PDZ1 et PDZ4 de Patj.
Précipitation *in vitro* GST entre GST (**A2,B2,C2,D2**) GST-Crbi (**A3,B3,C3,D3**), GST-CrbiΔERLI (**A4,B4,C4,D4**) et Patj (**A**), L27-PDZ1 (**B**), ΔPDZ1 (**C**) et L27-PDZ4 (**D**). Le gel du haut présente la coloration au bleu de Coomassie qui permet de détecter les protéines GST (**colonnes 2, 3, 4**), celui du bas, le film autoradiographique marqué par les protéines Patj radioactives. La colonne **1** présente 10% de la quantité totale de protéines radiomarquées utilisées pour la précipitation. Le signal Patj retrouvé avec GST-Crbi (**3**) est plus fort que celui observé avec la GST seule (**2**) ou GST-CrbiΔERLI (**4**) pour toutes les constructions protéiques montrées dans cette figure (**A,B,C,D**). Patj interagit donc directement avec Crb de façon dépendante du motif ERLI et via les domaines L27-PDZ1 et L27-PDZ4.

de protéines GST. Ensuite, j'ai testé si la fixation aspécifique n'était pas liée aux billes de sépharose utilisées pour précipiter Crb, en les changeant par des billes magnétiques. Ceci n'a pas permis de diminuer le signal aspécifique. J'ai aussi remplacé la GST par la MBP, ce qui a eu pour effet d'augmenter le signal aspécifique. Avec la GST, j'ai fait varier la composition du tampon de liaison mais aussi d'autres paramètres comme le nombre de rinçages, ou le volume dans lequel sont incubées les protéines. Pour la composition du tampon j'ai modifié :

- La base de la solution : PBS ou Tris, HCl
- Le pH de la solution : pH7, pH7.5, pH8
- Le détergent utilisé et sa concentration : Triton, CHAPS, Tween.
- La concentration de NaCl.
- La présence d'ions : Ca^{2+}, Mg^{2+}
- La présence de BSA et sa concentration

Aucunes des conditions testées ne m'a permis de modifier significativement le différentiel entre la GST et GST-Crb^{intra}.

Au cours de ces précipitations *in vitro* j'ai néanmoins testé différentes constructions de Patj afin d'identifier quel(s) domaines de Patj sont impliqués dans l'interaction avec Crb. Toutes les protéines qui montrent une interaction présentent un différentiel similaire à celui de Patj entière entre la GST, GST-Crb^{intra} et GST-$Crb^{intra\Delta ERLI}$.

Les premiers domaines auxquels je me suis intéressée sont le PDZ1 et le domaine L27. Seuls, les domaines L27 ou PDZ1 n'interagissent pas avec Crb, alors que la protéine L27-PDZ1 interagit de façon dépendante du motif ERLI (**Fig.47B**). Cette construction est suffisante pour sauver la létalité des mutants *Patj* et la localisation de Crb dans les FC, ce qui suggère que

cette interaction serait importante pour la fonction de Patj. J'ai ensuite testé une protéine Patj (ΔPDZ1) délétée du domaine PDZ1 pour déterminer si ce domaine est nécessaire pour l'interaction. La protéine ΔPDZ1 est toujours capable d'interagir avec Crb, indiquant qu'au moins un autre domaine de Patj est capable d'interagir avec Crb (**Fig.47C**). Le PDZ4 seul interagit avec Crb tout comme L27-PDZ4, alors que les domaines PDZ2 et PDZ3 ne montrent pas d'interaction (**Fig.47D**). D'autres constructions doivent être testées pour vérifier que les domaines PDZ2 et PDZ3 n'interagissent pas avec Crb même fusionnés au domaine L27 (L27-PDZ2, L27-PDZ3). La construction ΔPDZ1-4 devrait permettre de confirmer que se sont bien les PDZ1 et PDZ4 qui sont responsables de la fixation à Crb.

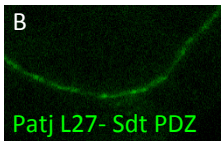
Pour conclure, Patj interagit avec Crb via ses domaines PDZ1 et PDZ4 dans les conditions actuelles des précipitations. Ces données devront être vérifiées lorsque des conditions optimales auront été mises au point.

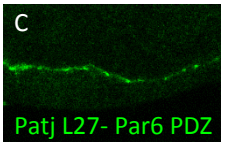
II.2.4. Test de sauvetage de la mutation *Patj*

Tout d'abord j'ai cherché à montrer si l'interaction Patj-Crb est fonctionnelle *in vivo,* en réalisant des tests de sauvetage de Patj j'ai aussi inclus des constructions chimériques. J'ai ensuite complété l'analyse structure-fonction publiée avec de nouveaux transgènes afin de vérifier si les domaines de Patj capables d'interagir avec Crb sont aussi capables de sauver la létalité des mutants Patj. Chaque construction est sous le contrôle d'un promoteur ubiquitine et la protéine d'intérêt est fusionnée à la GFP en C-terminal. Les premiers tests ont été réalisés en utilisant des lignées transgéniques produites par insertion d'élément P aléatoire (**Fig.49A**). Les tests de sauvetages de la mutation Patj ont montré une variabilité en fonction du site d'insertion notamment pour le transgène Patj total dont un site d'insertion n'était pas capable de sauver les mutants. Pour chaque transgène j'ai donc

A

	Transgène	Sauvetage
Patj L27-Sdt PDZ		> 100% n=119
Patj L27-PAR-6 PDZ		5% n=124*





<u>Figure 48 : Le PDZ1 de Patj peut être remplacé par le PDZ de Sdt ou de PAR-6</u>
Les transgènes codant le domaine L27 de Patj (qui interagit avec Sdt) fusionné au domaine PDZ de Sdt ou au domaine PDZ de Par-6 (qui interagissent directement avec Crb) sont tous deux capables de sauver la létalité des mutants homozygotes *Patj* (**A**). Ces deux protéines sont fusionnées à la GFP et détectables au cortex apical des FC (**B,C**).
(*) Test de sauvetage réalisé qu'avec une seule insertion du transgène.

effectué les sauvetages avec au moins deux insertions différentes. Cependant dans le cas où aucune des insertions testées ne sauvent il est difficile de savoir si c'est un véritable résultat négatif. Pour les constructions les plus cruciales qui ne sauvent pas la létalité des mutants (ainsi que pour Patj comme contrôle positif) et pour les nouvelles constructions que j'ai voulues testées, de nouvelles lignées transgéniques ont été générées par insertion site-spécique (**Fig.50**). Avec cette méthode tous les transgènes sont insérés en une position identique et connue.

Démonstration génétique du modèle d'oligomérisation

Si pour être fonctionnelle Patj doit lier d'une part Sdt avec son domaine L27 et d'autre part Crb via un domaine PDZ, alors une protéine synthétique capable de réaliser ces deux interactions devrait être capable de remplacer Patj et donc de sauver la létalité des mutants. Pour cela, j'ai généré des mouches transgéniques exprimant des protéines de fusion entre le domaine L27 de Patj (interaction avec Sdt) avec le domaine PDZ de Sdt ou le domaine PDZ de PAR-6 (interaction avec Crb), mais aussi une fusion entre le domaine L27 de Lin-7 et le domaine PDZ de Sdt (Patj L27- Sdt PDZ, Patj L27 – PAR-6 PDZ, Lin7 L27 – Sdt PDZ). Les transgènes obtenus pour ces construction sont homozygotes viables. Patj L27-Sdt PDZ et Patj L27 – PAR-6 PDZ sont exprimées et se localisent comme attendu en apical des FC (**Fig.48B,C**). Ces protéines ne semblent donc pas avoir d'effet dominant négatif, si elles sont exprimées ubiquitairement. Patj L27-Sdt PDZ sauve complètement la létalité des mutants *Patj* (**Fig.48A**). Patj L27–PAR-6 PDZ est aussi capable de sauver la létalité mais ce sauvetage est faible (**Fig.48A**). Comme il n'a été testé qu'avec une insertion ce sauvetage faible n'est peut être pas représentatif de la véritable capacité Patj L27–PAR-6 PDZ à remplacer Patj. L'expérience sera reproduite pour ce transgène en site-spécifique. Néanmoins, ces

A

Transgène	Sauvetage
Patj	> 100% n=171
L27-PDZ1	91% n=186
L27	0% n=145
PDZ1	0% n=102
ΔPDZ1	> 100% n=78
L27-PDZ2	ND
L27-PDZ3	0% n=158
L27-PDZ4	> 100% n=171
PDZ2	0% n=118
PDZ3	0% n=119*
PDZ4	ND

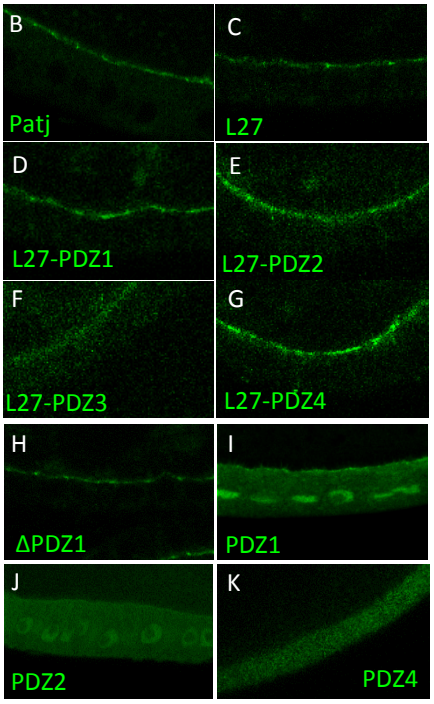


Figure 49 : Analyse structure-fonction de Patj.

Le tableau **A** présente les différents transgènes Patj produits et leur capacité à sauver la létalité des mutants *Patj* (**% de sauvetage et nombre de mouches comptées**). Les transgènes qui code Patj, L27-PDZ1, ΔPDZ1 et L27-PDZ4 sauvent la létalité des mutants alors que toutes les autres constructions testées n'y parviennent pas (**A**). La détection directe de la GFP fusionnée à chacune des protéines Patj permet d'analyser leur localisation dans les FC (**B-K**). Toutes les protéines qui possèdent le domaine L27 sont apicales (**B-H**). Le PDZ1 (**I**), et le PDZ2 (**J**) dans une plus faible proportion, sont capables de se localiser partiellement en apical, alors que le PDZ4 n'est que cytoplasmique (**K**), (Condition sauvage).

(*) Test de sauvetage réalisé qu'avec une seule insertion du transgène.

sauvetages positifs montrent que ces protéines chimériques sont capables de remplacer Patj. Etablir une interaction indirecte avec Sdt et Crb est ainsi suffisant pour la fonction de Patj. C'est un argument fort en faveur de l'interaction directe Crb-Patj, en faveur d'une dimèrisation intracellulaire de Crb et donc en faveur du modèle d'oligomérisation de Crb.

Redondance fonctionnelle entre les domaines PDZ de Patj

Les différentes constructions Patj fusionnées à la GFP ont permis d'analyser la participation de chacun des domaines de Patj dans son recrutement apical. Le PDZ1 seul et dans une plus petite proportion le PDZ2, sont capables de se localiser faiblement au cortex apical, alors que les PDZ4 et PDZ3 ne le sont pas (**Fig.49I,J,K**). Toutes les protéines qui possèdent le domaine L27 montrent une localisation apicale similaire à celle de Patj (**Fig.49B-H**). Le domaine L27 de Patj est donc nécessaire pour sa localisation efficace au cortex apical.

Comme *in vitro* la mutation du PDZ1 n'abolie pas l'interaction avec Crb, si le PDZ1 est nécéssaire *in vivo* pour la fonction de Patj. ΔPDZ1 sauve complétement la mutation Patj (**Fig.49A**). Il existe donc des redondances fonctionnelles entre les domaines de Patj. En effet, L27-PDZ4 est aussi capable de sauver les mutants, alors que le L27-PDZ3 ne l'est pas (**Fig.49A**). Les PDZ4 et le PDZ1 sont donc tous les deux suffisants lorsqu'ils sont fusionnés avec le domaine L27 pour la fonction de Patj. Afin de déterminer si ils sont nécessaires à la fonction de Patj un transgène délétant les deux domaines PDZ va être testé (**Fig.50**).

II.2.5. Redondance Patj-Lin-7

Lin-7 est composé d'un domaine L27 et d'un domaine PDZ, ce qui est similaire à la construction minimale qui est suffisante pour la fonction de Patj. De plus, Lin7 est un

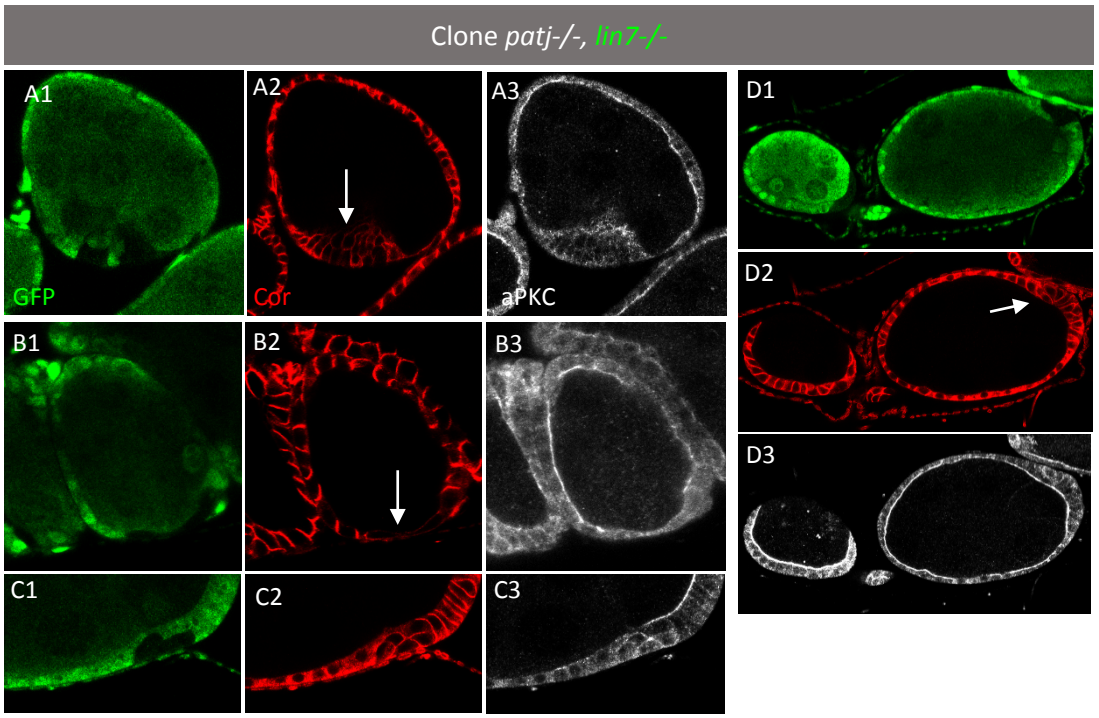
Patj	
L27	
L27-PDZ2	
L27-PDZ3	
ΔL27	
ΔPDZ1+4	
Patj L27- PAR-6 PDZ	
Lin-7 L27- Sdt PDZ	

Figure 50 : Nouvelle analyse structure-function par transgène à site d'insertion spécifique.

Le tableau présente les différents transgènes Patj insérer spécifiquement en position 53B2 qui seront utilisés pour le test de sauvetage.

membre du complexe Crb et interagit, comme Patj, avec Sdt grâce à son domaine L27. C'est donc un candidat particulièrement intéressant pour une possible redondance fonctionnelle avec Patj. L'existence de mutants nuls pour *lin-7* m'a poussée à explorer cette possible redondance. Pour cela j'ai généré des doubles mutants *Patj,lin-7*. Alors que les mutants homozygotes *lin-7* sont viables et que les mutants *Patj* meurent en pupes, les doubles mutants meurent plus précocement. En effet, aucune larve L2 ou L3 homozygotes mutantes n'a été retrouvée. Ceci indique que les doubles mutants *Patj,lin-7* meurent soit en embryon comme les mutants *sdt* et *crb*, soit juste après l'éclosion. L'analyse des embryons mutants permettra de le déterminer. J'ai ensuite induit des clones mutants pour *Patj* dans le FE de drosophiles homozygotes mutantes pour *lin-7*. La double mutation résulte en la formation d'un épithélium multicouche de façon très pénétrante et ce même lorsque le clone est petit (**Fig.51A,C,D**). Les cellules perdent leur domaine apical, comme on peut l'observer par l'expansion de Cor et la délocalisation d'aPKC (**Fig.51C**). J'ai aussi retrouvé des cellules aplaties et des trous dans l'épithélium (**Fig.51B,D**). La double mutation aggrave donc les défauts associés à Patj, et phénocopie la mutation de Crb ou Sdt. Patj et Lin-7 semblent donc redondants pour la polarité épithéliale chez la drosophile.

Pour confirmer ce résultat, il doit être vérifié que les doubles mutants sont propres en sauvant la redondance avec des transgènes codant Patj ou Lin-7. Patj devrait sauver la létalité, alors que Lin-7 devrait sauver l'aggravation du phénotype et donc conduire à une létalité en pupes. De plus, l'analyse du sauvetage de la double mutation par différentes construction permettra de mieux comprendre les bases moléculaires de cette redondance (**Fig.51E**).



E

Patj	
Patj L27	
Patj L27-PDZ1	
Patj L27-PDZ2	
Patj L27-PDZ3	
Patj L27-PDZ4	
Lin-7	
Lin-7 L27	
Lin-7 PDZ	

Figure 51 : Interaction génétique entre *Patj* et *lin-7*.
Follicules contenant des clones mutants pour *Patj* dans un contexte homozygote mutant pour *lin-7* immuno-marqués contre Cor (**2**) et aPKC (**3**). La double mutation *Patj,lin-7* induit la formation d'un épithélium multicouche (**A et D flèche, C**). Mais aussi un aplatissement des cellules (**B, flèche**), ou des trous dans l'épithélium (**D**). Ces défauts de polarité sont caractérisés par la perte d'aPKC du domaine apical et la localisation ectopique de Cor dans le domaine (**2, 3**). Le tableau en **E** présente les transgènes dont les capacités à sauver la redondance seront testées.

CHAPITRE III : DISCUSSION

I. Patj régule positivement le complexe Crumbs de façon tissu-spécifique

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse m'ont permis de mettre en évidence la fonction de Patj dans la régulation positive du complexe Crb. La mutation de *Patj* phénocopie celle de *crb* ou *sdt*, même si elle induit un défaut plus subtil. Elle provoque une diminution des niveaux apicaux de Crb, Sdt et aPKC dans les FC. De plus, la réduction de Crb ou Sdt aggrave les défauts associés à la mutation de *Patj* dans les FC. De manière plus significative, la surexpression de *crb* et la mutation de *Patj* se compensent pour les défauts de polarité et de morphogénèse.

En addition à cela le transgène L27-PDZ1 sauve à la fois la létalité des mouches mutantes pour *Patj*, et la localisation de Crb dans les FC. Cette corrélation suggère que la régulation positive du complexe Crb est la fonction majeure de Patj. Pour le confirmer plusieurs expériences sont réalisables. Tout d'abord, il faudrait tester la capacité de L27-PDZ4 à sauver la localisation de Crb dans les FC, pour poursuivre la corrélation entre ce sauvetage et celui de la létalité.

Patj est dispensable dans les épithéliums embryonnaires et larvaires, mais requise pour la morphogénèse des membres et de la tête durant la métamorphose et pour maintenir Crb dans les FC. Patj est donc requise tissu-spécifiquement. De la même façon une

tissu-spécificité a été reportée pour le domaine extracellulaire Crb (Izadoost et al., 2002; Klose et al., 2013; Richardson and Pichaud, 2010). De plus, il existe plusieurs isoformes de Sdt, exprimées de façon tissu spécifique, et dont certaines ont des fonctions différentes (Bulgakova et al., 2010). Nos résultats confirment donc que le complexe Crb subit de nombreuses régulations au cours du développement.

Comment expliquer la tissu-spécificité de Patj ? Tout d'abord la redondance avec Lin-7 (qui sera discuté dans la Partie III), pourrait masquer un rôle plus général de Patj. Alternativement, elle pourrait être révélatrice d'une différence au niveau du complexe Crb. Dans les embryons les processus morphogénétiques sont rapides. Par exemple, l'extension de la bandelette germinale se fait en une quarantaine de minutes (Bertet, et al., 2004). Dans ces cellules Crb doit probablement être très dynamique. A l'inverse la morphogénèse de la pupe est beaucoup plus lente, s'étendant sur plusieurs jours. De même, les FC apparaissent moins dynamiques que les cellules épithéliales embryonnaires (Alégot H, non publié). C'est dans ces tissus, dont le remodelage est lent, que Patj est requis. De plus, le défaut de la mutation *Patj* gagne en sévérité avec le temps dans les FC (corrélé à la taille du clone et au stade de développement considéré). Patj pourrait donc permettre de maintenir un complexe Crb plus stable dans les cellules où il serait moins dynamique et où il nécessiterait de rester au cortex plus longtemps.

II. Patj, Crb et la morphogénèse épithéliale.

II.1. Régulation de la Myosine II.

La mutation *Patj* induit un aplatissement des FC, et la surexpression de Crb inhibe l'aplatissement des cellules squameuses. Ces défauts de morphogénèse sont corrélés avec une diminution et une augmentation de la Myosine II, respectivement. La surexpression de *crb* combinée à la mutation *Patj* résulte en un niveau sauvage de Myosine II, aucune cellule cuboïde ne s'aplatit et les cellules squameuses retrouvent un aplatissement proche des sauvages. L'interprétation génétique de ces expériences serait que la régulation de la myosine par Patj passe par Crb. Patj est proposé comme régulant positivement la Myosine via une interaction directe avec MBS (Sen et al., 2012). Cependant, les domaines impliqués dans cette interaction n'ont pas été déterminés. J'ai observé que les domaines PDZ qui, fusionnés au L27 sauvent la létalité des mutants *Patj,* interagissent avec Crb. De plus, les constructions Patj L27- Sdt PDZ et Patj L27 – Par-6 PDZ qui interagissent avec Sdt et Crb sont aussi capables de sauver les mutants *patj*. Bien qu'il faudrait formellement vérifier que ces transgènes sauvent aussi le niveau d'activation de la myosine, ces données rendent improbable une régulation directe de MBS par Patj dans les FC.

Comment Crb régulerait la Myosine ? Tout d'abord, il est a noté que l'augmentation de la Myosine lors de la surexpression de Crb est surprenante puisque dans la glande salivaire Crb à l'effet inverse (Röper, 2012). L'enrichissement de Crb semble exclure la myosine II. Cependant ces travaux concernent la répartition planaire polarisée de Crb. La régulation de la myosine II par Crb pourrait se faire via aPKC qui phosphoryle ROCK (Ishiuchi

and Takeichi, 2011). Néanmoins, cette phosphorylation est proposée comme inhibant ROCK et donc la myosine II dans les cellules MDCK. Crb pourrait réguler la Myosine II indirectement via l'actine grâce à son association à la Moésine et à la βHeavy-spectrine. La mutation de la Moésine n'induit pas de défaut dans les FC (Mirouse, non publié ; (Claret et al., 2014)). Par contre, celle de la βHeavy-spectrine est à l'origine de défauts morphogénétique dans les FC (Zarnescu and Thomas, 1999). La βHeavy-spectrine serait donc un bon candidat à tester, en analysant l'effet de la surexpression de Crb mutant pour le motif FERM, ou en déterminant si la mutation de la βHeavy-spectrine supprime l'effet de la surexpression de Crb sur la Myosine.

II.2. Régulation des jonctions

En addition de la diminution de la myosine II, j'ai observé une perte de l'intégrité de la ZA dans les cellules *Patj-/-* qui s'aplatissent. Ce défaut est cohérent avec l'aplatissement induit par la mutation d'*arm* (Tanentzapf et al., 2000). La comparaison entre le défaut d'aplatissement Patj et celui de l'ARNi de *Sqh* montre qu'ils sont différents, le premier étant sauvé par le voisinage de cellules sauvages. De plus la surexpression de Sqh phosphomimétique n'est pas suffisante pour sauver l'aplatissement. Ces données suggèrent que le défaut d'aplatissement Patj serait plutôt une conséquence de la perte d'intégrité de la ZA que de la perte de la myosine.

Le défaut de jonction des mutants *patj* apparaît comme une conséquence de la perte partielle de Crb. Crb est connu pour participer à l'agrégation des AJ en ZA (Tepass, 1996). Crb peut influencer la ZA par des processus multiples, notamment via le recrutement des autres protéines apicales. Par exemple, Crb pourrait réguler le trafic des cadhérines via aPKC. En effet, aPKC régule le trafic puisque qu'elle est requise pour l'effet de CdC42 sur

l'endocytose d'E-Cad (Harris and Tepass, 2008). Crb pourrait aussi réguler les jonctions via son action sur le cytosquelette. De façon intéressante la mutation de la βheavy-spectrine affecte aussi l'intégrité de la ZA dans les FC (Zarnescu and Thomas, 1999).

III. Redondance Patj-Lin-7

J'ai ensuite testé une possible redondance entre Patj et Lin-7, sur la base d'une ressemblance structurale entre Lin-7 et la construction minimale capable de sauver *Patj*. J'ai donc généré des doubles mutants *Patj,lin-7.* J'ai observé que cette double mutation aggrave les défauts de *Patj* et de *lin-7* au niveau de la létalité des drosophiles et de la polarité des FC. Patj et Lin-7 semblent donc redondants. Mon travail me permet donc de proposer un possible rôle de lin-7 dans la polarité épithéliale, qui n'avait pas été identifié auparavant. Afin de caractériser au mieux les doubles mutants il faudra analyser plus avant les défauts en embryons, notamment en réalisant des préparations de cuticules.

J'ai révélé une fonction de Patj dans la régulation de Crb qui dépend des domaines L27 et PDZ1 ou PDZ4, et qui repose vraisemblablement sur la capacité de Patj d'interagir à la fois avec Sdt et avec Crb. La redondance Patj, Lin-7 peut se faire à plusieurs niveaux. Elle peut se faire au niveau de la fonction de Patj pour la régulation de Crb par le mécanisme similaire. La redondance peut aussi se faire au niveau d'une autre fonction moléculaire de Patj qui serait commune à Patj et Lin-7.

1) Si Patj et Lin-7 sont redondants pour l'interaction avec Crb, Lin-7 devrait pouvoir interagir avec Crb en précipitation *in vitro* et la surexpression de Lin-7 devrait sauver la localisation de Crb dans les cellules *Patj-/-*. Cependant cette hypothèse est peu probable puisque que *patj* est requis dans les cellules folliculaires alors que Lin-7 est présent dans ces cellules (Bachmann et al., 2008).

2) Alors Lin-7 et Patj pourrait réguler Crb par un autre mécanisme moléculaire que celui proposé pour Patj jusqu'ici. Mes résultats préliminaires montrent que la sévérité des

défauts de la double mutation serait similaire à celle de la mutation de *sdt*. Patj et Lin-7 interagissant toutes les deux avec Sdt, elles pourraient être redondantes pour un effet sur Sdt. Par exemple, Sdt pourrait nécessiter d'interagir avec au moins un domaine L27 pour être fonctionnelle. Alternativement, cet autre mécanisme pourrait reposer sur le PDZ de Lin7 en redondance avec un des PDZ de PATJ.

L'analyse structure-fonction de Lin-7 et des domaines de Patj nécessaires à la redondance et la surexpression de Lin-7 dans les cellules mutantes pour Patj permettra de trancher entre ces différentes possibilités.

IV. Pertinence du Modèle d'oligomérisation de Crumbs.

Pour comprendre comment Patj régule Crb à l'échelle moléculaire j'ai recherché les partenaires du PDZ1 par une approche de crible d'interactions et une approche de candidats. La seconde approche à suggérer Crb comme candidat. J'ai donc vérifié si Patj interagit directement avec Crb *in vitro* et proposé une modèle mécanistique de la régulation de Crb par Patj où Patj permettrait l'oligomérisation de Crb pour la stabiliser. Ce modèle repose ainsi sur trois points : 1) l'interaction directe Crb-Patj, 2) qui permettrait la dimèrisation intracellulaire de Crb et potentiellement son oligomérisation, 3) ce qui favoriserait la stabilité de Crb à la membrane.

IV.1. Interaction-directe Crb-Patj

Montrer l'interaction Crb-Patj *in vivo* est une tache compliquée. Ceci est principalement dû à l'interaction indirecte via Sdt qui limite les possibilités de réaliser une immunoprécipitation. De plus, le PDZ1 seul ne se localise que dans une faible proportion au cortex apical et montre une faible capacité d'interaction in vitro avec Crb, ce qui rend improbable les chances de réussite en immuno-précipitation. L'interaction pourrait être montrée par une approche de FRET entre Patj-Tomato et Crb-GFP. Cette technique est notamment réalisable grâce à la disponibilité de « knock-in » pour Crb, avec la GFP dans le domaine extracellulaire (contrôle négatif) et dans le domaine intracellulaire de Crb.

J'ai testé génétiquement le rôle potentiel d'une interaction directe PATJ-Crb en remplaçant, dans la construction minimale L27-PDZ1, le PDZ1 par le PDZ de Sdt ou celui de Par-6 qui sont tous deux connus pour interagir directement avec Crb. Cette approche génétique a été fructueuse puisque ces protéines sont capables de remplacer Patj. Ce sauvetage est un argument particulièrement fort, et rend confiant quant à la possibilité d'une interaction directe Crb-Patj.

J'ai mis en évidence l'interaction Crb-Patj *in vitro* en précipitation GST. Elle est dépendante du motif ERLI de Crb, comme proposé dans le modèle d'oligomérisation. Le domaine PDZ1 seul n'interagit pas avec Crb et nécessite la présence du domaine L27. Ceci suggère que le L27 serait nécessaire à la conformation du PDZ1 et autoriserait son interaction avec Crb. A l'inverse le PDZ4 seul est capable d'interagir avec Crb et la présence du domaine L27 ne modifie pas cette interaction. Ceci est cohérent avec le fait que dans la protéine Patj endogène le PDZ4 doit être probablement plus éloigné du domaine L27 que le PDZ1. Cependant dans les FC le PDZ4 n'est pas capable de se localiser au cortex apical ce qui suggère que *in vivo* le PDZ4 seul n'interagirait pas avec Crb quand la protéine Patj endogène est présente, alors que le PDZ1 le pourrait dans une faible proportion.

L'interaction Patj-Crb est faible mais très reproductible. Cette interaction est supportée par les expériences de génétique et j'ai essayé de mettre au point les précipitations *in vitro* pour obtenir un résultat plus convaincant. De multiples conditions ont été testées pour augmenter le niveau d'interaction Patj-Crb mais cela n'a pas abouti à une amélioration. Il manquerait donc quelque chose à Patj ou à Crb pour interagir de façon optimale. L'élément manquant pourrait être, de manière non exclusive, une modification post-traductionnelle ou une activation allostérique.

Modification post-traductionnelle.

Il n'y a pas de modifications postraductionnelles au sein des domaines PDZ de Patj reportées dans la littérature. De plus, la consultation de banques protéomiques de phosphopeptides ne révèle pas non plus de modification de PATJ. Par contre Crb est phosphorylée par aPKC (Sotillos et al., 2004). Dans le modèle proposé par Fletcher et al., la dimèrisation des domaines extracellulaires de Crb permet le rapprochement de deux molécule de Crb dont l'une serait associée à aPKC et phosphorylée (Fletcher et al., 2012). Le rapprochement permettrait de phosphoryler la deuxième molécule de Crb. La phosphorylation de Crb par aPKC est requise pour le maintien de Crb au cortex. La possibilité que Patj interagissent mieux avec Crb si elle est phosphorylée serait donc cohérente. Il faudra donc tester la capacité de Patj à lier GST-Crb^{intra} phosphomimétique et GST-Crb^{intra} non-phosphorylable. J'ai déjà cloné ces constructions et constaté que ces protéines se produisent facilement en bactéries.

Activation allostérique

La deuxième possibilité est que Patj nécessite une interaction préalable avec Sdt pour fixer efficacement Crb. Il a été montré que l'interaction de Par-6 avec Cdc42 via son domaine semi-CRIB conduit à l'activation allostérique de son domaine PDZ (Peterson et al., 2004). Toutes les protéines à domaine L27 identifiées chez C.elegans, la drosophile, le poisson zèbre, la souris et l'humain possèdent comme Patj, lin7 et Sdt, un domaine PDZ adjacent au domaine L27. On peut ainsi envisager que les L27-PDZ constitueraient systématiquement des modules dans lesquels la fixation du domaine PDZ à ses cibles pourrait être régulée par une interaction préalable du L27. Au regard des données que j'ai obtenues au cours de l'analyse structure-fonction de Patj et des tests i*n vitro*, cette idée fait

sens. De plus, cela signifierait que Patj ne pourrait interagir efficacement avec Crb qu'après être entrée dans le complexe via Sdt, ce qui est cohérent avec la formation d'oligomères. Il est donc possible que le PDZ1 nécessite une interaction préalable du domaine L27 avec Sdt pour fixer Crb. L'ajout de Sdt dans le mélange d'interaction devra donc être testé. Cependant comme Sdt interagit aussi directement avec Crb il faut empêcher cette interaction pour pouvoir étudier l'interaction Crb-Patj. Pour cela Sdt doit être délétée de son domaine PDZ. Le clonage nécessaire pour cela est actuellement en cours. Si cette expérience est positive alors on pourra se demander si ce type de régulation est courante au sein des modules L27-PDZ.

IV.2. Patj permet l'oligomérisation de Crb.

Bien que des résultats manquent encore et que la démonstration de l'interaction in vitro est compliquée, des arguments soutiennent le modèle d'une oligomérisation de Crb permise par Patj.

Tout d'abord, j'ai observé une corrélation entre la capacité des constructions Patj à interagir avec Crb in vitro et à sauver la létalité des mutants *Patj*. Ensuite, le sauvetage des mutants par Patj L27 – Sdt PDZ, et Patj L27 – Par-6 PDZ est un argument de poids en faveur d'une dimérisation intracellulaire et indirecte de Crb. Une autre construction qui possède le L27 de Lin-7 et le PDZ de Sdt, et donc qui ne contient plus du tout de fragment de Patj, sera testée prochainement, pour appuyer ce résultat.

Pour confirmer le modèle il faudrait montrer que Patj et Sdt sont capables de fixer Crb en même temps. Pour cela, on pourrait réaliser des précipitations de GST-Crb^{intra} en présence de Sdt, de Patj et d'un deuxième Crb^{intra} étiquetée différemment. Si le deuxième Crb est

retrouvé avec GST-Crb^{intra} après précipitation alors cela montrera la capacité de Patj à former des dimères de Crb via Sdt.

Il est difficile de proposer aujourd'hui une approche biochimique pour passer de la démonstration d'une dimérisation intracellulaire à celle d'une oligomérisation. Néanmoins, ce modèle est cohérent avec la tissu-spécificité similaire du domaine extracellulaire de Crb et de Patj. Dans l'épithélium folliculaire, Crb^{intra} surexprimée est incapable de se localiser au cortex en absence de Crb endogène, l'inhibition de la dimèrisation extracellulaire de Crb empêche donc sa localisation (Fletcher et al., 2012). Il serait intéressant de tester si le fait de bloquer la dimèrisation intracellulaire putative via Patj conduit au même défaut. Pour se faire il faudrait tester la capacité de Crb^{intra} à se localiser au cortex en absence de Patj.

IV.3. Patj et la stabilité du complexe Crb.

Si Patj stabilise Crb elle peut le faire par deux biais : via son endocytose ou via son recyclage. Dans les cellules mammifères en culture, la réduction de Patj induit la délocalisation de Crb dans des endosomes (Michel et al., 2005). Il est donc possible que Patj régule le trafic de Crb.

J'ai tenté de bloquer l'endocytose de Crb dans les cellules *Patj-/-* avec un dominant négatif de Shibire mais ce domaine négatif n'est pas suffisamment efficace pour observer un effet sur Crb. Il faudrait donc reproduire l'expérience en utilisant un moyen génétique plus fort comme par exemple la mutation nulle d'*AP-2* (de Vreede et al., 2014). En dépit du fait que la mutation *Patj* phénocopie la mutation du complexe Retromer, le blocage des lysosomes ne rétablit pas Crb à la membrane dans les cellules mutantes pour *Patj*, comme dans les cellules

mutantes pour le Retromer (Pocha et al., 2011). Ceci suggère que Patj ne régulerait pas le recyclage de Crb.

Cependant, dans des FC qui surexpriment Crb et mutantes pour *Patj*, Crb est encore très fortement localisé au cortex, et toujours de façon ectopique alors qu'aPKC ne l'est plus. Crb est donc assez stable à la membrane en absence de Patj. Plutôt que de réguler directement la stabilité de Crb, Patj influencerait donc d'avantage le recrutement d'aPKC qui assurerait, par une boucle de rétrocontrôle positif, le maintien de Crb au cortex en contexte sauvage. Ainsi, Patj pourrait réguler, via la dimèrisation intracellulaire de Crb, le maintien de Sdt au sein du complexe et indirectement le recrutement efficace de Par-6-aPKC pour réguler Crb et lui conférer son effet gain de fonction lorsqu'elle est surexprimée.

V. Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis d'identifier Patj comme un nouveau régulateur tissu-spécifique de Crb. Cette étude a été notamment possible grâce à la génération des premiers mutants nuls pour *Patj*. J'ai pu identifier les domaines de Patj qui sont impliqués dans la régulation de Crb et proposer un modèle moléculaire pour expliquer sa fonction. Ce modèle est basé sur un système d'interactions physiques complexes qui pourrait stabiliser le complexe Crb ou favoriser son activité de recrutement. Les suites de cette étude pourraient ainsi permettre de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire de Sdt qui est connu depuis longtemps comme un partenaire essentiel de Crb. Par ailleurs, mes travaux révèlent une interaction génétique forte suggérant une redondance entre Patj et Lin-7 pour une fonction essentielle au complexe Crb. Les données obtenues ouvrent donc des perspectives quant à la fonction des membres du complexe Crb : Patj, Lin-7 et Sdt. Ainsi, ces travaux apportent des éléments novateurs pour la compréhension de la polarité épithéliale, elle-même étant cruciale pour le développement des épithéliums et le maintien leur intégrité.

Références Bibliographiques

Abe, K. and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin–catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13–19.

Aceto, D., Beers, M. and Kemphues, K. J. (2006). Interaction of PAR-6 with CDC-42 is required for maintenance but not establishment of PAR asymmetry in C. elegans. *Dev. Biol.* **299**, 386–397.

Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2009). Similar and Distinct Properties of MUPP1 and Patj, Two Homologous PDZ Domain-Containing Tight-Junction Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2372–2389.

Adams, M., Celniker, S., Holt, R., Evans, C. and Gocayne, J. (2000). The genome sequence of Drosophila melanogaster. **287**, 2185–2195.

Arimura, N. and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 194–205.

Assa-Kunik, E., Torres, I. L., Schejter, E. D., Johnston, D. S. and Shilo, B.-Z. (2007). Drosophila follicle cells are patterned by multiple levels of Notch signaling and antagonism between the Notch and JAK/STAT pathways. *Development* **134**, 1161–1169.

Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 614–630.

Assémat, E., Crost, E., Ponserre, M., Wijnholds, J., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2013). The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex. *Exp. Cell Res.* **319**, 2514–2525.

Atwood, S. X., Chabu, C., Penkert, R. R., Doe, C. Q. and Prehoda, K. E. (2007). Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J. Cell Sci.* **120**, 3200–3206.

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, ferdi and Knust, E. (2001). Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638–643.

Bachmann, A., Timmer, M., Sierralta, J., Pietrini, G., Gundelfinger, E., Knust, E. and Thomas, U. (2004). Cell type-specific recruitment of Drosophila Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J. Cell Sci.* **117**, 1899–1909.

Bachmann, A., Grawe, F., Johnson, K. and Knust, E. (2008). Drosophila Lin-7 is a component of the Crumbs complex in epithelia and photoreceptor cells and prevents light-induced retinal degeneration. *Eur. J. Cell Biol.* **87**, 123–136.

Banerjee, S., Sousa, A. and Bhat, M. A. (2006). Organization and function of septate junctions: an evolutionary perspective. *Cell Biochem Biophys* **46**, 65–77.

Bardet, P.-L., Guirao, B., Paoletti, C., Serman, F., Léopold, V., Bosveld, F., Goya, Y., Mirouse, V., Graner, F. and Bellaïche, Y. (2013). PTEN Controls Junction Lengthening and Stability during Cell Rearrangement in Epithelial Tissue. *Dev. Cell* **25**, 534–546.

Bauer, R., Löer, B., Ostrowski, K., Martini, J., Weimbs, A., Lechner, H. and Hoch, M. (2005). Intercellular Communication: the Drosophila Innexin Multiprotein Family of Gap Junction Proteins. *Chem. Biol.* **12**, 515–526.

Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H. J. (1996). A Drosophila neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* **87**, 1059–1068.

Bello, V., Moreau, N., Sirour, C., Hidalgo, M., Buisson, N. and Darribère, T. (2014). The dystroglycan: Nestled in an adhesome during embryonic development. *Dev. Biol.*

Benton, R. and St Johnston, D. (2003a). Drosophila PAR-1 and 14-3-3 Inhibit Bazooka/PAR-3 to Establish Complementary Cortical Domains in Polarized Cells. *Cell* **115**, 691–704.

Benton, R. and St Johnston, D. (2003b). A Conserved Oligomerization Domain in< i> Drosophila</i> Bazooka/PAR-3 Is Important for Apical Localization and Epithelial Polarity. *Curr. Biol.* **13**, 1330–1334.

Berger, S., Bulgakova, N. A., Grawe, F., Johnson, K. and Knust, E. (2007). Unraveling the Genetic Complexity of Drosophila stardust During Photoreceptor Morphogenesis and Prevention of Light-Induced Degeneration. *Genetics* **176**, 2189–2200.

Berh, M., Riedel, D. and Schuh, R. (2003). The claudin-like megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in Drosophila. *Cell* **5**, 611–620.

Bertet, C., Sulak, L. and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667–671.

Betschinger, J., Mechtler, K. and Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326–330.

Betschinger, J., Eisenhaber, F. and Knoblich, J. A. (2005). Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr. Biol.* **15**, 276–282.

Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K.-O., Choi, K.-W. and Bellen, H. J. (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833–845.

Bilder, D. (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev.* **18**, 1909–1925.

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

Bilder, D. and Perrimon, N. (2000b). Cooperative Regulation of Cell Polarity and Growth by Drosophila Tumor Suppressors. *Science* **289**, 113–116.

Bilder, D., Schober, M. and Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 53–58.

Blankenship, J. T., Fuller, M. T. and Zallen, J. A. (2007). The Drosophila homolog of the Exo84 exocyst subunit promotes apical epithelial identity. *J. Cell Sci.* **120**, 3099–3110.

Bolivar, J., Huynh, J.-R., Lpez-Schier, H., Gonzlez, C., St Johnston, D. and Gonzlez-Reyes, A. (2001). Centrosome migration into the Drosophila oocyte is independent of BicD and egl, and of the organisation of the microtubule cytoskeleton. *Development* **128**, 1889–1897.

Boyd, L., Guo, S., Levitan, D., Stinchcomb, D. T. and Kemphues, K. J. (1996). PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in C. elegans embryos. *Development* **122**, 3075–3084.

Brendza, R. P. (2000). A Function for Kinesin I in the Posterior Transport of oskar mRNA and Staufen Protein. *Science* **289**, 2120–2122.

Brumby, A. (2004). A Genetic Screen for Dominant Modifiers of a cyclin E Hypomorphic Mutation Identifies Novel Regulators of S-Phase Entry in Drosophila. *Genetics* **168**, 227–251.

Brumby, A. M. and Richardson, H. E. (2003). scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in Drosophila. *EMBO J.* **22**, 5769–5779.

Bryant, D. M., Datta, A., Rodríguez-Fraticelli, A. E., Peränen, J., Martín-Belmonte, F. and Mostov, K. E. (2010). A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1035–1045.

Bulgakova, N. A., Kempkens, O. and Knust, E. (2008). Multiple domains of Stardust differentially mediate localisation of the Crumbs-Stardust complex during photoreceptor development in Drosophila. *J. Cell Sci.* **121**, 2018–2026.

Bulgakova, N. A., Rentsch, M. and Knust, E. (2010). Antagonistic functions of two stardust isoforms in Drosophila photoreceptor cells. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3915–3925.

Campbell, K., Knust, E. and Skaer, H. (2009). Crumbs stabilises epithelial polarity during tissue remodelling. *J. Cell Sci.* **122**, 2604–2612.

Carlson, S. D., Juang, J.-L., Hilgers, S. L. and Garment, M. B. (2000). Blood barriers of the insect. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 151–174.

Carpenter, A. T. (1975). Electron microscopy of meiosis in Drosophila melanogaster females. *Chromosoma* **51**, 157–182.

Cereijido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A. and Sabatini, D. D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* **77**, 853–880.

Cereijido, M., contreras, R. and Shoshani, L. (2004). Cell Adhesion, Polarity, and Epithelia in the Dawn of Metazoans. *Physiol. Rev.* **84**, 1229–1262.

Chalmers, A. D., Pambos, M., Mason, J., Lang, S., Wylie, C. and Papalopulu, N. (2005). aPKC, Crumbs3 and Lgl2 control apicobasal polarity in early vertebrate development. *Development* **132**, 977–986.

Chartier, F. J.-M., Hardy, E. J.-L. and Laprise, P. (2011). Crumbs controls epithelial integrity by inhibiting Rac1 and PI3K. *J. Cell Sci.* **124**, 3393–3398.

Chartier, F. J.-M., Hardy, E. J.-L. and Laprise, P. (2012). Crumbs limits oxidase-dependent signaling to maintain epithelial integrity and prevent photoreceptor cell death. *J. Cell Biol.* **198**, 991–998.

Chen, X. and Macara, I. G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat. Cell Biol.* **7**, 262–269.

Chen, C.-L., Gajewski, K. M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C. and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15810–15815.

Claret, S., Jouette, J., Benoit, B., Legent, K. and Guichet, A. (2014). PI(4,5)P2 Produced by the PI4P5K SKTL Controls Apical Size by Tethering PAR-3 in Drosophila Epithelial Cells. *Curr. Biol.* **24**, 1071–1079.

Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L. yeh and Jan, Y. N. (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the Drosophila oocyte. *Curr. Biol.* **4**, 289–330.

Clark, I. E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1997). Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the Drosophila oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development* **124**, 461–470.

Cohen, D., Brennwald, P. J., Rodriguez-Boulan, E. and Müsch, A. (2004). Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **164**, 717–727.

Collinet, C. and Lecuit, T. (2013). Stability and Dynamics of Cell–Cell Junctions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 25–47. Elsevier.

Colombo, K. (2003). Translation of Polarity Cues into Asymmetric Spindle Positioning in Caenorhabditis elegans Embryos. *Science* **300**, 1957–1961.

Cowan, C. R. and Hyman, A. A. (2007). Acto-myosin reorganization and PAR polarity in C. elegans. *Development* **134**, 1035–1043.

Cox, R. T., Kirkpatrick, C. and Peifer, M. (1996). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during Drosophila embryogenesis. *J. Cell Biol.* **134**, 133–148.

Cuenca, A. A., Schetter, A., Aceto, D., Kemphues, K. and Seydoux, G. (2003). Polarization of the C. elegans zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* **130**, 1255–1265.

Das, D., Zalewski, J. K., Mohan, S., Plageman, T. F., VanDemark, A. P. and Hildebrand, J. D. (2014). The interaction between Shroom3 and Rho-kinase is required for neural tube morphogenesis in mice. *Biol. Open* **3**, 850–860.

David, D. J. V., Tishkina, A. and Harris, T. J. C. (2010). The PAR complex regulates pulsed actomyosin contractions during amnioserosa apical constriction in Drosophila. *Development* **137**, 1645–1655.

Del Álamo, D., Rouault, H. and Schweisguth, F. (2011). Mechanism and Significance of cis-Inhibition in Notch Signalling. *Curr. Biol.* **21**, R40–R47.

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.

Den Hollander, A., Johnson, K., de Kok, Y. J., Klebes, A., Brunner, H. G., Knust, E. and Cremmers, F. P. (2001). CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and drosophila. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2764–2773.

Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M. and Tepass, U. (2013). Monomeric α-catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **15**, 261–273.

De Vreede, G., Schoenfeld, J. D., Windler, S. L., Morrison, H., Lu, H. and Bilder, D. (2014). The Scribble module regulates retromer-dependent endocytic trafficking during epithelial polarization. *Development* **141**, 2796–2802.

Djiane, A., Yogev, S. and Mlodzik, M. (2005). The Apical Determinants aPKC and dPatj Regulate Frizzled-Dependent Planar Cell Polarity in the Drosophila Eye. *Cell* **121**, 621–631.

Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J. M. and St Johnston, D. (2003). The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the Drosophila follicular epithelium. *Development* **130**, 3965–3975.

Doerflinger, H., Benton, R., Torres, I. L., Zwart, M. F. and St Johnston, D. (2006). Drosophila Anterior-Posterior Polarity Requires Actin-Dependent PAR-1 Recruitment to the Oocyte Posterior. *Curr. Biol.* **16**, 1090–1095.

Doerflinger, H., Vogt, N., Torres, I. L., Mirouse, V., Koch, I., Nusslein-Volhard, C. and St Johnston, D. (2010). Bazooka is required for polarisation of the Drosophila anterior-posterior axis. *Development* **137**, 1765–1773.

Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. and Weis, W. I. (2005). α-Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin-β-Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* **123**, 903–915.

Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer zu Brickwedde, M.-K., Ohno, S. and Vestweber, D. (2001). PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. Mol. Cell 28. *EMBO J.* **20**, 3738–3748.

Ephrussi, A. and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 387–392.

Ephrussi, A., Dickinson, L. and Lehmann, R. (1991). oskar Organizes the Germ Plasm and Directs Localization of the Posterior Determinant nanos. *Cell* **66**, 37–50.

Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Hortsch, M., Laval, M. and Bhat, M. A. (2004). Drosophila contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. 4931–4942.

Feng, W., Long, J.-F., Fan, J.-S., Suetake, T. and Zhang, M. (2004). The tetrameric L27 domain complex as an organization platform for supramolecular assemblies. *Nat. Struct. 38 Mol. Biol.* **11**, 475–480.

Feng, W., Long, J. and Zhang, M. (2005). A unified assembly mode revealed by the structures of tetrameric L27 domain complexes formed by mLin-2/mLin-7 and Patj/Pals1 scaffold proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6861–6866.

Fletcher, G. C., Lucas, E. P., Brain, R., Tournier, A. and Thompson, B. J. (2012). Positive Feedback and Mutual Antagonism Combine to Polarize Crumbs in the Drosophila Follicle Cell Epithelium. *Curr. Biol.* **22**, 1116–1122.

Fogg, V. C., Liu, C.-J. and Margolis, B. (2005). Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J. Cell Sci.* **118**, 2859–2869.

Frohnhofer, H. G. and Nüsslein-Volhard, C. (1986). Organisation of Anterior pattern in the drosophila embryo by maternal gene bicoid. *Nature* **324**, 120–125.

Furuse, M. and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* **16**, 181–188.

Gamblin, C. L., Hardy, E. J.-L., Chartier, F. J.-M., Bisson, N. and Laprise, P. (2014). A bidirectional antagonism between aPKC and Yurt regulates epithelial cell polarity. *J. Cell Biol.* **204**, 487–495.

Genevet, A. and Tapon, N. (2011). The Hippo pathway and apico–basal cell polarity. *Biochem. J.* **436**, 213–224.

Genova, J. . and Fehon, R. . (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na+/K+ATPase are essential for septate junction function in Drosophila. *J Cell Biol* **161**, 979–989.

Georgiou, M. and Baum, B. (2010). Polarity proteins and Rho GTPases cooperate to spatially organise epithelialactin-based protrusions. *J. Cell Sci.* **123**, 1383–1383.

Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J. and Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC Regulate Arp2/3-Mediated Endocytosis to Control Local Adherens Junction Stability. *Curr. Biol.* **18**, 1631–1638.

Goldstein, B. and Hird, S. N. (1996). Specification of the anteroposterior axis in Caenorhabditis elegans. *Development* **122**, 1467–1474.

Goldstein, B. and Macara, I. G. (2007). The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Dev. Cell* **13**, 609–622.

González-Reyes, A. and St Johnston, D. (1998). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during Drosophila oogenesis. *Development* **125**, 2837–2846.

Goodwin, S. S. and Vale, R. D. (2010). Patronin Regulates the Microtubule Network by Protecting Microtubule Minus Ends. *Cell* **143**, 263–274.

Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S. S., Zhang, N., Scholey, J. M., Vale, R. D. and Stuurman, N. (2007). Genes Required for Mitotic Spindle Assembly in Drosophila S2 Cells. *Science* **316**, 417–421.

Gotta, M., Abraham, M. C. and Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in< i> C. elegans</i>. *Curr. Biol.* **11**, 482–488.

Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y. K., Lanier, S. M. and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically Distributed< i> C. elegans</i> Homologs of AGS3/PINS Control Spindle Position in the Early Embryo. *Curr. Biol.* **13**, 1029–1037.

Grammont, M. (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in Drosophila melanogaster oogenesis. *J. Cell Biol.* **177**, 139–150.

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.

Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. and Skaer, H. (1996). The Drosophila genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951–959.

Grzeschik, N. A., Amin, N., Secombe, J., Brumby, A. M. and Richardson, H. E. (2007). Abnormalities in cell proliferation and apico-basal cell polarity are separable in Drosophila lgl mutant clones in the developing eye. *Dev. Biol.* **311**, 106–123.

Grzeschik, N. A., Parsons, L. M., Allott, M. L., Harvey, K. F. and Richardson, H. E. (2010). Lgl, aPKC, and Crumbs Regulate the Salvador/Warts/Hippo Pathway through Two Distinct Mechanisms. *Curr. Biol.* **20**, 573–581.

Haigo, S. L., Hildebrand, J. D., Harland, R. M. and Wallingford, J. B. (2003). Shroom Induces Apical Constriction and Is Required for Hingepoint Formation during Neural Tube Closure. *Curr. Biol.* **13**, 2125–2137.

Hall, S., Bone, C., Oshima, K., Zhang, L., McGraw, M., Lucas, B., Fehon, R. G. and Ward, R. E. (2014). Macroglobulin complement-related encodes a protein required for septate junction organization and paracellular barrier function in Drosophila. *Development* **141**, 889–898.

Hao, Y., Boyd, L. and Seydoux, G. (2006). Stabilization of Cell Polarity by the C. elegans RING Protein PAR-2. *Dev. Cell* **10**, 199–208.

Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in Drosophila. *J. Cell Biol.* **167**, 135–147.

Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in Drosophila. *J. Cell Biol.* **170**, 813–823.

Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2007). aPKC Controls Microtubule Organization to Balance Adherens Junction Symmetry and Planar Polarity during Development. *Dev. Cell* **12**, 727–738.

Harris, K. P. and Tepass, U. (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the Drosophila neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J. Cell Biol.* **183**, 1129–1143.

Harris, T. J. C., Sawyer, J. K. and Peifer, M. (2009). Chapter 3 How the Cytoskeleton Helps Build the Embryonic Body Plan. In *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 55–85. Elsevier.

Herranz, H., Stamataki, E., Feiguin, F. and Milán, M. (2006). Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of γ-Secretase activity. *EMBO Rep.* **7**, 297–302.

Hildebrand, J. D. (2005). Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J. Cell Sci.* **118**, 5191–5203.

Honda, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Yasumi, M., Shingai, T., Fukuhara, A., Ozaki-Kuroda, K., Irie, K., Nakanishi, H. and Takai, Y. (2003). Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion. *Genes Cells* **8**, 51–63.

Hong, Y., Stronach, beth, Perrimon, N., Jan, L. yeh and Jan, R. E. (2001). Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634–638.

Horgan, C. P. and McCaffrey, M. W. (2011). Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1202–1206.

Horne-Badovinac, S. and Bilder, D. (2005). Mass transit: Epithelial morphogenesis in theDrosophila egg chamber. *Dev. Dyn.* **232**, 559–574.

Horne-Badovinac, S. and Bilder, D. (2008). Dynein regulates epithelial polarity and the apical localization of stardust A mRNA. *PLoS Genet.* **4**, e8.

Hough, C. D., Woods, D. F., Park, S. and Bryant, P. J. (1997). Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the Drosophila MAGUK Discs large. *Genes Dev.* **11**, 3242–3253.

Hui, S. and Bader, G. D. (2010). Proteome scanning to predict PDZ domain interactions using support vector machines. *BMC Bioinformatics* **11**, 507.

Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**, 137–142.

Hurov, J. B., Watkins, J. L. and Piwnica-Worms, H. (2004). Atypical PKC Phosphorylates PAR-1 Kinases to Regulate Localization and Activity. *Curr. Biol.* **14**, 736–741.

Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M. and Knoblich, J. A. (2004). Sequential Roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the Establishment of Epithelial Polarity during< i> Drosophila</i> Embryogenesis. *Dev. Cell* **6**, 845–854.

Huynh, J. and St Johnston, D. (2000). The role of BicD, Egl, Orb and the microtubules in the restriction of meiosis to the Drosophila oocyte. *Development* **127**, 2785–2794.

Huynh, J.-R. and St Johnston, D. (2004). The Origin of Asymmetry: Early Polarisation of the Drosophila Germline Cyst and Oocyte. *Curr. Biol.* **14**, R438–R449.

Huynh, J.-R., Shulman, J. M., Benton, R. and St Johnston, D. (2001). PAR-1 is required for the maintenance of oocyte fate in Drosophila. *Development* **128**, 1201–1209.

Hynes, R. O. and Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* **150**, F89–F96.

Iglesias, P. A. and Devreotes, P. N. (2008). Navigating through models of chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 35–40.

Ishiuchi, T. and Takeichi, M. (2011). Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 860–866.

Ishiyama, N., Tanaka, N., Abe, K., Yang, Y. J., Abbas, Y. M., Umitsu, M., Nagar, B., Bueler, S. A., Rubinstein, J. L., Takeichi, M., et al. (2013). An Autoinhibited Structure of -Catenin and Its Implications for Vinculin Recruitment to Adherens Junctions. *J. Biol. Chem.* **288**, 15913–15925.

Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T. and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* **154**, 491–498.

Izadoost, Nam, Bhat, M. A., Bellen and Choi (2002). Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178–180.

Janke, C. (2014). The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* **206**, 461–472.

Jenkins, N., Saam, J. R. and Mango, S. E. (2006). CYK-4/GAP Provides a Localized Cue to Initiate Anteroposterior Polarity upon Fertilization. *Science* **313**, 1298–1301.

Jensen, A. M. and Westerfield, M. (2004). Zebrafish mosaic eyes is a novel FERM protein required for retinal lamination and retinal pigmented epithelial tight junction formation. *Curr. Biol.* **14**, 711–717.

Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. and Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **2**, 731–739.

Johansson, A., Driessens, M. and Aspenstrom, P. (2000). The mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J. Cell Sci.* **113**, 3267–3275.

Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N. and Knust, E. (2002). Drosophila Crumbs Is Required to Inhibit Light-Induced Photoreceptor Degeneration. *Curr. Biol.* **12**, 1675–1680.

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle inDrosophila melanogaster. *Wilhelm Rouxs Arch. Dev. Biol.* **193**, 283–295.

Karagiosis, S. A. and Ready, D. F. (2004). Moesin contributes an essential structural role in Drosophila photoreceptor morphogenesis. *Development* **131**, 725–732.

Kay, A. J. and Hunter, C. P. (2001). CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in< i> C. elegans</i>. *Curr. Biol.* **11**, 474–481.

Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos. *Cell* **52**, 311–320.

Kempkens, O., Medina, E., Fernandezballester, G., Ozuyaman, S., Lebivic, A., Serrano, L. and Knust, E. (2006). Computer modelling in combination with in vitro studies reveals similar binding affinities of Drosophila Crumbs for the PDZ domains of Stardust and DmPar-6. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 753–767.

Kim, S., Gailite, I., Moussian, B., Luschnig, S., Goette, M., Fricke, K., Honemann-Capito, M., Grubmuller, H. and Wodarz, A. (2009). Kinase-activity-independent functions of atypical protein kinase C in Drosophila. *J. Cell Sci.* **122**, 3759–3771.

Kim-Ha, J., Smith, J. L. and Macdonald, P. M. (1991). Analysis of cis-and trans-acting elements required for proper deployment of oskar activity in drosophila oocytes. *Cell* **66**, 23–35.

King, R. (1970). Ovarian Developement in Drosophila melanogaster. *N. Y. Acad. Press*.

Klebes, A. and Knust, E. (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in< i> Drosophila</i>. *Curr. Biol.* **10**, 76–85.

Klose, S., Flores-Benitez, D., Riedel, F. and Knust, E. (2013). Fosmid-Based Structure-Function Analysis Reveals Functionally Distinct Domains in the Cytoplasmic Domain of Drosophila Crumbs. *G358 GenesGenomesGenetics* **3**, 153–165.

Knust, E. and Bossinger, O. (2002). Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science* **298**, 1955–1959.

Kolahgar, G., Bardet, P.-L., Langton, P. F., Alexandre, C. and Vincent, J.-P. (2011). Apical deficiency triggers JNK-dependent apoptosis in the embryonic epidermis of Drosophila. *Development* **138**, 3021–3031.

Krahn, M. P., Klopfenstein, D. R., Fischer, N. and Wodarz, A. (2010a). Membrane Targeting of Bazooka/PAR-3 Is Mediated by Direct Binding to Phosphoinositide Lipids. *Curr. Biol.* **20**, 636–642.

Krahn, M. P., Buckers, J., Kastrup, L. and Wodarz, A. (2010b). Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J. Cell Biol.* **190**, 751–760.

Kuchinke, U., Grawe, F. and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in< i> Drosophila</i> by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr. Biol.* **8**, 1357–1365.

Kumfer, K. T., Cook, S. J., Squirrell, J. M., Eliceiri, K. W., Peel, N., O'Connell, K. F. and White, J. G. (2010). CGEF-1 and CHIN-1 regulate CDC-42 activity during asymmetric division in the Caenorhabditis elegans embryo. *Mol. Biol. Cell* **21**, 266–277.

Kusakabe, M. and Nishida, E. (2004). The polarity-inducing kinase Par-1 controls Xenopus gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC. *EMBO J.* **23**, 4190–4201.

Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L. and Fehon, R. G. (1998). Drosophila coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3505–3519.

Laprise, P. and Tepass, U. (2011). Novel insights into epithelial polarity proteins in Drosophila. *Trends Cell Biol.* **21**, 401–408.

Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2006). The FERM Protein Yurt Is a Negative Regulatory Component of the Crumbs Complex that Controls Epithelial Polarity and Apical Membrane Size. *Dev. Cell* **11**, 363–374.

Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na+,K+-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* **459**, 1141–1145.

Laprise, P., Paul, S. M., Boulanger, J., Robbins, R. M., Beitel, G. J. and Tepass, U. (2010). Epithelial Polarity Proteins Regulate Drosophila Tracheal Tube Size in Parallel to the Luminal Matrix Pathway. *Curr. Biol.* **20**, 55–61.

Le Bivic, A. (2013). Evolution and Cell Physiology. 4. Why invent yet another protein complex to build junctions in epithelial cells? *AJP Cell Physiol.* **305**, C1193–C1201.

Lecuit, T. and Lenne, P.-F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 633–644.

Le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D. and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J. Cell Biol.* **189**, 1107–1115.

Lee, S.-K. and Thomas, G. H. (2011). Rac1 modulation of the apical domain is negatively regulated by βHeavy-spectrin. *Mech. Dev.* **128**, 116–128.

Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S. and Bellaiche, Y. (2008). Drosophila Cip4 and WASp Define a Branch of the Cdc42-Par6-aPKC Pathway Regulating E-Cadherin Endocytosis. *Curr. Biol.* **18**, 1639–1648.

Lemmers, C., Médina, E., Delgrossi, M.-H., Michel, D., Arsanto, J.-P. and Le Bivic, A. (2002). hINADl/PATJ, a Homolog of Discs Lost, Interacts with Crumbs and Localizes to Tight Junctions in Human Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 25408–25415.

Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M.-H., Médina, E., Arsanto, J.-P. and Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1324–1333.

Letizia, A., Sotillos, S., Campuzano, S. and Llimargas, M. (2011). Regulated Crb accumulation controls apical constriction and invagination in Drosophila tracheal cells. *J. Cell Sci.* **124**, 240–251.

Li, Z., Wang, L., Hays, T. S. and Cai, Y. (2008). Dynein-mediated apical localization of crumbs transcripts is required for Crumbs activity in epithelial polarity. *J. Cell Biol.* **180**, 31–38.

Lin, H. and Spradling, A. C. (1993). Germline Stem Cell Division and Egg Chamber Development in Transplanted Drosophila Germaria. *Dev. Biol.* **159**, 140–152.

Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3–PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* **2**, 540–547.

Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S. and Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10532–10537.

Llimargas, M., Strigini, M., Katidou, M., Karagogeos, D. and Casanova, J. (2004). Lachesin is a component of a septate junction-based mechanism that controls tube size and epithelial integrity in the Drosophila tracheal system. *Development* **131**, 181–190.

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 Dev.* **15**, 1393–1405.

Lu, H. and Bilder, D. (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1232–1239.

Lye, C. M. and Sanson, B. (2011). Tension and Epithelial Morphogenesis in Drosophila Early Embryos. In *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 145–187. Elsevier.

Mandai, K., Rikitake, Y., Shimono, Y. and Takai, Y. (2013). Afadin/AF-6 and Canoe. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 433–454. Elsevier.

Marcette, J., Hood, I. V., Johnston, C. A., Doe, C. Q. and Prehoda, K. E. (2009). Allosteric Control of Regulated Scaffolding in Membrane-Associated Guanylate Kinases. *Biochemistry (Mosc.)* **48**, 10014–10019.

Margolis, J. and Spradling, A. (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the Drosophila ovary. *Development* **121**, 3797–3807.

Martin, S. G. and Arkowitz, R. A. (2014). Cell polarization in budding and fission yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 228–253.

Martin, A. C. and Goldstein, B. (2014). Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development* **141**, 1987–1998.

Martin, A. C., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2009). Pulsed contractions of an actin–myosin network drive apical constriction. *Nature* **457**, 495–499.

Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. and Mostov, K. (2007). PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383–397.

Massey-Harroche, D., Delgrossi, M.-H., Lane-Guermonprez, L., Arsanto, J.-P., Borg, J.-P., Billaud, M. and Le Bivic, A. (2007). Evidence for a molecular link between the tuberous sclerosis complex and the Crumbs complex. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 529–536.

Mathew, D., Gramates, L. S., Packard, M., Thomas, U., Bilder, D., Perrimon, N., Gorczyca, M. and Budnik, V. (2002). Recruitment of scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein. *Curr. Biol.* **12**, 531–539.

Mathew, S. J., Kerridge, S. and Leptin, M. (2009). A Small Genomic Region Containing Several Loci Required for Gastrulation in Drosophila. *PLoS ONE* **4**, e7437.

Mathew, S. J., Rembold, M. and Leptin, M. (2011). Role for Traf4 in Polarizing Adherens Junctions as a Prerequisite for Efficient Cell Shape Changes. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4978–4993.

McGill, M. A., McKinley, R. F. A. and Harris, T. J. C. (2009). Independent cadherin-catenin and Bazooka clusters interact to assemble adherens junctions. *J. Cell Biol.* **185**, 787–796.

McKinley, R. F. A., Yu, C. G. and Harris, T. J. C. (2012). Assembly of Bazooka polarity landmarks through a multifaceted membrane-association mechanism. *J. Cell Sci.* **125**, 1177–1190.

Médina, E., Lemmers, C., Lane-Guermonprez, L. and Bivic, A. (2002). Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in Drosophila and mammalian epithelial cells. *Biol. Cell* **94**, 305–313.

Michel, D., Arsanto, J.-P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J. and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4049–4057.

Mikl, M. and Cowan, C. R. (2014). Alternative 3' UTR Selection Controls PAR-5 Homeostasis and Cell Polarity in C. elegans Embryos. *Cell Rep.* **8**, 1380–1390.

Mishra, M., Rentsch, M. and Knust, E. (2012). Crumbs regulates polarity and prevents light-induced degeneration of the simple eyes of Drosophila, the ocelli. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 706–716.

Miyoshi, J. and Takai, Y. (2008). Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 670–691.

Mizuno, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kitamura, K., Kutsuzawa, K., Futaki, M., Amano, Y. and Ohno, S. (2003). Self-association of PAR-3-mediated by the Conserved N-terminal Domain Contributes to the Development of Epithelial Tight Junctions. *J. Biol. Chem.* **278**, 31240–31250.

Morais-de-Sá, E., Mirouse, V. and St Johnston, D. (2010). aPKC Phosphorylation of Bazooka Defines the Apical/Lateral Border in Drosophila Epithelial Cells. *Cell* **141**, 509–523.

Morais-de-Sa, E., Mukherjee, A., Lowe, N. and St Johnston, D. (2014). Slmb antagonises the aPKC/Par-6 complex to control oocyte and epithelial polarity. *Development* **141**, 2984–2992.

Morton, D. G., Roos, J. M. and Kemphues, K. J. (1992). par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in Caenorhabditis elegans embryogenesis. *Genetics* **130**, 771–790.

Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A. and Kemphues, K. J. (2002). The Caenorhabditis elegans par-5 Gene Encodes a 14-3-3 Protein Required for Cellular Asymmetry in the Early Embryo. *Dev. Biol.* **241**, 47–58.

Motegi, F. and Sugimoto, A. (2006). Sequential functioning of the ECT-2 RhoGEF, RHO-1 and CDC-42 establishes cell polarity in Caenorhabditis elegans embryos. *Nat. Cell Biol.* **8**, 978–985.

Motegi, F., Zonies, S., Hao, Y., Cuenca, A. A., Griffin, E. and Seydoux, G. (2011). Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in Caenorhabditis elegans zygotes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1361–1367.

Müller, H. A. and Wieschaus, E. (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in Drosophila. *J. Cell Biol.* **134**, 149–163.

Munjal, A. and Lecuit, T. (2014). Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development* **141**, 1789–1793.

Munro, E., Nance, J. and Priess, J. R. (2004). Cortical Flows Powered by Asymmetrical Contraction Transport PAR Proteins to Establish and Maintain Anterior-Posterior Polarity in the Early< i> C. elegans</i> Embryo. *Dev. Cell* **7**, 413–424.

Musch, A., Cohen, Yeaman, C., Nelson, W. J., Rodriguez-Boulan, E. and Brennwald, P. J. (2002). Mammalian Homolog of Drosophila Tumor Suppressor Lethal (2) Giant Larvae Interacts with Basolateral Exocytic Machinery in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 158–168.

Myster, S. H., Cavallo, R., Anderson, C. T., Fox, D. T. and Peifer, M. (2003). Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J. Cell Biol.* **160**, 433–449.

Nam, S.-C. and choi (2003). Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in Drosophila. *Development* **130**, 4363–4372.

Nam, S.-C. and Choi, K.-W. (2006). Domain-specific early and late function of Dpatj in *Drosophila* photoreceptor cells. *Dev. Dyn.* **235**, 1501–1507.

Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.-J., Arsanto, J.-P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., et al. (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* **24**, 4330–4339.

Nekrasova, O. and Green, K. J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol.* **23**, 537–546.

Nelson, K. S., Furuse, M. and Beitel, G. J. (2010). The Drosophila Claudin Kunekune is required for septate junction organization and tracheal tube size control. *Genetics* **185**, 831–839.

Newman, R. A. and Prehoda, K. E. (2009). Intramolecular Interactions Between the Src Homology 3 Guanylate Kinase Domains of Discs Large Regulate Its Function in Asymmetric Cell Division. *J. Biol. Chem.* **284**, 12924–12932.

Nishimura, T. and Takeichi, M. (2008). Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development* **135**, 1493–1502.

O'Brien, L. E., Jou, T.-S., Pollack, A. L., Zhang, Q., Hansen, S. H., Yurchenco, P. and Mostov, K. E. (2001). Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat. Cell Biol.* **3**, 831–838.

Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1993). Identification of a Drosophila homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. *J. Cell Biol.* **121**, 1133–1140.

Ogawa, H., Ohta, N., Moon, W. and Matsuzaki, F. (2009). Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in Drosophila neuroblast asymmetric divisions. *J. Cell Sci.* **122**, 3242–3249.

Ohata, S., Aoki, R., Kinoshita, S., Yamaguchi, M., Tsuruoka-Kinoshita, S., Tanaka, H., Wada, H., Watabe, S., Tsuboi, T., Masai, I., et al. (2011). Dual Roles of Notch in Regulation of Apically Restricted Mitosis and Apicobasal Polarity of Neuroepithelial Cells. *Neuron* **69**, 215–230.

Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K. and Takai, Y. (2007). Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *J. Cell Sci.* **120**, 2352–2365.

Pai, L.-M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M. and Peifer, M. (1996). Drosophila -Catenin and E-cadherin Bind to Distinct Regions of Drosophila Armadillo. *J. Biol. Chem.* **271**, 32411–32420.

Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C. and Bazzoni, G. (2008). Structural organization of the tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 646–659.

Parsons, L. M., Portela, M., Grzeschik, N. A. and Richardson, H. E. (2014). Lgl Regulates Notch Signaling via Endocytosis, Independently of the Apical aPKC-Par6-Baz Polarity Complex. *Curr. Biol.* **24**, 2073–2084.

Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143–149.

Peng, C., Manning, L., Albertson, R. and Doe, C. Q. (2000). The tumour-suppressor genes lgl and dlg regulate basal protein targeting in Drosophila neuroblasts. *Nature* **408**, 596–600.

Peterson, F. C., Penkert, R. R., Volkman, B. F. and Prehoda, K. E. (2004). Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ transition. *Mol. Cell* **13**, 665–676.

Petronczki, M. and Knoblich, J. A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in Drosophila. *Nat. Cell Biol.* **3**, 43–49.

Phelan, P. and Starich, T. (2001). Innexins get into the gap. *Bio Essays* **23**, 388–396.

Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. and Klämbt, C. (2003). The< i> Drosophila</i> Cell Survival Gene< i> discs lost</i> Encodes a Cytoplasmic Codanin-1-like Protein, Not a Homolog of Tight Junction PDZ Protein Patj. *Dev. Cell* **5**, 841–851.

Pilot, F., Philippe, J.-M., Lemmers, C. and Lecuit, T. (2006). Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein. *Nature* **442**, 580–584.

Pinal, N., Goberdhan, D. C. I., Collinson, L., Fujita, Y., Cox, I. M., Wilson, C. and Pichaud, F. (2006). Regulated and Polarized PtdIns(3,4,5)P3 Accumulation Is Essential for Apical Membrane Morphogenesis in Photoreceptor Epithelial Cells. *Curr. Biol.* **16**, 140–149.

Plant, P. J., Fawcett, J. P., Lin, D. C. C., Holdorf, A. D., Binns, K., Kulkarni, S. and Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat. Cell Biol.* **5**, 301–308.

Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. and Knust, E. (2011). Retromer Controls Epithelial Cell Polarity by Trafficking the Apical Determinant Crumbs. *Curr. Biol.* **21**, 1111–1117.

Pokrywka, N. and Stephenson, E. (1995). Microtubules are a general component of mRNA localization systems in Drosophila Oocytes. *Dev. Biol.* **167**, 363–370.

Qian, Y. and Prehoda, K. E. (2006). Interdomain Interactions in the Tumor Suppressor Discs Large Regulate Binding to the Synaptic Protein GukHolder. *J. Biol. Chem.* **281**, 35757–35763.

Quintin, S., Gally, C. and Labouesse, M. (2008). Epithelial morphogenesis in embryos: asymmetries, motors and brakes. *Trends Genet.* **24**, 221–230.

Ravid, S. (2014). The tumor suppressor Lgl1 regulates front-rear polarity of migrating cells. *Cell Adhes. Migr.* **8**,.

Richard, M., Grawe, F. and Knust, E. (2006). DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in theDrosophila eye. *Dev. Dyn.* **235**, 895–907.

Richard, M., Muschalik, N., Grawe, F., Özüyaman, S. and Knust, E. (2009). A role for the extracellular domain of Crumbs in morphogenesis of Drosophila photoreceptor cells. *Eur. J. Cell Biol.* **88**, 765–777.

Richardson, E. C. N. and Pichaud, F. (2010). Crumbs is required to achieve proper organ size control during Drosophila head development. *Development* **137**, 641–650.

Riechmann, V. and Ephrussi, A. (2001). Axis formation during< i> Drosophila</i> oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 374–383.

Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. and Morrow, J. S. (1995). Alpha 1 (E)-catenin is an actin-binding and-bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 8813–8817.

Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y. and Moberg, K. H. (2010). Crumbs Regulates Salvador/Warts/Hippo Signaling in Drosophila via the FERM-Domain Protein Expanded. *Curr. Biol.* **20**, 582–590.

Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G. and Müsch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 233–247.

Roeth, J. F., Sawyer, J. K., Wilner, D. A. and Peifer, M. (2009). Rab11 Helps Maintain Apical Crumbs and Adherens Junctions in the Drosophila Embryonic Ectoderm. *PLoS ONE* **4**, e7634.

Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C.-J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. and Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* **157**, 161–172.

Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H.-P., Lee, C.-Y. and Doe, C. Q. (2003). Drosophila aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J. Cell Biol.* **163**, 1089–1098.

Röper, K. (2012). Anisotropy of Crumbs and aPKC Drives Myosin Cable Assembly during Tube Formation. *Dev. Cell* **23**, 939–953.

Ruohola, H., Bremer, K., Baker, D., Swedlow, J., Jan, L. yeh and Jan, Y. N. (1991). Role of Neurogenic Genes in Establishment of Follicle Cell Fate and Oocyte Polarity during Oogenesis in Drosophila. *Cell* **66**, 433–449.

Schonegg, S. and Hyman, A. A. (2006). CDC-42 and RHO-1 coordinate acto-myosin contractility and PAR protein localization during polarity establishment in C. elegans embryos. *Development* **133**, 3507–3516.

Schüpbach, T. (1987). Germ Line and Soma Cooperate during Oogenesis to Establish the Dorsoventral Pattern of Egg Shell and Embryo in Drosophila melanogaster. *Cell* **49**, 699–707.

Sen, A., Nagy-Zsver-Vadas, Z. and Krahn, M. P. (2012). Drosophila PATJ supports adherens junction stability by modulating Myosin light chain activity. *J. Cell Biol.* **199**, 685–698.

Shewan, A., Eastburn, D. J. and Mostov, K. (2011). Phosphoinositides in Cell Architecture. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004796–a004796.

Shin, K., Straight, S. W. and Margolis, B. (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* **168**, 705–711.

Shivas, J. M., Morrison, H. A., Bilder, D. and Skop, A. R. (2010). Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends Cell Biol.* **20**, 445–452.

Shulman, J. M., Benton, R. and St Johnston, D. (2000). The< i> Drosophila</i> Homolog of< i> C. elegans</i> PAR-1 Organizes the Oocyte Cytoskeleton and Directs< i> oskar</i> mRNA Localization to the Posterior Pole. *Cell* **101**, 377–388.

Simões, S. de M., Blankenship, J. T., Weitz, O., Farrell, D. L., Tamada, M., Fernandez-Gonzalez, R. and Zallen, J. A. (2010). Rho-Kinase Directs Bazooka/Par-3 Planar Polarity during Drosophila Axis Elongation. *Dev. Cell* **19**, 377–388.

Simons, K. and Fuller, S. D. (1985). Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 243–288.

Solon, J., Kaya-Çopur, A., Colombelli, J. and Brunner, D. (2009). Pulsed Forces Timed by a Ratchet-like Mechanism Drive Directed Tissue Movement during Dorsal Closure. *Cell* **137**, 1331–1342.

Sotillos, S., Díaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. and Campuzano, S. (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in Drosophila. *J. Cell Biol.* **166**, 549–557.

Soukup, S.-F., Pocha, S. M., Yuan, M. and Knust, E. (2013). DLin-7 Is Required in Postsynaptic Lamina Neurons to Prevent Light-Induced Photoreceptor Degeneration in Drosophila. *Curr. Biol.* **23**, 1349–1354.

Steinhauer, J. and Kalderon, D. (2006). Microtubule polarity and axis formation in theDrosophila oocyte. *Dev. Dyn.* **235**, 1455–1468.

St Johnston, D. and Ahringer, J. (2010). Cell Polarity in Eggs and Epithelia: Parallels and Diversity. *Cell* **141**, 757–774.

St Johnston, D. and Sanson, B. (2011). Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 540–546.

Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C.-J., Roh, M. and Margolis, B. (2004). Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1981–1990.

Strand, D., Raska, I. and Mechler, B. M. (1994a). The Drosophila lethal (2) giant larvae tumor suppressor protein is a component of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **127**, 1345–1360.

Strand, D., Jakobs, R., Merdes, G., Neumann, B., Kalmes, A., Heid, H. W., Husmann, I. and Mechler, B. M. (1994b). The Drosophila lethal (2) giant larvae tumor suppressor protein forms homo-oligomers and is associated with nonmuscle myosin II heavy chain. *J. Cell Biol.* **127**, 1361–1373.

Strand, D., Unger, S., Corvi, R., Hartenstein, K., Schenkel, H., Kalmes, A., Merdes, G., Neumann, B., Krieg-Schneider, F. and Coy, J. (1995). A human homologue of the Drosophila tumour suppressor gene l(2)gl maps to 17p11.2-12 and codes for a cytoskeletal protein that associates with nonmuscle myosin II heavy chain. *Oncogene* **20**, 291–301.

Sugihara-Mizuno, Y., Adachi, M., Kobayashi, Y., Hamazaki, Y., Nishimura, M., Imai, T., Furuse, M. and Tsukita, S. (2007). Molecular characterization of angiomotin/JEAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes Cells* **12**, 473–486.

Sugioka, K. and Sawa, H. (2012). Formation and functions of asymmetric microtubule organization in polarized cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 517–525.

Suzuki, A. and Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.* **119**, 979–987.

Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, k, Izumi, y, Ohnishi, T. and Ohno, S. (2001). Atypical Protein Kinase C Is Involved in the Evolutionarily Conserved PAR Protein Complex and Plays a Critical Role in Establishing Epithelia-specific Junctional Structures. *J. Cell Biol.* **152**, 1183–1196.

Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., et al. (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr. Biol.* **14**, 1425–1435.

Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, K. J., Miwa, J. and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in Caenorhabditis elegans. *Development* **125**, 3607–3614.

Tachibana, K., Nakanishi, H., Mandai, K., Ozaki, K., Ikeda, W., Yamamoto, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takai, Y. (2000). Two Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Interact through Their Cytoplasmic Domain. *J. Cell Biol.* **150**, 1161–1175.

Taguchi, K., Ishiuchi, T. and Takeichi, M. (2011). Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *J. Cell Biol.* **194**, 643–656.

Takada, Y., Ye, X. and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* **8**, 215.

Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 397–410.

Tanentzapf, G. and Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat. Cell Biol.* **5**, 46–52.

Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J. and Tepass, U. (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during Drosophila oogenesis. *J. Cell Biol.* **151**, 891–904.

Tepass, U. (1996). Crumbs, a Component of the Apical Membrane, Is Required for Zonula Adherens Formation in Primary Epithelia of< i> Drosophila</i>. *Dev. Biol.* **177**, 217–225.

Tepass, U. (2012). The Apical Polarity Protein Network in *Drosophila* Epithelial Cells: Regulation of Polarity, Junctions, Morphogenesis, Cell Growth, and Survival. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 655–685.

Tepass, U. and Hartenstein, V. (1994). The Development of Cellular Junctions in the Drosophila Embryo. *Dev. Biol.* **161**, 563–596.

Tepass, U. and Knust, E. (1993). crumbs and stardust act in a Genetic Pathway That Control the Oganisation of Epithelie in Drosophila melanogaster. *Dev. Biol.* **159**, 311–326.

Tepass, U., Theres, C. and Knust, E. (1990). crumbs Encodes an EGFlike Protein Expressed on Apical Membranes of Drosophila Epithelial Cells and Required for Organization of Epitheli. *Cell* **61**, 787–799.

Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. and Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 91–100.

Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in Drosophila. *Annu. Rev Genet* **35**, 747–84.

Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L. and Alberts, B. M. (1992). Reorganization of the cytoskeleton during Drosophila oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* **115**, 923–936.

Thompson, B. J. (2013). Cell polarity: models and mechanisms from yeast, worms and flies. *Development* **140**, 13–21.

Thompson, B. J., Mathieu, J., Sung, H.-H., Loeser, E., Rørth, P. and Cohen, S. M. (2005). Tumor Suppressor Properties of the ESCRT-II Complex Component Vps25 in Drosophila. *Dev. Cell* **9**, 711–720.

Tian, A.-G. and Deng, W.-M. (2008). Lgl and its phosphorylation by aPKC regulate oocyte polarity formation in Drosophila. *Development* **135**, 463–471.

Tiklová, K., Senti, K.-A., Wang, S., Gräslund, A. and Samakovlis, C. (2010). Epithelial septate junction assembly relies on melanotransferrin iron binding and endocytosis in Drosophila. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1071–1077.

Tortora and Grabowski (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*. 3e française. DeBoeckUniversité.

Tsou, M.-F. B., Hayashi, A., DeBella, L. R., McGrath, G. and Rose, L. S. (2002). LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in C. elegans embryos. *Development* **129**, 4469–4481.

Vaccari, T. and Bilder, D. (2005). The Drosophila Tumor Suppressor vps25 Prevents Nonautonomous Overproliferation by Regulating Notch Trafficking. *Dev. Cell* **9**, 687–698.

Vaccari, T., Rabouille, C. and Ephrussi, A. (2005). The< i> Drosophila</i> PAR-1 Spacer Domain Is Required for Lateral Membrane Association and for Polarization of Follicular Epithelial Cells. *Curr. Biol.* **15**, 255–261.

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 Eeden, F. and St Johnston, D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during Drosophila oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 396–404.

Von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Müller-Borg, M. and Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* **132**, 1675–1686.

Wang, Y. and Riechmann, V. (2007). The Role of the Actomyosin Cytoskeleton in Coordination of Tissue Growth during Drosophila Oogenesis. *Curr. Biol.* **17**, 1349–1355.

Wang, A. Z., Ojakian, G. K. and Nelson, J. (1990a). Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium II. Disassembly and assembly of plasma membrane domains during reversal of epithelial cell polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. **95**, 153–165.

Wang, A. Z., Ojakian, G. K. and Nelson, J. (1990b). Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium I. Uncoupling the roles of cell-cell and cell-substratum contact in establishing plasma membrane polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. *J. Cell Sci.* **95**, 137–151.

Wang, Q., Hurd, T. W. and Margolis, B. (2004). Tight Junction Protein Par6 Interacts with an Evolutionarily Conserved Region in the Amino Terminus of PALS1/Stardust. *J. Biol. Chem.* **279**, 30715–30721.

Wang, Y.-C., Khan, Z., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2012). Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding. *Nature* **484**, 390–393.

Ward, R. E., Lamb, R. S. and Fehon, R. . (1998). A conserved functional domain of Drosophila coracle is required for localization at the septate junction and has membrane-organizing activity. *J Cell Biol* **140**, 1463–1473.

Warner, S. J., Yashiro, H. and Longmore, G. D. (2010). The Cdc42/Par6/aPKC Polarity Complex Regulates Apoptosis-Induced Compensatory Proliferation in Epithelia. *Curr. Biol.* **20**, 677–686.

Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., Van Roy, F., Adamson, E. D. and Takeichi, M. (1998). α-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **142**, 847–857.

Watts, J. L., Morton, D. G., Bestman, J. and Kemphues, K. J. (2000). The C. elegans par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* **127**, 1467–1475.

Wei, S.-Y., Escudero, L. M., Yu, F., Chang, L.-H., Chen, L.-Y., Ho, Y.-H., Lin, C.-M., Chou, C.-S., Chia, W. and Modolell, J. (2005). Echinoid Is a Component of Adherens Junctions That Cooperates with DE-Cadherin to Mediate Cell Adhesion. *Dev. Cell* **8**, 493–504.

Weil, T. T., Forrest, K. M. and Gavis, E. R. (2006). Localization of bicoid mRNA in Late Oocytes Is Maintained by Continual Active Transport. *Dev. Cell* **11**, 251–262.

Wells, C. D., Fawcett, J. P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., et al. (2006). A Rich1/Amot Complex Regulates the Cdc42 GTPase and Apical-Polarity Proteins in Epithelial Cells. *Cell* **125**, 535–548.

Whiteman, E. L., Fan, S., Harder, J. L., Walton, K. D., Liu, C.-J., Soofi, A., Fogg, V. C., Hershenson, M. B., Dressler, G. R., Deutsch, G. H., et al. (2014). Crumbs3 Is Essential for Proper Epithelial Development and Viability. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 43–56.

Windler, S. L. and Bilder, D. (2010). Endocytic Internalization Routes Required for Delta/Notch Signaling. *Curr. Biol.* **20**, 538–543.

Wodarz, A., Grawe, ferdi and Knust, E. (1993). CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during Drosophila epithelial development. *Mech. Dev.* **44**, 175–187.

Wodarz, A., Hinz, uwe, Engelbert, M. and Knust, E. (1995). Expression of Crumbs Confers Apical Character on Plasma Membrane Domains of Ectodermal Epithelia of Drosophila. *Cell* **82**, 67–76.

Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J. Cell Biol.* **150**, 1361–1374.

Wu, V. M., Schulte, J., Hirschi, A., Tepass, U. and Beitel, G. J. (2004). Sinuous is a Drosophila claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J. Cell Biol.* 313–323.

Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.-N., Huang, S. and Zhang, M. (2007a). PDZ Domains of Par-3 as Potential Phosphoinositide Signaling Integrators. *Mol. Cell* **28**, 886–898.

Wu, V. M., Yu, M. H., Paik, R., Banerjee, S., Liang, Z., Paul, S. M., Bhat, M. A. and Beitel, G. J. (2007b). Drosophila Varicose, a member of a new subgroup of basolateral MAGUKs, is required for septate junctions and tracheal morphogenesis. *Development* **134**, 999–1009.

Xie, T. and Spradling, A. C. (2000). A Niche Maintening Germ Line Stem Cells in the Drosophila Ovary. *Science* **290**, 328–330.

Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. and Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell* **123**, 889–901.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., et al. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* **6**, 721–731.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A. and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol.* **13**, 734–743.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Izumi, N., Suzuki, A., Mizuno, K. and Ohno, S. (2006). Lgl mediates apical domain disassembly by suppressing the PAR-3-aPKC-PAR-6 complex to orient apical membrane polarity. *J. Cell Sci.* **119**, 2107–2118.

Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. and Shibata, M. (2010). α-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat. Cell Biol.* **12**, 533–542.

Yu, W., Datta, A., Leroy, P., O'Brien, L. E., Mak, G., Jou, T.-S., Matlin, K. S., Mostov, K. E. and Zegers, M. M. (2005). β1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. *Mol. Biol. Cell* **16**, 433–445.

Zallen, J. A. (2007). Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell* **129**, 1051–1063.

Zallen, J. A. and Wieschaus, E. (2004). Patterned Gene Expression Directs Bipolar Planar Polarity in< i> Drosophila</i>. *Dev. Cell* **6**, 343–355.

Zarnescu, D. C. and Thomas, G. H. (1999). Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in Drosophila. *J. Cell Biol.* **146**, 1075–1086.

Zeitler, J., Hsu, C. P., Dionne, H. and Bilder, D. (2004). Domains controlling cell polarity and proliferation in the Drosophila tumor suppressor Scribble. *J. Cell Biol.* **167**, 1137–1146.

Zhang, J., Yang, X., Wang, Z., Zhou, H., Xie, X., Shen, Y. and Long, J. (2012). Structure of an L27 Domain Heterotrimer from Cell Polarity Complex Patj/Pals1/Mals2 Reveals Mutually Independent L27 Domain Assembly Mode. *J. Biol. Chem.* **287**, 11132–11140.

Zhou, W. and Hong, Y. (2012). Drosophila Patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability. *Development* **139**, 2891–2896.

Zhou, B., Wu, Y. and Lin, X. (2011). Retromer regulates apical–basal polarity through recycling Crumbs. *Dev. Biol.* **360**, 87–95.

Zhu, J., Shang, Y., Wan, Q., Xia, Y., Chen, J., Du, Q. and Zhang, M. (2014). Phosphorylation-dependent interaction between tumor suppressors Dlg and Lgl. *Cell Res.*

Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A., Davis, I. and St Johnston, D. (2008). In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization. *Cell* **134**, 843–853.

Zou, J., Wang, X. and Wei, X. (2012). Crb Apical Polarity Proteins Maintain Zebrafish Retinal Cone Mosaics via Intercellular Binding of Their Extracellular Domains. *Dev. Cell* **22**, 1261–1274.