



HAL
open science

Lien entre signalisation JAK/STAT, remodelage cellulaire et extrusion d'un groupe de cellules épithéliales dans l'ovaire de drosophile

Alba Yurani Torres Espinosa

► **To cite this version:**

Alba Yurani Torres Espinosa. Lien entre signalisation JAK/STAT, remodelage cellulaire et extrusion d'un groupe de cellules épithéliales dans l'ovaire de drosophile. Morphogenèse. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS558 . tel-01968052

HAL Id: tel-01968052

<https://theses.hal.science/tel-01968052>

Submitted on 2 Jan 2019

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.

NNT : 2016SACLS558

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

Alba Yurani Torres Espinosa

**Lien entre signalisation JAK/STAT, remodelage cellulaire et extrusion d'un
groupe de cellules épithéliales dans l'ovaire de drosophile**

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 16 décembre 2016 :

Composition du Jury :

Capy, Pierre	Professeur	CNRS/Université Paris-Sud	Président
Gho, Michel	Docteur CNRS	CNRS/Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Bellaïche, Yohanns	Docteur CNRS	CNRS/Institut Curie	Rapporteur
Monier, Bruno	Chargé de Recherche 1	CNRS/Université Sabatier Toulouse	Examineur
Noselli, Stéphan	Docteur CNRS	CNRS/Institut de Biologie Valrose	Examineur
Agnès, François	Maitre de Conférences	CNRS/ Université Paris-Sud	Directeur de thèse
Pret, Anne-Marie	Professeur	CNRS/ Université Paris-Saclay/	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes rapporteurs de thèse pour m'avoir donné plus de temps pour l'écriture du document, tout spécialement Michel Gho pour avoir dédié de son temps de congés pour faire le rapport de thèse. Egalement, je voudrais remercier tous les membres de mon jury de thèse pour évaluer mon travail de recherche.

Merci à Yohanns Belaïche de m'avoir accompagné comme tuteur de thèse durant ces trois années et dont l'apport a été très bénéfique dans l'orientation et la gestion de mon sujet de recherche.

Merci François Agnès pour ton encadrement pendant ces années de thèse. Tu m'as laissé à la fois l'espace et l'indépendance pour grandir en tant que scientifique. J'ai aimé voir ta passion et ton esprit créatif pour la recherche. J'ai aimé les discussions scientifiques que nous avons eu, tu es une source d'idées et cela m'a nourri. Merci de m'avoir apporté l'optimisme et de la bonne humeur.

Anne-Marie, merci de m'avoir choisi pour rejoindre votre équipe depuis la première année de Master jusqu'à la fin de cette thèse. Durant la 1^{ère} année de thèse lorsque j'ai eu ma blessure à l'épaule, vous m'avez soutenue physiquement et moralement. De même, j'ai aimé ces moments où vous m'avez aidé en m'expliquant ou en éclairant certains points liés à la recherche. Vous l'avez fait avec patience, énergie et minutie. J'ai également apprécié nos discussions en Espagnol et en Français au-delà de la science. C'était un plaisir pour moi de discuter de ces sujets.

Marianne, tu as joué un rôle très important au cours de ma formation scientifique et personnelle, surtout dans cette troisième année de thèse. Scientifiquement, tu m'as expliqué de concepts génétiques et biologiques, tu m'as souligné l'importance de trouver les mécanismes qui gouvernent les processus biologiques, tu as dédié beaucoup de temps pour les corrections de ma thèse voire du temps de vacances, de sommeil et de partage avec ta famille. J'apprécie cela énormément ! Au niveau personnel, tu as fait sortir le meilleur de moi-même en tant qu'être humain. Tu m'as fait comprendre l'importance de s'affirmer et de s'exprimer. Merci de m'avoir encouragé et de m'avoir soutenue durant la rédaction de ma thèse. Qu'est-ce que j'aurais fait sans toi ? J'en avais vraiment besoin à ce moment. Merci pour tous ces moments de rire, de soirées mojito, des conversations en Espagnol. Ah, quelle belle histoire !

Fabienne, merci pour tous les explications en génétique et pour ta patience. Merci de ton calme et ton respect, cela m'inspire toujours de la confiance. Je t'apprécie et t'admire beaucoup comme être humain.

Sophie, merci également pour les explications et tes encouragements dans certains moments difficiles que j'ai eu pendant ces années. Par exemple, j'ai beaucoup apprécié les mots que tu m'as donnée lorsque je ne me sentais pas bien à cause de mon Anglais scientifique. Cela m'a vraiment touché.

Laurine, je te remercie énormément de m'avoir accompagné et de m'avoir apaisé avec certaines choses qui m'angoissaient. Ton esprit d'équipe et ton énergie sont incroyables ! J'admire beaucoup ces qualités chez toi. J'ai également beaucoup apprécié que tu m'aies invitée à Belle-île et d'avoir partagé ces moments reposants avec toi et ta famille. Avoir été reçu dans un environnement si chaleureux m'a fait sentir comme chez moi, en Colombie.

Je voudrais aussi remercier tous les stagiaires qui sont passés par notre laboratoire et qui ont partagé des bons moments avec moi. Tout spécialement Louise Townsend, Esther Fouillet et Véronica Teixeira. Vous m'avez fait tellement rire ! Vous m'avez redonné de la joie ce qui m'a permis de me sentir enfin connectée à la France comme je le suis avec mon pays. Je l'apprecie encore aujourd'hui.

Merci à Amanda, Elena, Vicky et Vanesa pour tous les moments ensemble, spécialement pour les déjeuner hispaniques. Parler en Espagnol me fait tellement plaisir ! Merci également de m'avoir envoyé des messages d'encouragement pendant les moments d'écriture difficile de thèse. Cela m'a fait du bien.

Pour finir, je remercie mon partenaire de chemin, Jean-Baptiste, de m'avoir accompagné et de m'avoir soutenue émotionnellement pendant tous les bons moments comme dans les difficiles qui sont arrivés au cours de ces années de thèse. Tu as fait preuve d'une grande patience ! De plus, merci à ma famille et celle de JB ainsi qu'à mes amis Colombiens de m'avoir soutenue financièrement et moralement durant ces années en France.

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION	1
I. Les épithéliums	1
II. La morphogénèse épithéliale : le changement de forme associé à la dynamique des molécules	7
A. Les principaux acteurs moléculaires du changement de la forme cellulaire	7
1. La Myosine II non-musculaire	7
2. L'Actine filamenteuse	11
3. La Cadhérine comme principal composant des JA.....	13
B. Les cellules épithéliales changent leur forme en fonction de la dynamique, de l'activité et de l'interaction de molécules du réseau d'acto-myosine et des JA.....	15
1. L'invagination du mésoderme présomptif.....	17
a. Les bases moléculaires et cellulaires du processus	17
b. La voie de signalisation Twist/Snail régule ce mécanisme	23
2. L'extension de la bandelette germinative	25
a. Les bases moléculaires et cellulaires du processus	25
b. La voie de signalisation JAK/STAT régule ce mécanisme	31
3. La fermeture dorsale.....	33
a. Les bases moléculaires et cellulaires du processus	33
b. La voie de signalisation Dpp régule ce mécanisme.....	37
III. L'extrusion des cellules épithéliales requiert l'activité du réseau d'acto-myosine	39
A. L'homéostasie et l'apoptose dans le développement	41
1. La cascade canonique de l'apoptose	43
2. Les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose	45
3. Les changements morphologiques des cellules apoptotiques	47
B. Les mécanismes connus pour l'extrusion des cellules épithéliales	47
C. La voie de signalisation Sphingosine-1-phosphate (S1P) est régulée par la voie de signalisation JNK dans les cellules apoptotiques et par les canaux ioniques calciques dans les cellules vivantes.....	53
IV. La signalisation JAK/STAT est requise pour la morphogénèse de plusieurs épithéliums	57

A. Les composants, les fonctions et la régulation de la voie de signalisation JAK/STAT .	57
1. La voie JAK/STAT canonique	59
2. La voie JAK/STAT non canonique	61
B. La voie de signalisation JAK/STAT dans la morphogenèse de deux tissus chez la drosophile	63
1. Remodelage du proventriculus dans l'intestin antérieur	63
2. Remodelage de l'intestin postérieur	65
3. Remodelage des spiracles	67
V. Le follicule ovarien de la drosophile comme modèle d'étude de la signalisation JAK/STAT	71
A. Ovaires, ovarioles et ovogenèse	71
1. Ovogenèse dans le germarium	73
2. Ovogenèse dans le vitellarium	75
B. La voie de signalisation JAK/STAT joue divers rôles durant l'ovogenèse.....	79
1. Spécification des Cellules Polaires et des Cellules Interfolliculaires	79
2. Différenciation des cellules folliculaires	83
3. Migration des cellules de bordure	85
4. Apoptose des CP surnuméraires	87
PROJET DE THESE	91
RESULTATS	93
Première partie de thèse : "Programmed epithelial cell extrusion in the Drosophila ovary requires JAK/STAT dependent cell remodeling prior to apoptosis" (Manuscrit Torres et al., soumis)	95
Deuxième partie de thèse	97
I. Sqh joue-t-il un rôle autonome cellulaire dans le processus d'élimination des CP surnuméraires ?	97
A. L'analyse de la localisation subcellulaire de Sqh:GFP dans les CP révèle deux types de distributions subapicales sans corrélation avec le remodelage des CP.	97
B. La fonction de sqh ne semble pas requise dans les CP pour l'élimination des CP surnuméraires.....	101
1. Peu de clones mutants sqh ¹ ont été générés dans les CP dû à la difficulté d'induire des événements de recombinaison dans cette population de cellules.	101
2. L'expression de différents transgènes sqh-ARNi dans les CP n'altère pas le nombre de CP aux stades tardifs.	105
C. L'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CP n'affecte pas le nombre de CP aux stades tardifs.....	107

D. L'expression de Sqh:GFP n'est pas altérée dans les CP lorsque upd est diminué dans l'épithélium folliculaire	109
II. Sqh joue-t-il un rôle non-autonome cellulaire dans le processus d'élimination des CP surnuméraires.....	113
A. Des analyses de localisation subcellulaire de Sqh révèlent deux distributions de cette protéine dans les CF et celles-ci semblent être régulées par JAK/STAT	113
1. Analyse de la localisation subcellulaire de Sqh dans les CF en utilisant des anticorps spécifiques contre la protéine endogène et sa forme active	113
2. La diminution d'upd ne perturbe pas la distribution subcellulaire de la protéine Sqh endogène dans les CF.	117
3. Dans un contexte sensibilisé pour les niveaux de Sqh, la diminution d'upd dans l'épithélium folliculaire affecte l'organisation de Sqh:GFP dans le domaine subapical des CF	119
B. La perte partielle de fonction de sqh dans les CF suggère un rôle de Sqh dans ces cellules pour le processus d'élimination des CP.....	123
1. Des clones sqh ¹ homozygotes dans l'épithélium folliculaire sont associés à un blocage précoce et tardif du processus d'élimination des CP surnuméraires.	123
2. L'expression de deux ARNi dirigés contre sqh dans les CF affecte l'apoptose des CP surnuméraires.....	127
C. L'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh spécifiquement dans les CF affecte le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires.	129
III. Etude de la dynamique des cellules folliculaires.....	137
A. Les CF déficientes pour l'activité JAK/STAT ont une forme plus régulière que les contrôles	137
B. Les CF déficientes pour JAK/STAT se déforment moins que les contrôles	139
C. La variation absolue des aires des CF n'est pas significativement différente entre les follicules déficients pour JAK/STAT et les contrôles.....	141
D. Les longueurs des jonctions des CF déficientes pour JAK/STAT fluctuent moins que celles des follicules contrôles	143
E. La myosine dans les CF est moins dynamique lorsque l'activité JAK/STAT est réduite	145
IV. D'autres acteurs dans les CF impliqués dans le processus d'élimination des CP surnuméraires.....	151
A. La perte partielle de E-Cadhérine dans les CF bloque le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires.	151
B. La perte partielle de Wasp et Arp3 dans les CF bloque le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires	155
DISCUSSION	163

I. Le processus d'élimination des CP surnuméraires est divisé en trois phases et il est dépendant de l'activité de la voie de signalisation JAK/STAT.	165
II. L'élimination des CP surnuméraires ne semble pas être la conséquence d'un mécanisme autonome cellulaire dépendant de la Myosine.....	169
III. L'élimination des CP surnuméraires implique un mécanisme non autonome cellulaire dépendant du réseau d'acto-myosine et des JA.	171
A. La Myosine.....	175
B. La Cadhérine et les régulateurs de l'Actine : Wasp et Arp3.....	179
IV. La voie JAK/STAT pourrait réguler le réseau d'acto-myosine et la Cadhérine dans les CF pour l'élimination des CP surnuméraires.....	181
V. Ouvertures et Conclusion	187
MATERIELS ET METHODES	193
BIBLIOGRAPHIE.....	197
ANNEXES	209

INTRODUCTION

I. Les épithéliums

Il existe chez les animaux quatre types de tissus fondamentaux : le tissu nerveux, musculaire, connectif et épithélial. Les épithéliums sont des tissus composés de cellules polygonales étroitement jointives, juxtaposées et cohésives, séparées d'un tissu conjonctif sous-jacent riche en vaisseaux par la lame basale. Ils sont divisés en deux grands types selon leur fonction : Le premier est constitué par les épithéliums de revêtement, qui recouvrent les surfaces et les cavités naturelles du corps assurant une fonction de protection mécanique, de mouvements, d'absorption et d'échanges. Le deuxième est représenté par les épithéliums glandulaires, qui sont des masses ou des amas de cellules spécialisées dans l'élaboration d'un produit de sécrétion.

Les épithéliums de revêtement sont eux-mêmes classés selon trois critères : 1) selon le nombre de couches cellulaires, il peut s'agir d'un épithélium simple avec une seule couche (unistratifié), d'un épithélium stratifié avec plusieurs couches (pluristratifié) ou d'un épithélium d'une seule couche avec toutes les cellules reposant sur la lame basal mais dont le pôle apical de seulement certaines atteignent la surface de l'épithélium (pseudostatifié) ; 2) selon la forme des cellules de la couche la plus externe, telles que les cellules pavimenteuses, cubiques ou cylindriques ; et 3) selon la présence de spécialisations de surface comme les cils ou la kératine. Les épithéliums sont nommés sur la base de ces trois critères et leur fonction peut ainsi être facilement reconnue. Par exemple, l'épithélium cylindrique simple cilié, localisé dans le tractus génital féminin, contient une seule couche de cellules cylindriques qui présentent des cils jouant un rôle dans le mouvement de l'ovule depuis l'ovaire jusqu'à la cavité utérine.

Tous les types de cellules épithéliales présentent deux propriétés essentielles qui les caractérisent : la cohésion et la polarité. Ces propriétés permettent la formation de feuillets de cellules qui peuvent acquérir différentes formes pour accomplir une fonction précise régulée de manière spacio-temporelle. La cohésion est la tendance des cellules à adhérer fortement entre elles grâce à la spécialisation de leurs surfaces cellulaires. Elle se fait par des systèmes d'unions structurales et

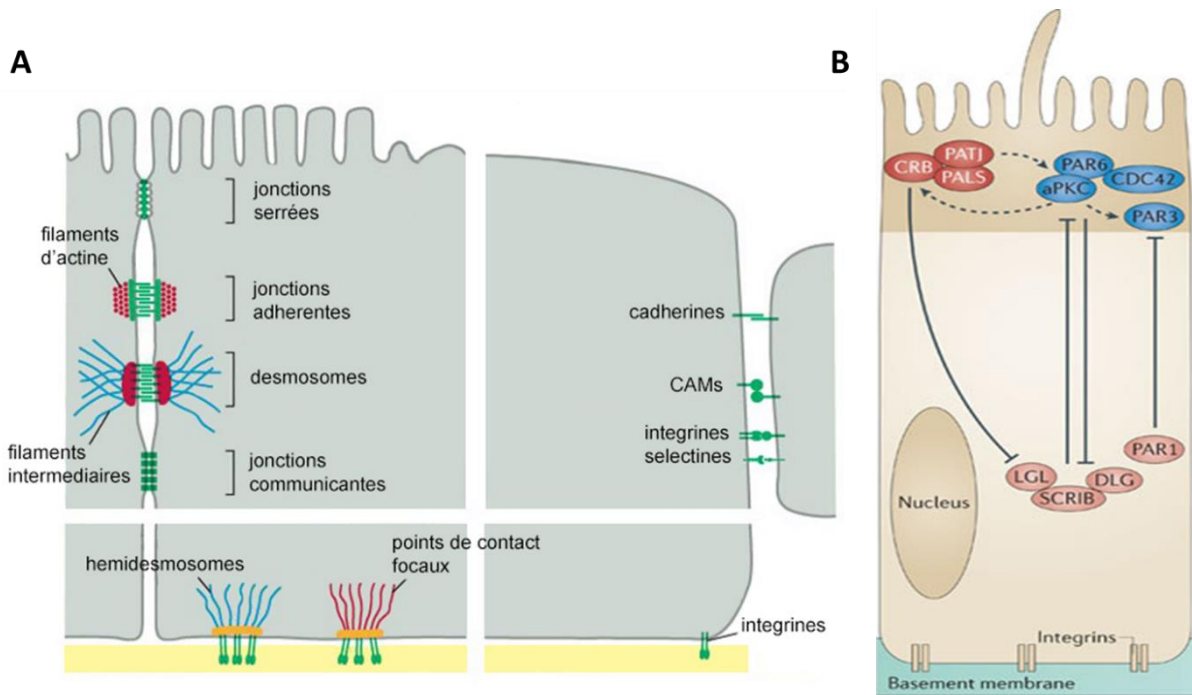


Figure 1. Complexes protéiques maintenant la cohésion et la polarité des cellules épithéliales. A) Illustration du système d'union cellulaire. Les jonctions serrées occupent la position la plus apicale de la cellule. Elles sont suivies par les jonctions adhérentes et les desmosomes. Ces trois systèmes de jonctions constituent une structure appelée « le complexe jonctionnel ». Les jonctions communicantes sont des canaux ioniques qui permettent l'échange de molécules solubles entre les cellules. Les hemidesmosomes et les points de contact focaux sont des jonctions communicantes avec la matrice extracellulaire. Les CAMs sont des familles de molécules qui facilitent l'union intercellulaire. **B)** Illustration des complexes qui participent à l'établissement de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Le complexe « Crumbs », en rouge, établit le domaine apical de la cellule. Le complexe « Par », en bleu, établit le domaine apico-latéral et le complexe « Scribble », en rose, le domaine baso-latéral des cellules épithéliales. Ces trois complexes ont des interactions antagonistes et régulent de façon spacio-temporelle la polarisation des cellules épithéliales via leurs interactions avec la cytosquelette et les protéines d'adhésion. *D'après Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2011.*

moléculaires (Figure 1A). Les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage ou adhérentes et les jonctions communicantes font partie des unions structurales. Les familles de molécules facilitant l'union intercellulaire sont appelées molécules d'adhérence cellulaire (Cell Adhesion Molecules, CAM). La perte de contact cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire dans différents tissus épithéliaux a été largement associée à l'invasion cellulaire et à la métastase (Canel et al., 2013) ainsi qu'à la dissémination bactérienne ou parasitaire chez l'hôte (Maia-Brigagão et al., 2012; Ribet and Cossart, 2015).

La polarité cellulaire est définie par la division de la membrane plasmique de la cellule épithéliale en deux domaines morphologiquement, fonctionnellement et biochimiquement distincts. Un domaine apical dirigé vers le lumen de l'organe et un domaine basal qui repose sur la membrane basale et fixe la cellule au tissu conjonctif sous-jacent. De nombreuses molécules organisées en plusieurs complexes sont impliquées dans la mise en place de la polarité cellulaire (Figure 1B). Jusqu'à aujourd'hui, trois grands complexes ont été identifiés : 1) Le complexe Crumbs (Crb) formé par la protéine transmembranaire Crb et les protéines cytoplasmiques associées Pals et Patj. 2) Le complexe PAR, constitué des protéines Par3, Par6, de la Protéine Kinase C atypique (aPkc) et de la protéine Cell division control protein 42 (Cdc42). Ces deux complexes établissent la région apicolatérale de la membrane plasmique. 3) Le complexe Scribble, composé de la protéine Scribble (Scrib), la protéine Lethal giant larvae (Lgl) et la protéine Discs large (Dlg) qui définit la région basolatérale de la membrane plasmique.

La formation et le maintien de ces trois complexes requiert l'interaction avec des protéines d'adhésion et du cytosquelette (Bryant and Mostov, 2008). Puisque la dérégulation de plusieurs protéines de polarité est fréquemment associée à la progression de tumeurs (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012), elles sont considérées comme des protéines suppresseurs de tumeurs (Crb, Scrib, Lgl, Dlg) ou des oncogènes (aPkc).

Les épithéliums se caractérisent également par leur capacité à se renouveler. Il existe une balance entre la perte de cellules générée par l'apoptose et la formation des cellules générée par la division cellulaire. Ce taux de renouvellement varie selon leur localisation et leur fonction. Par exemple, chez l'homme le renouvellement des cellules de l'épiderme se fait en 28 jours tandis que les cellules qui recouvrent le petit intestin sont remplacées tous les 4-6 jours par des cellules qui se régénèrent à la base de cryptes.

Par conséquent, grâce à leur capacité de cohésion, à leur polarité et enfin à leur capacité de renouvellement, les épithéliums sont des tissus très dynamiques qui peuvent être largement remodelés pendant l'embryogenèse, la cicatrisation ou encore la progression tumorale.

II. La morphogenèse épithéliale : le changement de forme associé à la dynamique des molécules

A. Les principaux acteurs moléculaires du changement de la forme cellulaire

Les molécules d'Actine, de Myosine et les molécules des jonctions adhérentes (JA), principalement la Cadherine, ont été associées à des déformations cellulaires dans différents processus morphogénétiques. Afin de comprendre leurs rôles dans ces processus, la composition de ces molécules ainsi que leurs fonctions et leurs régulateurs seront tout d'abord présentés.

1. La Myosine II non-musculaire

La Myosine II représente une famille de protéines localisées dans les cellules musculaires et non musculaires qui se caractérise par la formation de fibres qui interagissent avec l'Actine. La molécule Myosine II (appelée ci-après Myosine) est une protéine composée d'un dimère de deux chaînes lourdes dont les extrémités C-terminales en hélice α sont superenroulées, ce qui confère à la Myosine la forme rigide d'un bâtonnet (Figure 2). Le domaine globulaire, la tête, contient des régions de liaison

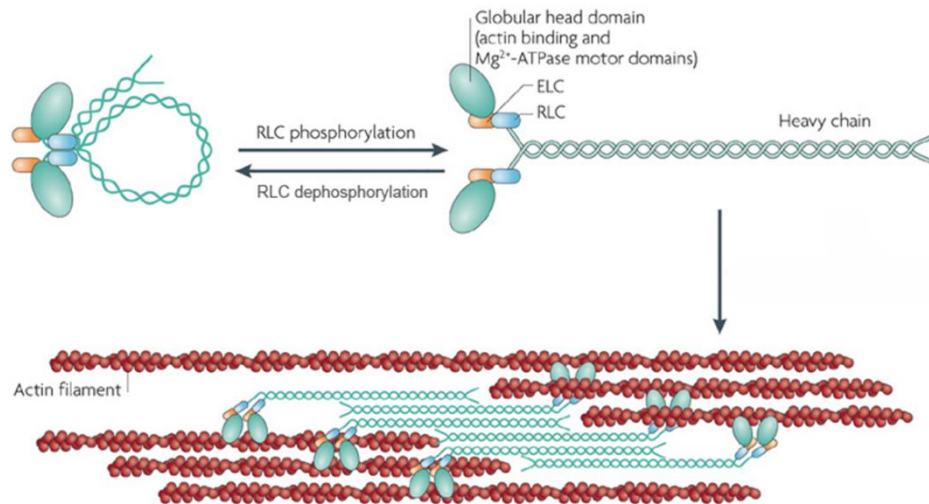


Figure 2. Composants et fonction de la Myosine non musculaire II. Illustration des différentes sous-unités qui composent la Myosine II. Elle est constituée d'un dimère de deux chaînes lourdes, d'une paire de chaînes légères essentielles (ELC) et d'une paire de chaînes légères régulatrices (RLC). Les chaînes lourdes présentent des domaines C-terminaux en hélice α superenroulées et des domaines moteurs N-terminaux globulaires avec des régions d'union à l'actine et d'activité enzymatique Mg^{2+} -ATPase. Lorsque les RLC sont phosphorylées, la Myosine s'active et prend une configuration ouverte permettant un mouvement antiparallèle sur les filaments d'actine générant une contraction. La déphosphorylation des RLC conduit à l'inactivation de la Myosine et à l'établissement d'une configuration fermée. Ainsi, des cycles de phosphorylation – déphosphorylation de RLC régulent positivement ou négativement l'activité de la Myosine. *D'après Vicente-Manzanares et al., 2009.*

à l'actine et des domaines moteurs ATPase dépendant de Mg^{2+} . Deux paires de chaînes légères sont associées à ce dimère. Une paire de chaînes légères essentielles (ELC) et une paire de chaînes légères régulatrices (RLC) (Figure 2). La chaîne lourde et la chaîne légère régulatrice de la Myosine non-musculaire ont été impliquées dans des processus morphogénétiques chez la drosophile et chez *Caenorhabditis elegans* (Lecuit et al., 2011; Roh-Johnson et al., 2012). Chez la drosophile, le gène *zipper (zip)* code la chaîne lourde et le gène *spaghetti squash (sqh)* la chaîne régulatrice légère de la Myosine.

L'activation de la Myosine est régulée par la phosphorylation des RLC. Chez les vertébrés, la phosphorylation se fait au niveau de la Ser21 dans un premier temps puis sur la Thr20. Chez la drosophile, sur la Ser19 d'abord et ensuite sur la Thr18. En absence de phosphorylation sur les RLC, la Myosine est dans une configuration fermée et compacte (Figure 2, haut). Cette forme est incapable de s'associer à d'autres dimères de Myosine donc elle n'est pas active. Lorsque les RLC sont phosphorylées, la Myosine change de conformation, étant ouverte elle peut s'assembler en filaments bipolaires. Cet assemblage et l'activité ATPase permettent le mouvement sur les filaments d'actine d'une façon antiparallèle conduisant à une contraction dans les cellules (Figure 2, bas).

La phosphorylation de la Myosine est régulée par des protéines kinases et phosphatases. Chez la drosophile, sa phosphorylation par Rho kinase (Rok) ainsi que sa déphosphorylation par une des sous-unités de la Myosine phosphatase, Flapwing, ont été associées à différents processus morphogénétiques (Martin et al., 2009; Munjal et al., 2015; Valencia-Expósito et al., 2016; Vasquez et al., 2014).

La Myosine joue un rôle moteur dans différents systèmes car elle est capable de convertir l'énergie chimique de l'ATP en énergie mécanique générant de la force et du mouvement. Une fonction de contraction cellulaire est généralement associée à la Myosine non-musculaire, mais elle est aussi importante dans les processus de cytokinèse et d'extrusion cellulaire (Murthy and Wadsworth, 2005; Rosenblatt et al., 2001).

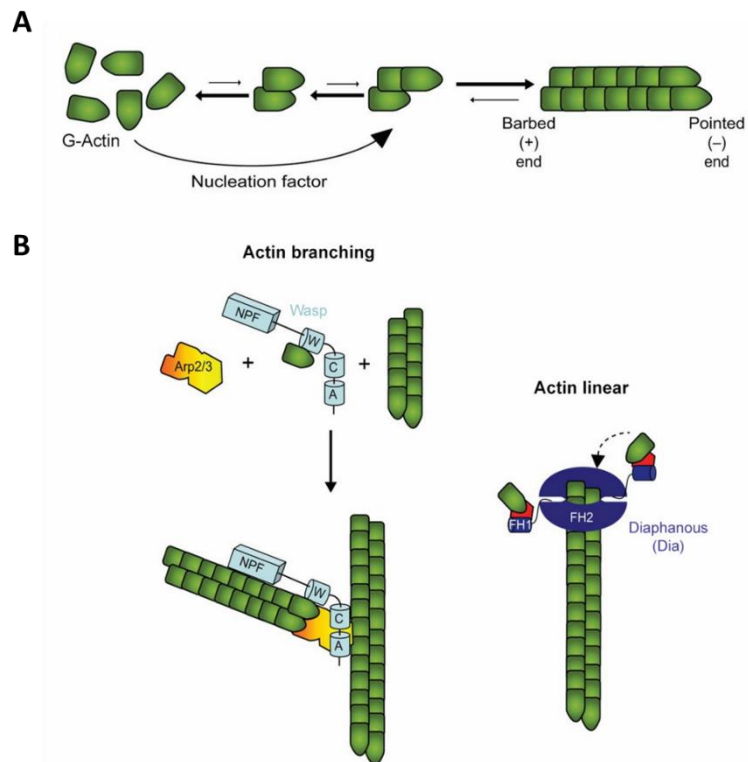


Figure 3. Formation des filaments d'actine et régulateurs de sa polymérisation. A) Les filaments d'actine se forment par l'assemblage de monomères d'actine globulaire. La dimérisation et trimérisation de l'actine globulaire est spontanée mais la suite de la polymérisation requiert des facteurs de nucléation. La polymérisation de l'actine s'effectue par l'addition de monomères d'actine globulaire à l'extrémité positive (+) du filament et sa dépolymérisation à l'extrémité négative (-) libérant l'actine en monomères. **B)** Le complexe Arp2/3 et son activateur Wasp créent un nouveau filament d'actine à partir d'un filament déjà existant et génère ainsi le branchement de l'actine. La protéine Diaphanous (Dia) régule la polymérisation linéaire des filaments d'actine. *D'après Weston et al., 2012.*

2. L'Actine filamenteuse

L'actine est une protéine globulaire qui forme des filaments (Figure 3A). Elle peut être identifiée sous forme de monomères libres, recevant le nom de G-Actine (Actine globulaire) ou faire partie de polymères linéaires appelés microfilaments ou F-Actine (Actine Filamenteuse). Les monomères étant polarisés, les microfilaments eux-mêmes le seront, présentant ainsi une extrémité positive (+) dans laquelle l'actine-G est ajoutée (polymérisation) et une extrémité négative (-) à partir de laquelle l'extrémité des filaments se défait pour retourner sous forme de monomères (dépolymérisation).

La dynamique de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine a été principalement étudiée *in vitro*. Dans ces conditions, ce processus se fait de façon séquentielle et implique quatre phases. Une phase d'activation dans laquelle l'actine-G inactive liée à l'ADP s'active en présence de Mg^{2+} et d'ATP, permettant la formation d'un complexe Actine G-ATP. Une phase de nucléation dans laquelle de petits fragments d'Actine se polymérisent en dimères et trimères de façon instable. Une phase d'élongation, dans laquelle le filament d'actine croît rapidement grâce à l'addition de nouveaux monomères aux deux extrémités. Finalement, une phase d'équilibre, où la vitesse de croissance du polymère devient nulle.

La polymérisation de l'actine est un phénomène physiologique réversible. Les filaments peuvent, selon les besoins immédiats de la cellule, s'assembler et se désassembler en quelques secondes. Cette dynamique de l'actine est au centre de tous les changements et réarrangements des cellules épithéliales. Grâce à cette capacité, une variété de protéines s'associe à l'actine et la régule, telles que des protéines de séquestration de monomères d'actine-G, de coiffage, de fragmentation et de nucléation d'actine (Lee and Dominguez, 2010).

Les protéines de nucléation créent un noyau de nucléation qui permet d'initialiser la polymérisation de l'actine-G en microfilaments. La protéine Diaphanous (Dia) et le complexe Arp2/3 font partie de ce groupe de protéines. Dia est nécessaire à la polymérisation de l'actine linéaire (Figure 3B). Le complexe Arp2/3 est constitué de sept sous-unités associées entre-elles, comprenant les protéines Arp 2 et 3

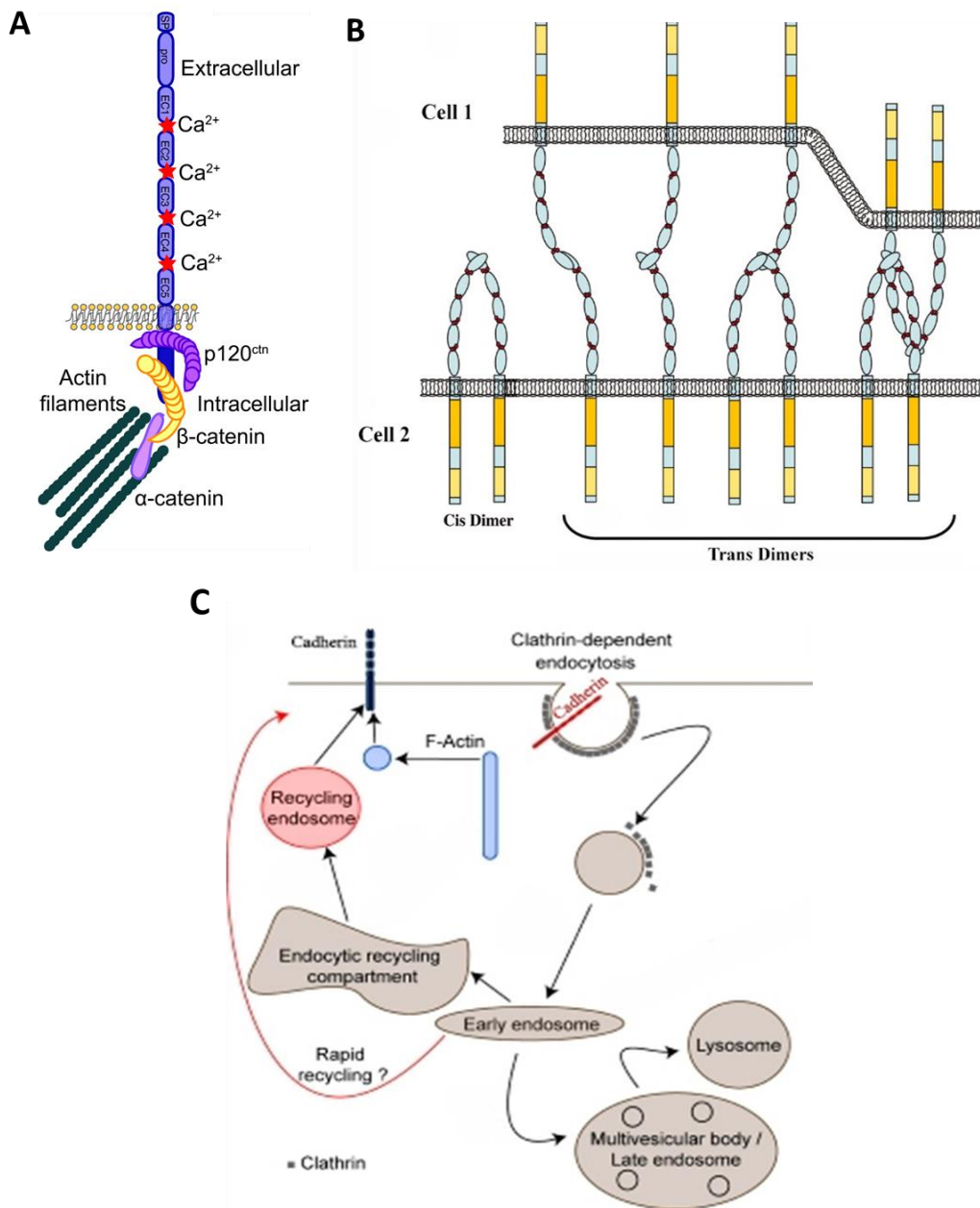


Figure 4. Domaines, organisation et régulation de la Cadhérine. **A)** La molécule de Cadhérine consiste en trois domaines : un domaine extracellulaire qui contient cinq répétitions homologues (EC1-EC5) et des sites d'union au calcium (Ca^{++}), un domaine cytoplasmique proche de la membrane plasmique qui se lie à la Caténine p120 (p120^{ctn}) et un domaine C-terminal qui permet la connexion à l'actine via les α et β Caténines. **B)** Illustration des interactions entre Cadhérines qui conduisent à l'adhésion entre cellules. La Cadhérine peut interagir et former soit des dimères latéraux (ou *cis*), soit des dimères avec des Cadhérines de la cellule adjacente (ou *trans*), ainsi que des associations de dimères en *cis* et en *trans*. **C)** Les niveaux de Cadhérine sont déterminés par l'équilibre entre son recyclage et sa dégradation via les lysosomes. Un des mécanismes d'internalisation de la Cadhérine est dépendant de la Clathrine. D'après Baum and Georgiou, 2011; Vincent et al., 2004; Wheelock et al., 2008.

(Actin-related protein) et cinq autres (p16, p20, p21, p34 et p40). Ce complexe permet la formation de branches de filaments d'actine au niveau des filaments préexistants avec un angle de $\sim 70^\circ$ (Figure 3B) (Pollard, 2007). L'activité de ce complexe est fortement stimulée par des protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine comme les protéines de la famille WASP, dont la protéine Wiskott-Aldrich syndrome protein (Wasp) qui se lie simultanément au complexe Arp2/3 ainsi qu'aux monomères d'actine (Rotty et al., 2013).

Puisque Arp2/3 et son activateur Wasp jouent un rôle déterminant dans la polymérisation de l'actine, ils sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires régulés par l'actine, notamment dans l'endocytose, la phagocytose, la direction du flux cytoplasmique, la fission endosomale et la migration cellulaire (Rotty et al., 2013).

3. La Cadhérine comme principal composant des JA

Les Cadhérines forment une famille de molécules d'adhésion dont l'activité est dépendante du calcium. Dans cette famille, il existe une énorme quantité de membres divisés en plusieurs groupes, mais les plus étudiés sont les Cadhérines de type I ou classiques. La E-Cadhérine (épithéliale) et la N-Cadhérine (neurale) appartiennent à ce groupe. Une molécule de Cadhérine présente trois domaines. Un domaine extracellulaire qui contient les sites déterminant la spécificité de la molécule à se lier avec une autre ainsi que les sites d'union au calcium. Un domaine cytoplasmique proche de la membrane plasmique qui se lie à la Caténine p120 (p120^{ctn}) et un domaine C-terminal qui permet la connexion à l'actine via les α et β Caténines stabilisant l'adhésion intercellulaire (Figure 4A).

Les domaines extracellulaires de deux molécules de Cadhérine dans la même membrane peuvent interagir et former des dimères latéraux ou *cis* (Figure 4B). Ces dimères peuvent contribuer à l'assemblage et à la stabilité des unions intercellulaires. Cependant, la fonction d'adhésion cellulaire se fait par l'interaction de dimères d'adhésion (*trans*) entre molécules des cellules opposées (Figure 4B). Cette adhésion aide à générer une résistance au détachement et à maintenir l'intégrité des tissus. Plusieurs molécules de Cadhérine peuvent également former des groupes qui servent de détecteurs

et de transmetteurs de forces aux cellules voisines. Puisque les Cadhérines sont connectées au réseau d'acto-myosine, les fluctuations de la tension intracellulaire peuvent conduire directement à des changements de forme du tissu via la transmission de ces forces entre les cellules (le Duc et al., 2010; Liu et al., 2010).

Les niveaux de Cadhérine sont déterminés par un équilibre entre son recyclage et sa dégradation (Figure 4C). Une analyse de microscopie super-résolutive chez l'embryon de drosophile accompagnée de modèles mathématiques a suggéré que les groupes de Cadhérines sont régulés par une compétition dans la dynamique entre la fusion ou la rupture de groupes ainsi que son recyclage par l'endocytose (Truong Quang et al., 2013). L'endocytose de la Cadhérine est nécessaire dans divers processus morphogénétiques. Par exemple, chez l'embryon de xénope, une perturbation dans le mouvement d'extension convergente est générée par l'inhibition de l'endocytose de la Cadhérine via la dérégulation de la Dynamine (Jarrett et al., 2002).

Grâce à la polymérisation-dépolymérisation rapide de l'actine et à son association avec le moteur moléculaire Myosine, des forces mécaniques sont générées à l'endroit où ces molécules sont localisées à l'intérieur d'une cellule. A son tour, l'interaction entre le réseau d'acto-myosine et les Cadhérines crée une tension qui est transmise aux cellules voisines par ces complexes d'adhésion. Ces trois molécules sont hautement dynamiques et leur activité varie dans le temps et l'espace. Déterminer la nature de leur interaction et leur régulation permettra ainsi la compréhension des mécanismes qui conduisent aux remodelages au niveau d'une cellule, d'un groupe de cellules ou même d'un tissu.

B. Les cellules épithéliales changent leur forme en fonction de la dynamique, de l'activité et de l'interaction de molécules du réseau d'acto-myosine et des JA

Durant le développement embryonnaire, des déformations à grande échelle des épithéliums dues à leur caractère fluide et dynamique, permettent la formation de tissus et d'organes plus complexes. Plusieurs études génétiques et mécaniques conduites dans divers organismes modèles ont associé de

drastiques mouvements tissulaires avec le changement de la forme, les réarrangements, la migration, la division et enfin l'extrusion cellulaire. La dynamique des molécules du réseau d'acto-myosine et des composants des JA est à la base de ces comportements cellulaires.

De plus, une régulation fine dans l'espace et le temps de la dynamique de ces molécules est fondamentale pour orchestrer les mouvements des processus morphogénétiques. Un des mécanismes qui dirige le développement embryonnaire est l'expression de gènes spécifiques avec des patrons d'expression régulés précisément au niveau spatio-temporel. Ceci peut se faire notamment grâce à l'action de morphogènes, des molécules diffusibles qui contribuent à établir un système de « coordonnées » de position le long des axes de l'embryon. A l'extérieur de la cellule, un morphogène se lie à son récepteur transmembranaire et déclenche une transduction du signal à l'intérieur de la cellule, du cytoplasme jusqu'au noyau, où il induit l'activation ou la répression de gènes cibles spécifiques via des facteurs de transcription. La réponse des cellules dépend de la concentration locale du morphogène. Les groupes de cellules localisées à des distances distinctes de la source de production de cette molécule vont détecter une concentration différente de morphogène et réguler la transcription des gènes cibles différemment en fonction de cette concentration. La concentration du morphogène donne ainsi aux cellules une information de position selon l'origine du signal et déclenche différents comportements cellulaires complètement interconnectés dans l'espace et le temps. Plusieurs morphogènes ou leurs effecteurs directs sont impliqués dans le changement de la forme cellulaire via la régulation du complexe acto-myosine et des JA.

Dans ce chapitre, trois processus morphogénétiques impliquant l'activité régulée de ces complexes seront décrits à titre d'exemples durant leur mise en place au cours du développement embryonnaire chez la drosophile.

1. L'invagination du mésoderme présomptif
 - a. Les bases moléculaires et cellulaires du processus

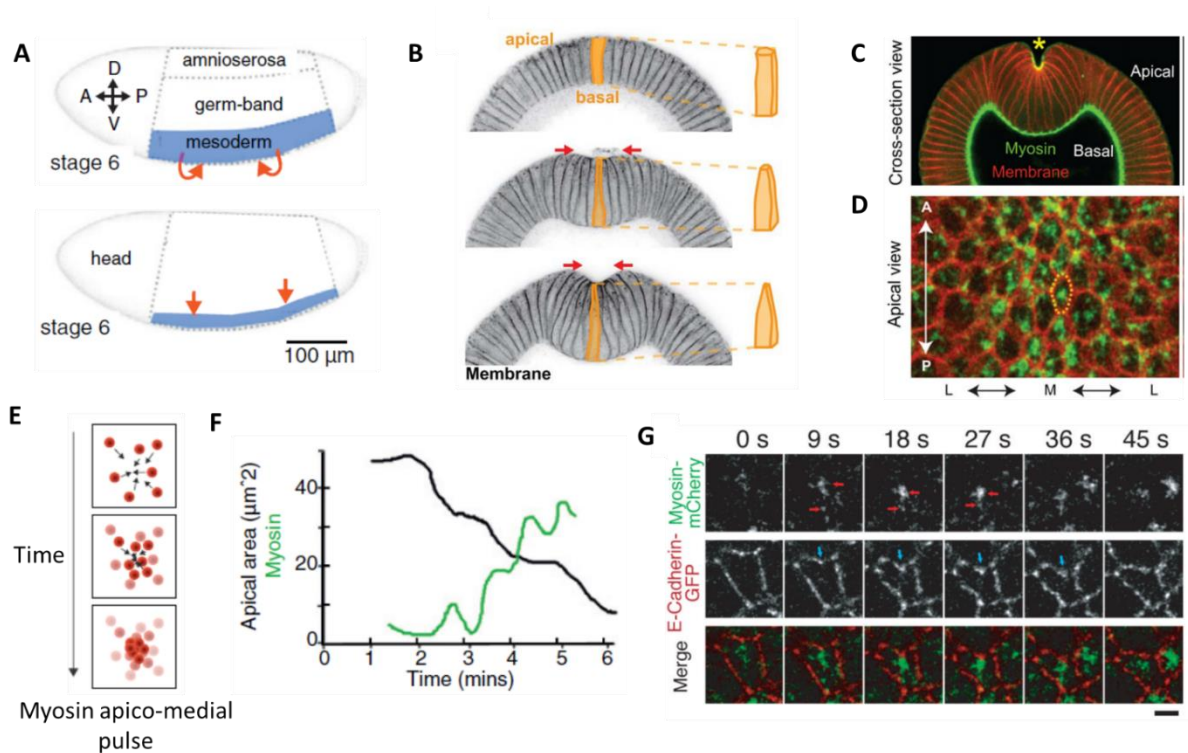


Figure 5. Morphogenèse pendant l'invagination du mésoderme présomptif chez l'embryon de drosophile. **A)** Illustration de l'embryon de drosophile au stade 6 représentant le mouvement du mésoderme vers l'intérieur. **B)** A gauche, un marqueur de membrane permet d'observer la formation du sillon ventral. A droite, les cellules qui sont initialement colonnaires (schéma du haut) font une constriction du domaine apical et s'allongent prenant la forme d'une pointe (schéma du milieu et du bas). **C)** Section sagittale du mésoderme au début de son invagination visualisable grâce à l'utilisation d'un marqueur de membrane (rouge) et d'un marquage de Myosine (vert). L'astérisque jaune indique l'accumulation apicale de la Myosine qui permet l'invagination des cellules. **D)** Vue du domaine apical des cellules du mésoderme présomptif. La Myosine est marquée en vert et les membranes en rouge. L'accumulation de Myosine se fait le long de l'axe Antéro-Postérieur et au niveau de la région médiale (M) -latérale (L) du tissu. Les pointillés jaunes indiquent une cellule qui accumule la Myosine au centre du domaine. **E)** Représentation du mouvement des molécules de Myosine au cours du temps dans les cellules du mésoderme présomptif. **F)** Quantifications de l'aire du domaine apical (noir) et de l'intensité de la Myosine (vert) en fonction du temps. Tandis que l'aire apicale diminue au cours du temps, la Myosine augmente en intensité dans ce domaine. **G)** Images en temps réel d'une cellule du mésoderme présomptif avant son invagination. Une protéine de fusion Myosine :mCherry (en vert) et une protéine E-Cadhérine :GFP (en rouge) permettent de suivre le mouvement de ces molécules au cours du temps. Les flèches rouges indiquent des spots de Myosine fusionnant au cours du temps. Les flèches bleues indiquent des pliements de Cadhérine vers les spots de Myosine. *D'après Collinet and Lecuit, 2013; Gorfinkiel and Blanchard, 2011; Martin and Goldstein, 2014; Martin et al., 2009; Vasquez and Martin, 2016.*

Au stade 6 de l'embryogenèse chez la drosophile, un groupe d'environ 1000 cellules situées le long de la ligne médiale ventrale de l'embryon subissent des changements de forme coordonnés pendant 5-10 minutes en générant un grand mouvement morphogénétique : la formation du sillon ventral (Figure 5A). Notamment, la surface apicale de ces cellules est réduite progressivement conduisant à l'intériorisation subséquente du mésoderme présomptif (Figure 5B) (Leptin, 2005; Polyakov et al., 2014).

Des analyses en temps réel sur des embryons exprimant de protéines de fusion de l'Actine ou de la Myosine et de la E-Cadhérine ou d'un autre marqueur de membrane couplés à des protéines fluorescentes (GFP, mCherry, RFP), ont permis d'identifier leur localisation et leur dynamique au sein des cellules qui vont constituer le sillon ventral de l'embryon de la drosophile.

Il a ainsi été montré que la Myosine était accumulée dans le domaine apical des cellules du mésoderme présomptif (Figure 5C). Plus précisément, elle est présente sous forme de fibres et de « spots » (points) dans une position médiale, soit au centre de ce domaine, exhibant ainsi une localisation apico-médiale dans ces cellules (Figure 5D). Les spots de Myosine fusionnent au cours du temps pour former de structures plus grandes qui bougent ensemble ($\sim 40\text{nm/s}$) (Figure 5D,E,G) (Martin et al., 2009; Mason et al., 2013). Dans les premières étapes de l'invagination du mésoderme, les cellules qui vont constituer le sillon ventral exhibent des intensités fluctuantes de Myosine dans cette région apico-médiale, ce qui indique un comportement pulsatile de cette protéine. Ensuite, de façon aléatoire, la Myosine apico-médiale augmente de plus en plus son intensité dans certaines cellules. Des analyses quantitatives à partir d'images confocales ont permis d'établir que l'augmentation de l'intensité de Myosine associée à la fusion des spots, était corrélée à une contraction du domaine apical de ces cellules (Figure 5F). Pendant les deux premières minutes de constriction apicale, les cellules du mésoderme présomptif présentent des pulsations de constriction faibles interrompues par des étirements cellulaires (Martin et al., 2009). Cependant, les cellules ne se contractent pas en même temps, leur constriction se faisant la plupart du temps de façon asynchrone

(Martin et al., 2009). Ensuite, la constriction apicale augmente en magnitude en raison de l'accumulation de groupes (« pools ») de Myosine médiale. Les contractions pulsatives sont interrompues cette fois-ci par des états de stabilisation de la nouvelle forme cellulaire générée à chaque pulsation. Ceci conduit à la création d'un état de constriction nette qui s'achève par l'invagination du tissu. Ce mécanisme a été appelée « constriction en ratchet » (Martin et al., 2009). Une régulation de l'activité de la Myosine par phospho-et déphospho-rylation est requise pour les contractions pulsatives (Vasquez et al., 2014).

Une protéine de fusion de Rok couplée à la GFP a montré que Rok exhibait une polarité radiale cellulaire (« Radial Cell Polarity» ou RCP) dans les cellules du mésoderme présomptif. C'est-à-dire qu'elle est plus concentrée dans la région centrale du domaine apical de la cellule, son intensité diminuant progressivement en s'éloignant de cette zone vers la périphérie (Mason et al., 2013). Des analyses de corrélation croisée entre les intensités de Rok et de Myosine au cours d'une contraction pulsative ont révélé un pic de corrélation significatif entre les deux signaux, suggérant que Rok serait nécessaire pour réguler l'activité de la Myosine et donc pour générer la constriction apicale de ces cellules (Vasquez et al., 2014). De plus, l'activation de Rok et l'établissement de sa RCP sont réalisés par une protéine de la famille des Rho GTPases, Rho1 (RhoA, chez les vertébrés), qui est elle-même activée par des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (« Guanine nucleotide Exchange Factors, GEFs ») et inhibée par des protéines activatrices de GTPases (« GTPase-activating proteins, GAPs ») via l'hydrolyse du GTP (Mason et al., 2013, 2016; Xie and Martin, 2015).

L'Actine est également accumulée dans le domaine apical des cellules du mésoderme présomptif. Pendant la contraction de ces cellules, elle forme un maillage en fibres qui s'agrègent aux spots de Myosine et se connectent aux JA. Ce réseau entraîne ainsi les contractions pulsatives apicales. Si la polymérisation de l'Actine est perturbée, par exemple par la perte de fonction de *dia* (un accélérateur de la nucléation d'Actine), ou par la drogue cytochalasine (inhibitrice de l'élongation des filaments d'Actine), la Myosine est accumulée dans la région apico-médiale, mais les connections entre le réseau

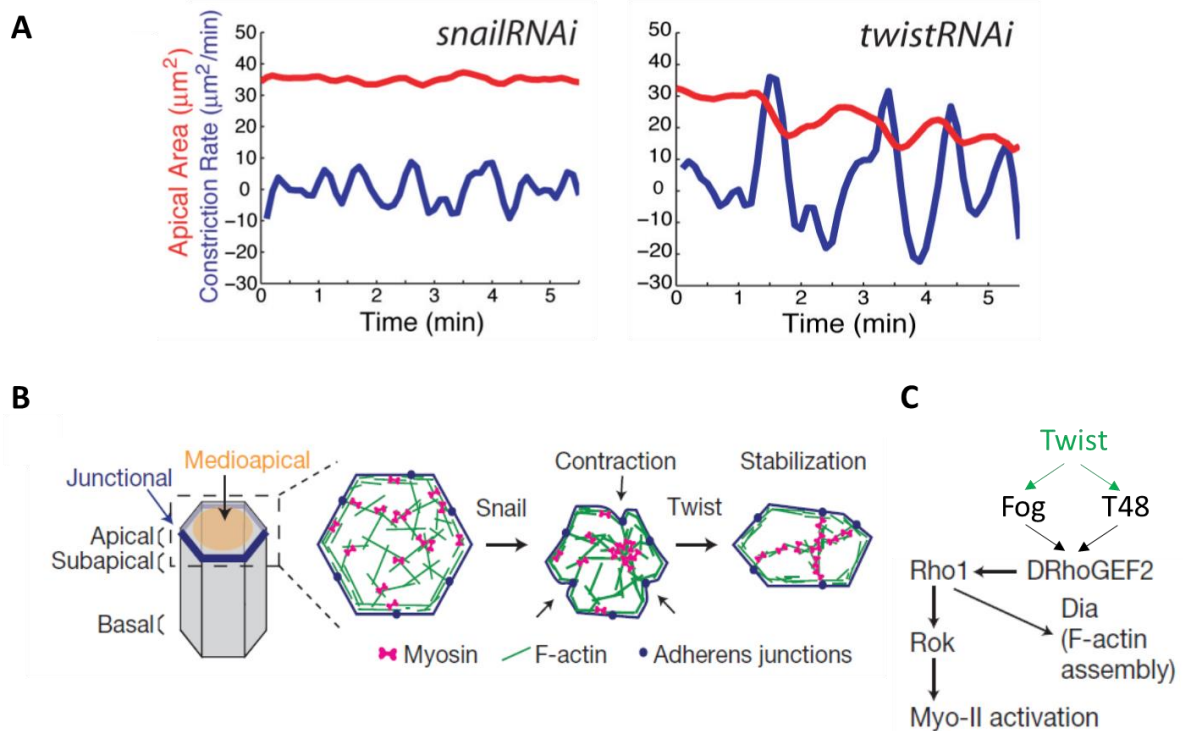


Figure 6. Snail et twist fonctionnent à des différents moments pendant la constriction apicale des cellules du mésoderme présomptif. A) Quantification des aires apicales (rouge) et du taux de constriction (bleu) pour une cellule individuelle dans des embryons *snail*-ARNi et *twist*-ARNi. Lorsque Snail est diminué, les cellules se contractent faiblement et par conséquent l'aire n'est pas réduite au cours du temps. Lorsque twist est diminué, les cellules se contractent mais leur constriction n'est pas stabilisée au cours du temps. Par conséquent, les cellules n'effectuent pas de constriction nette de leur domaine apical. **B)** Diagramme de l'organisation des molécules d'acto-myosine et des JA dans le domaine apical des cellules indiquant les moments de la constriction au cours desquels Snail et Twist sont requis. **C)** Schéma de la voie de signalisation de Twist. Twist active l'expression des protéines transmembranaires Fog et T48 conduisant à l'activation de Rho1 qui va activer le réseau d'acto-myosine via Dia et Rok. D'après Martin et al., 2009; Mason et al., 2013.

d'acto-myosine et les JA sont perdues, affectant ainsi la constriction apicale nette de ces cellules (Martin et al., 2009). Ce résultat met en évidence que les fibres d'Actine sont nécessaires pour établir la connexion entre la Myosine et les JA afin de maintenir l'état contractile des cellules.

Finalement, les composants des JA sont aussi nécessaires pour que l'invagination du mésoderme présomptif ait lieu. La perte de fonction de composants des JA dans ces cellules conduit à une constriction inefficace de leur domaine apical (Martin, 2010; Sawyer et al., 2009). Dans les embryons où des composants de JA sont diminués, la constriction apicale des cellules est initiée car la Myosine s'agrège et forme des structures plus grandes mais elle ne se poursuit pas. Par conséquent, l'invagination du tissu ne peut s'effectuer complètement. Il a été établi que dans un contexte contrôlé, lorsque la constriction du domaine apical se mettait en place, la E-Cadhérine devenait plus apicale et rentrait en contact avec le réseau d'acto-myosine. De cette façon, quand le réseau apico-médial d'acto-myosine se rassemble, l'Actine tire la E-Cadhérine vers la région médiale en la pliant et en engendrant ainsi la constriction des cellules (Figure 5G) (Martin et al., 2009).

En somme, les changements de la forme des cellules du mésoderme présomptif sont générés par une constriction apico-médiale en « ratchet » du réseau d'acto-myosine couplé aux JA afin de transmettre ces forces mécaniques et causer ainsi l'invagination du tissu.

b. La voie de signalisation Twist/Snail régule ce mécanisme

Le gradient du morphogène maternel Dorsal (Dl) initie la différenciation de l'embryon de drosophile en trois territoires le long de l'axe dorso-ventral: 1) une région ventrale avec les plus hauts niveaux nucléaires de Dl qui donne lieu au mésoderme; 2) une région latérale avec des niveaux modérés de Dl donnant lieu au neuroectoderme et à l'ectoderme dorso-latéral et 3) une région dorsale avec des niveaux faibles ou absents de Dl donnant lieu à l'ectoderme dorsal et l'amnioséreuse. Dans la région ventrale, Dl active les facteurs de transcription Snail (Sna) and Twist (Twi) qui sont des régulateurs de la constriction apicale des cellules qui vont constituer le sillon ventral (Ip et al., 1992). En effet, dans des embryons mutants pour *snail* ou *twist*, ces cellules ne peuvent pas se contracter efficacement

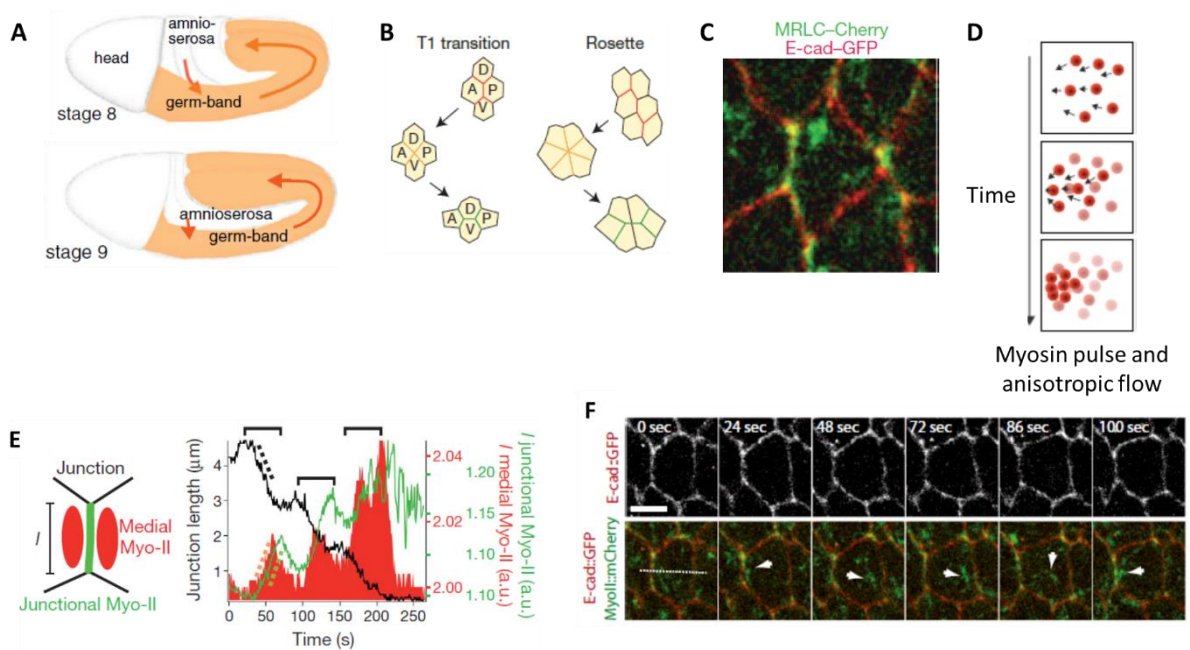


Figure 7. Morphogénèse pendant l’extension de la bandelette germinative (GBE) chez l’embryon de drosophile. **A)** Illustration de l’embryon de la drosophile au stade 8 représentant le mouvement antéro-postérieur de la GBE. **B)** Les cellules de l’ectoderme latéral subissent des transitions T1 et la formation de structures en rosettes pendant ce mouvement. Ces deux mécanismes impliquent une intercalation cellulaire avec un échange de voisins. **C)** Localisation apicale de Myosine (MRLC-Cherry, en vert) et de E-Cadhérine (E-Cad-GFP, en rouge) pendant l’intercalation des cellules. **D)** Représentation du mouvement des molécules de Myosine au cours du temps dans les cellules de l’ectoderme latéral. **E)** A gauche, schéma représentant les différents *pools* de Myosine dans le domaine apical. A droite, des quantifications de la longueur de jonctions D/V (noir) ainsi que de l’intensité médiale (rouge) et jonctionnelle (vert) de la Myosine en fonction du temps. Les pics de Myosine médiale précèdent les pics de Myosine jonctionnelle. **F)** Localisation de Cadhérine (E-Cad :GFP, en rouge) et de Myosine (MyoII :mCherry, en vert) au niveau du domaine apical des cellules de l’ectoderme latéral pendant la GBE. Des flux de Myosine vers les jonctions D/V de gauche à droite sont observées dans la même cellule au cours du temps. *D’après Collinet and Lecuit, 2013; Gorfinkiel and Blanchard, 2011; Levayer and Lecuit, 2013; Rauzi et al., 2010.*

(Figure 6A). Ces deux gènes sont impliqués différemment dans le processus de constriction apicale. *Snail* est nécessaire pour initier les contractions du réseau d'acto-myosine. En absence de ce facteur de transcription, la Myosine ne s'agrège pas dans la région apico-médiale des cellules mais elle s'enrichit dans le domaine apical et subapical au niveau des JA à l'intersection (sommets) de plusieurs cellules (Martin et al., 2009). *Twist*, quant à lui, est requis pour la stabilisation des pulsations facilitant l'assemblage médial de l'Actine. Lorsque *twist* est inhibé, la Myosine s'agrège et les pulsations sont produites mais l'Actine n'est plus arrangée en fibres et s'accumule principalement au niveau des jonctions (Figure 6B) (Martin et al., 2009). Les pulsations générées par la Myosine ne peuvent pas être stabilisées car il n'y a pas de connexion entre la région médiale et les jonctions, les cellules ne pouvant donc pas réaliser une constriction nette. De plus, la perte de *twist* ou *snail* inverse la RCP de Rok en accumulant cette protéine au niveau des JA. Par conséquent, ces deux facteurs de transcription sont nécessaires pour la polarisation de Rok dans le domaine apico-médial (Mason et al., 2013).

En conclusion, dans les cellules du mésoderme présomptif, *snail* est nécessaire pour initier les contractions apicales en « ratchet » et l'expression de *twist* sert pour les stabiliser au cours du temps conduisant alors à l'invagination du tissu (Figure 6A-C).

2. L'extension de la bandelette germinative

a. Les bases moléculaires et cellulaires du processus

Entre les stades 8 et 9 de l'embryon de drosophile un mouvement morphogénétique se met en place dans les cellules de l'ectoderme latéral (Figure 7A). Il s'agit de l'extension convergente, une intercalation cellulaire qui dure 30 minutes. Il s'agit d'un mouvement postéro-dorsal qui conduit à une élongation coordonnée du tissu. Pendant cette extension convergente, l'embryon double sa longueur alors qu'il réduit de moitié sa largeur dans un processus nommé l'extension de la bandelette germinative (« Germband extension », GBE). Ce processus est effectué par une combinaison de changements de forme et de réarrangements cellulaires. Deux mécanismes conduisant à cette morphogénèse ont été identifiés au cours de la GBE (Figure 7B). Un mécanisme d'échanges

jonctionnels dits T1 entre des groupes de 4 cellules où les jonctions dorso-ventrales (verticales) se rétrécissent jusqu'à disparaître, suivi de la formation d'une nouvelle jonction antéro-postérieure (horizontale). Ce remodelage de jonctions conduit ainsi à un échange de voisins. Le deuxième mécanisme est la formation de structures en rosette. Dans ce cas, le rétrécissement d'une jonction verticale pousse plusieurs cellules à former une structure en rosette avec un sommet central. Ceci est suivi d'une relaxation de la rosette avec une orientation perpendiculaire (Bertet et al., 2004).

Les cellules de l'ectoderme latéral exhibent une polarité planaire (ou polarité tissulaire), c'est-à-dire qu'elles présentent une seconde polarité orientée perpendiculairement à l'axe de polarité apico-basal. Par conséquent, il existe dans ces cellules un patron complémentaire entre l'accumulation de la Myosine et les molécules des JA (Figure 7C). En effet, la E-Cadhérine et la β -caténine sont enrichies dans les jonctions orientées selon l'axe Antéro-Postérieur (AP) de l'embryon et la Myosine est enrichie dans les jonctions Dorso-Ventrales (DV) (Blankenship et al., 2006). Il a été démontré que cette polarité planaire était établie par la protéine Par3 (Bazooka chez la Drosophile), de façon dépendante de la kinase Rok (Simões et al., 2010). Des prédictions faites à partir de modèles générés *in silico* ont suggéré que la polarisation DV/AP de ces protéines était suffisante pour conduire à l'élongation du tissu (Rauzi et al., 2008).

Des analyses en temps réel utilisant des protéines de fusion de la Myosine, l'Actine et la E-Cadhérine couplées à différentes protéines fluorescentes ont permis l'identification du mécanisme moléculaire conduisant aux réarrangements cellulaires qui ont lieu pendant la GBE. Dans les cellules de l'ectoderme latéral, la Myosine est localisée apicalement en deux *pools* : un *pool* médial et un *pool* jonctionnel (dans la jonction). Au cours de l'intercalation cellulaire, ces différentes populations de Myosine fluctuent en intensité (pulsations) mais la Myosine jonctionnelle augmente graduellement avec l'intercalation des cellules. L'Actine constitue un réseau qui s'étend aux JA et s'agrège avec la Myosine dans la région médiale des cellules (Munjaj et al., 2015; Rauzi et al., 2008, 2010).

Des expériences d'ablation laser, de corrélations croisées (comparaisons des intensités de deux marquages en fonction du temps) entre les différents signaux des *pools* de Myosine, ainsi que de comparaisons entre les taux de raccourcissement des jonctions verticales et l'intensité de Myosine, ont révélé que ce n'était pas la localisation de la Myosine en soi qui causait les réarrangements cellulaires, mais le flux de cette protéine entre les régions médiale et jonctionnelle (Rauzi et al., 2010). En effet, tandis que les pulsations médiales de Myosine corrèlent avec les raccourcissements des jonctions verticales, les pulsations jonctionnelles corrèlent avec la relaxation de la jonction (Figure 7C-E). Ceci suggère une contribution mécanique (*pools* médiaux) suivie d'un rôle stabilisant (*pools* jonctionnels) de la Myosine sur le raccourcissement des jonctions verticales.

Dans une cellule, les flux de Myosine alternèrent de façon aléatoire vers l'axe antérieur (gauche) et ensuite vers l'axe postérieur (droite), ce qui permet le raccourcissement des jonctions en alternance (Figure 7F). Des cycles de phosphorylation-déphosphorylation de la Myosine par Rok et son régulateur Rho1 et le complexe des phosphatases de Myosine sont requis pour établir la polarité des pulsations de Myosine (Munjal et al., 2015). Les flux Antéro-Postérieurs de Myosine sont également orientés par la polarisation planaire des complexes E-Cadhérine/ α - et β -Caténine et corrèlent avec les fluctuations d'intensité de E-Cadhérine à ces jonctions (Blankenship et al., 2006; Levayer et al., 2011; Rauzi et al., 2010). Plus particulièrement, ils sont dirigés vers la jonction D/V qui est la plus forte en E-Cadhérine. Ainsi la concentration de E-Cadhérine dirige et génère des ancrages asymétriques pour des forces de traction créées par les flux de Myosine (Levayer and Lecuit, 2013). La localisation de la E-Cadhérine est régulée par un grand taux d'endocytose dans les jonctions DV selon un mécanisme qui dépend de la Clathrine et de la Dynamine (Levayer et al., 2011). Notamment, inhiber ou augmenter l'endocytose de la E-Cadhérine conduit à la perte de la polarité planaire et perturbe ainsi la polarisation du flux de Myosine (Levayer and Lecuit, 2013).

L'extension de la bandelette germinative est donc un processus morphogénétique qui s'effectue à partir de l'assemblage-désassemblage du réseau d'acto-myosine, de la polarité planaire et de

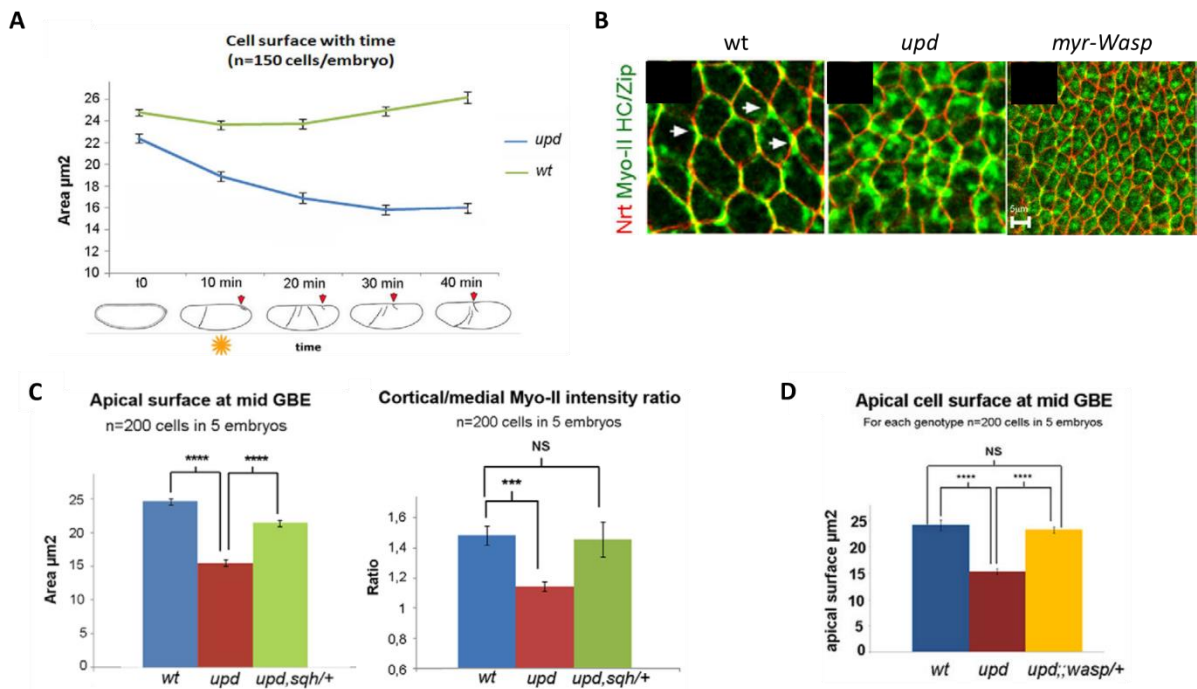


Figure 8. La voie de signalisation JAK/STAT régule négativement la Myosine via Wasp dans les cellules de l'ectoderme latéral. **A)** Quantification des aires apicales en fonction du temps sur des embryons contrôles (wt, en vert) et mutants pour *upd* (*upd*, en bleu). L'intercalation cellulaire commence au t=10 (astérisque orange). Les schémas sous le graphique indiquent l'élongation de la bandelette germinative à chaque temps (flèches rouges). **B)** Images des embryons contrôles (wt), mutants pour *upd* et des cellules surexprimant spécifiquement une protéine Wasp qui reste à la membrane, marqués pour la Myosine (en vert) et pour la protéine de membrane Neurotactine (Nrt, en rouge). La Myosine s'accumule dans la région médio-apicale pour ces deux derniers contextes génétiques. **C)** Quantifications de l'aire apicale (à gauche) et du taux de l'intensité corticale/médiale de la Myosine (à droite) pour les génotypes indiqués en dessous de chaque barre. La diminution de l'expression de la Myosine (des embryons mutants *sqh/+*) dans un contexte mutant pour *upd* restaure le taux cortico-médial de Myosine et prévient la réduction de l'aire apicale observée dans les mutants *upd*. **D)** Quantification des aires apicales pour les génotypes indiqués en dessous de chaque barre. La diminution de l'expression de *wasp* (des embryons mutants *wasp/+*) dans un contexte mutant pour *upd* restaure la réduction de l'aire apicale observée dans les mutants *upd*. D'après Bertet et al., 2009.

l'endocytose de la E-Cadhérine. L'intégration de ces mécanismes conduit à la génération de forces mécaniques qui finalement provoquent le changement de la forme et les réarrangements des cellules de l'ectoderme latéral.

b. La voie de signalisation JAK/STAT régule ce mécanisme

Un autre morphogène requis pour effectuer des mouvements cellulaires via le réseau d'acto-myosine est le morphogène Unpaired (Upd), le ligand de la voie de signalisation JAK/STAT. Upd est nécessaire au processus d'extension de la bandelette germinative. Dans des embryons mutants pour *upd*, les cellules de l'ectoderme latéral présentent des défauts de réarrangements cellulaires (intercalation) et exhibent une réduction progressive de leur aire apicale au cours du temps (Figure 8A) (Bertet et al., 2009). Des expériences d'ablation laser sur ces mutants ont indiqué qu'une accumulation apico-médiale ectopique de la Myosine conduisait à une constriction apicale de ces cellules, ce qui suggère que la voie JAK/STAT régulerait la localisation de la myosine afin d'inhiber la constriction apicale (Figure 8B). Des interactions génétiques entre *sqh* et *upd* ont également révélé que JAK/STAT contrôlait négativement la localisation apico-médiale de la Myosine pour que les cellules de l'ectoderme latéral ne contractent pas leur domaine apical et puissent donc s'intercaler (Figure 8C). Cette régulation de JAK/STAT sur *Sqh* est indépendante de son activation par Rok. Il semblerait que JAK/STAT contrôle la GBE via le régulateur d'Actine Wasp (Bertet et al., 2009). En effet, l'expression d'une forme constitutivement active de Wasp produit le même phénotype que l'absence d'*upd* dans les cellules de l'ectoderme latéral (Figure 8B). De plus, en absence de JAK/STAT, Wasp est recrutée apicalement au niveau du cortex (région périphérique entre la région médiale et les jonctions). En réalisant des RT-PCR et en utilisant des doubles mutants *wasp* et *upd*, les auteurs ont révélé que JAK/STAT contrôlait négativement Wasp au niveau post-transcriptionnel, mais le mécanisme de cette régulation reste encore inconnu. Dans ces mutants, l'absence de *wasp* conduit à une diminution de la Myosine apico-médiale et par conséquent à une inhibition de la constriction apicale des cellules par rapport aux mutants *upd* (Figure 8D), cependant les réarrangements cellulaires restent défectueux

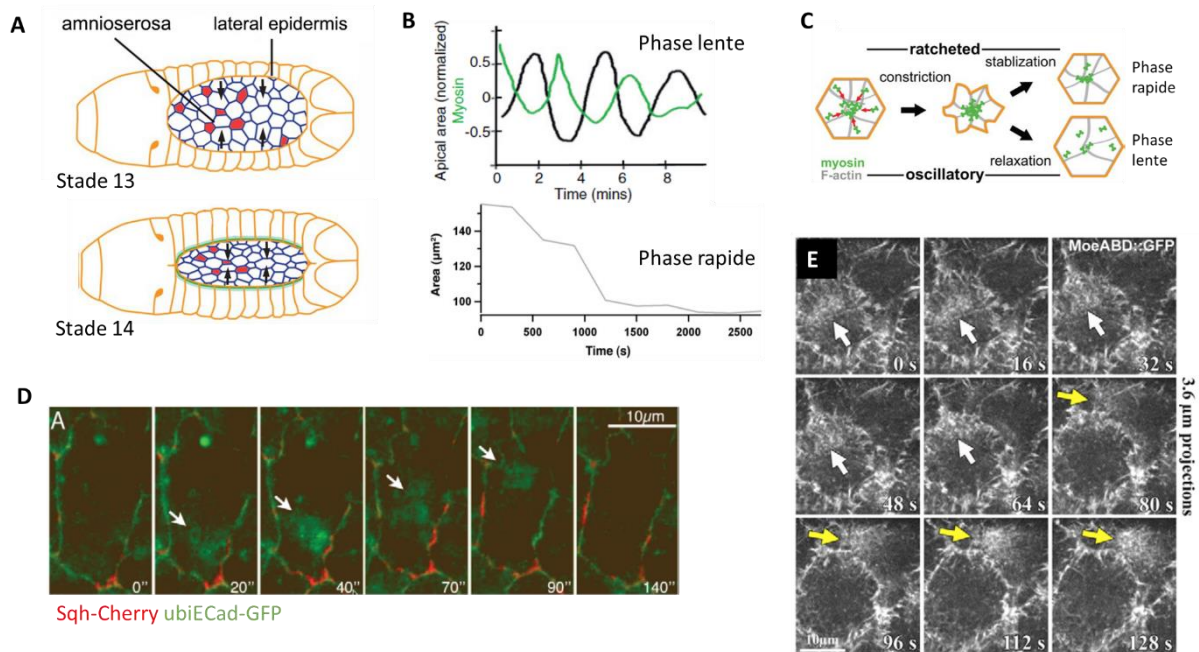


Figure 9. Morphogenèse pendant la fermeture dorsale chez l'embryon de drosophile. A) illustration de l'embryon de drosophile aux stade 13 et 14 en vue dorsale représentant le mouvement qui conduit à la fermeture dorsale. Les cellules de l'amnioséreuse (AS) subissent des constrictions apicales et finissent par être extrudées basalement à l'intérieur de l'embryon. Les cellules de l'épiderme latéral forment un câble supracellulaire de Myosine qui contribue au processus de la fermeture dorsale. **B)** En haut, quantifications de l'aire du domaine apical (noir) et de l'intensité de la Myosine (vert) en fonction du temps pendant la phase lente du processus. Des fluctuations dans les aires apicales corrént négativement avec les fluctuations de l'intensité de Myosine. En bas, quantifications de l'aire apicale au cours du temps pendant la phase rapide du processus. L'aire apicale diminue progressivement dans cette phase. **C)** Modèle représentant la forme des cellules et les molécules d'acto-myosine qui interviennent pendant la fermeture dorsale. Tandis que durant la phase lente les cellules contractent et relâchent leur surface apicale, elles se contractent et stabilisent la réduction de l'aire générée dans la nouvelle contraction durant la phase rapide. **D)** Localisation de Cadherine (ubiECad :GFP) et de Myosine (Sqh-Cherry) au niveau du domaine apical d'une cellule de l'AS montrant une contraction (0-90 secondes) et une relaxation (90-140 seconds) pendant la phase lente de la fermeture dorsale. **E)** Images en temps réel des cellules de l'AS exprimant une protéine fusion MoeABD::GFP pour visualiser l'actine. Le désassemblage dans une cellule (flèches blanches) est suivi par l'assemblage dans une cellule voisine (flèches jaunes). D'après Blanchard et al., 2010; David et al., 2010; Gorfinkiel and Blanchard, 2011; Vasquez and Martin, 2016.

(Bertet et al., 2009). Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes impliqués également dans ces mouvements cellulaires.

3. La fermeture dorsale

a. Les bases moléculaires et cellulaires du processus

La fermeture dorsale est un processus morphogénétique qui se déroule entre les stades 13 et 15 de l'embryon de drosophile (Figure 9A). Pendant une période de 2-3 heures, un tissu épithélial appelé l'amnioséreuse (AS) se contracte et disparaît de la surface dorsale de l'embryon. Toutes les cellules de l'AS finissent par être extrudées basalement et par être phagocytées par des hémocytes à l'intérieur de l'embryon. La contraction et donc l'extrusion des cellules se fait de façon concomitante à leur recouvrement par la rangée la plus dorsale des cellules de l'épiderme latéral. L'AS est un épithélium simple composé d'environ 200 cellules de forme polygonales. Pendant la fermeture dorsale, ces cellules changent leur surface apicale en deux phases (Figure 9B). Une phase lente au cours de laquelle elles fluctuent (émettent des pulsations) en de longs cycles sans générer de contractions apicales nettes (Figure 9B-D). Puis, une phase rapide au cours de laquelle elles subissent une perte progressive de l'aire apicale sans présenter cette fois de pulsations (Figure 9B, C), ceci étant couplé avec le mouvement de recouvrement par la première rangée de cellules de l'épiderme latéral (Blanchard et al., 2010; Gorfinkiel et al., 2009).

En utilisant des protéines de fusion des JA et du réseau d'acto-myosine couplées à différentes protéines fluorescentes en microscopie en temps réel, il a été révélé que les pulsations des aires étaient dues à des concentrations fluctuantes du réseau d'acto-myosine dans ce domaine tandis que les constriction apicales des cellules de l'AS étaient dues à des concentrations permanentes de ces protéines (Figure 9D) (Sokolow et al., 2012; Solon et al., 2009). L'expression de protéines de fusion Moésine:GFP et Myosine:mCherry a permis de suivre le comportement *in vivo* de l'Actine et de la Myosine respectivement dans les cellules de l'AS, au cours des deux phases de la fermeture dorsale. Ces deux

protéines sont localisées au niveau des JA formant une ceinture ainsi que dans la région apico-médiale de ces cellules.

Pendant la phase lente de la fermeture dorsale, l'Actine et la Myosine effectuent des pulsations dans le domaine apico-médial. Notamment, elles s'accumulent en *spots* médiaux qui s'agrègent et se désagrègent dans le temps et l'espace (Blanchard et al., 2010; David et al., 2010). Il a été observé qu'une fois l'assemblage et désassemblage de l'Actine terminé dans une cellule, un nouveau cycle d'assemblage et désassemblage commençait dans une des cellules voisines. En général, il s'effectue sur la cellule localisée du côté où le désassemblage précédent vient de s'achever (Figure 9E) (David et al., 2010). Des analyses des taux de déformations cellulaires ont indiqué que la plupart du temps les changements de la forme cellulaire se réalisaient de façon anisotrope dans ces cellules (Blanchard et al., 2010). Durant cette phase, les cellules de l'AS fluctuent avec de grandes amplitudes (6-7% du radio de la cellule) et de long cycles (3 minutes par cycle) (Solon et al., 2009) et les fluctuations de l'intensité de la Myosine ne conduisent pas à une diminution progressive de l'aire apicale.

Ces fluctuations s'arrêtent lorsque les cellules rentrent dans la phase rapide de la fermeture dorsale (Blanchard et al., 2010). Au fur et à mesure que ce processus morphogénétique avance, la Myosine s'accumule progressivement dans toute la surface apicale des cellules de l'AS (régions jonctionnelle, corticale et médiale), augmentant leur contractilité et diminuant leurs aires apicales. Cette diminution se fait de façon symétrique et ne conduit pas à un échange de voisins (Meghana et al., 2011). Durant cette phase, les membranes cellulaires passent d'une forme ondulée à une forme très droite en conséquence de l'accumulation jonctionnelle de la Myosine. Ceci indique une augmentation de la tension dans le tissu (Blanchard et al., 2010). Une constriction apicale permanente entraîne la délamination de la cellule ((Sokolow et al., 2012)). Cette délamination se fait par apoptose et est stochastique, tout en étant plus fréquente à l'extrémité antérieure du tissu (Muliylil et al., 2011; Toyama et al., 2008).

L'expression de formes constitutivement actives du régulateur de l'Actine Dia ou de la Myosine dans les cellules de l'AS en utilisant le système UAS/Gal4, produit des constriction prématurées de ces cellules (Blanchard et al., 2010). En effet, leurs surfaces apicales sont plus petites, plus régulières et leurs fluctuations sont presque inexistantes. De plus, lorsque les cellules de l'AS expriment un dominant négatif de Rho1 (le régulateur de Rok et de Dia), leurs mouvements deviennent moindres et le tissu finit par se déchirer (Blanchard et al., 2010). Ces résultats mettent en évidence que les changements de la forme des cellules de l'AS au cours de la fermeture dorsale sont bien une conséquence de la localisation et de l'activité des molécules d'acto-myosine dans le domaine apical, et qu'il existe également un rôle mécanique qui génère une tension intra- et intercellulaire dans l'AS nécessaire au processus de fermeture dorsale.

D'autres mécanismes contribuent à la génération de forces dans ce tissu. Les cellules les plus dorsales de l'épiderme latéral accumulent de l'Actine et de la Myosine depuis le début de la fermeture dorsale pour former un anneau contractile au niveau des JA. Ce câble d'acto-myosine génère aussi des forces mécaniques qui sont requises pour la migration de l'épiderme vers la ligne médiale dorsale. Enfin, si le taux d'apoptose des cellules de l'AS est inhibé ou augmenté, la vitesse à laquelle le processus est effectué diminue ou s'accélère respectivement (Sokolow et al., 2012; Teng and Toyama, 2011; Toyama et al., 2008), ce qui montre que l'apoptose des cellules de l'AS contribue également à générer des forces mécaniques nécessaires à la fermeture dorsale (environ un tiers des forces générées). Ainsi, le processus de fermeture dorsale doit intégrer des forces mécaniques intra- et intercellulaires provenant des cellules de l'AS avec des forces générées par les cellules de l'épiderme latéral.

b. La voie de signalisation Dpp régule ce mécanisme

La voie de signalisation Decapentaplegic (Dpp) orchestre le processus de la fermeture dorsale de façon autonome et non-autonome cellulaire. Le gène *hemipterous* (*hep*) codant pour la protéine Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) contrôle l'expression de *dpp* dans les cellules les plus dorsales

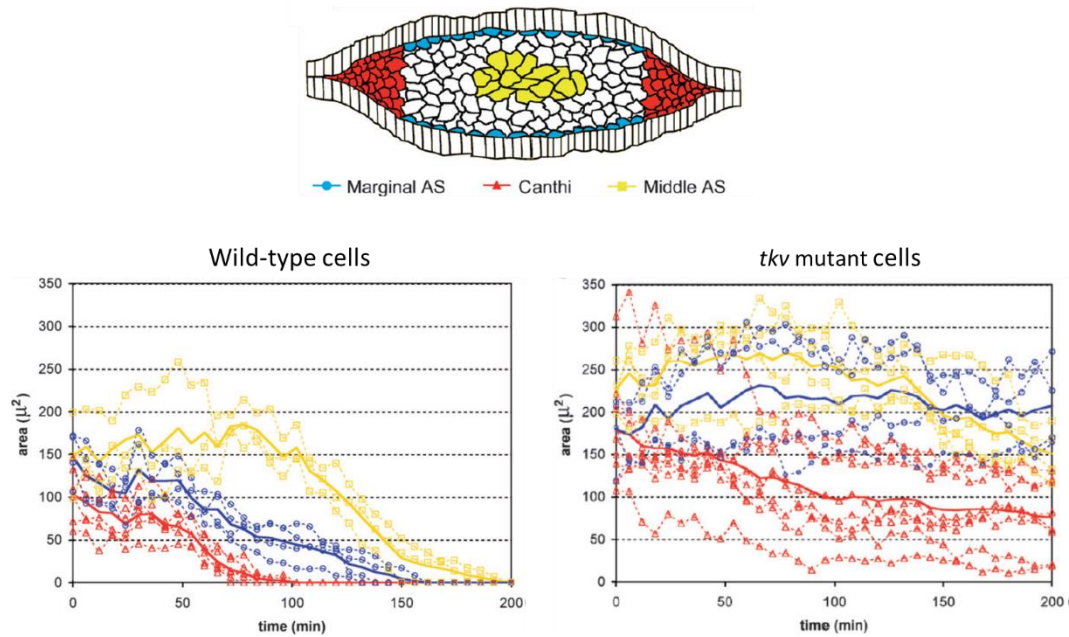


Figure 10. La voie de signalisation Decapentaplegic (Dpp) régule le processus de la fermeture dorsale. L'aire apicale de trois différentes populations cellulaires de l'AS (des cellules bleues en marge, des cellules rouges aux extrêmes du tissu ou canthi et des cellules jaunes au centre du tissu) a été mesurée au cours du temps pour des cellules contrôles (wild-type) et des cellules mutantes pour le gène *thick veins* (*tkv*), un activateur de la voie Dpp. L'aire des différentes populations des cellules fluctue pendant les 50 premières minutes de la fermeture dorsale et commence ensuite à réduire progressivement (en bas à gauche). Cette réduction de l'aire apicale est inhibée pour les cellules mutantes *tkv* (en bas à droite). D'après Fernández et al., 2007.

de l'épiderme latéral permettant les mouvements de ces cellules vers la ligne médiale dorsale pendant la fermeture dorsale (Glise and Noselli, 1997). Il a été montré que dans des embryons mutants pour des composants de la voie Dpp, les cellules de l'AS fluctuaient normalement mais ne se contractaient pas, de telle façon qu'elles ne pouvaient pas réduire leur surface apicale et donc le tissu finissait par se fragiliser et se déchirer (Figure 10) (Fernández et al., 2007). Dpp joue également un rôle non-autonome cellulaire sur les cellules de l'AS pour la transition entre la phase lente et rapide du processus ou pour stabiliser ou maintenir un état contractile des cellules de l'AS, générant ainsi une tension dans tout le tissu. Cependant, les mécanismes par lesquels Dpp contrôle la Myosine apico-médiale des cellules de l'AS restent encore inconnus.

Ces trois exemples de processus morphogénétiques au cours du développement embryonnaire de la drosophile mettent en évidence la plasticité des cellules épithéliales pour changer de forme en fonction de la dynamique de mêmes acteurs moléculaires tels que la Myosine, l'Actine et la E-Cadhérine. Mais si ces mêmes acteurs sont impliqués dans la morphogénèse de ces différents tissus épithéliaux, nous avons vu que leur dynamique (des flux et des accumulations apico-médiale de myosine) peut générer différentes réponses cellulaires (des oscillations, des raccourcissements de jonctions, des constriction apicales) et pouvait être régulée par différentes voies de signalisation. Il est donc important de caractériser les relations entre les protéines formant ces réseaux dans chaque processus morphogénétique afin de mettre en évidence tant les points communs que les particularités propres à chaque tissu.

III. L'extrusion des cellules épithéliales requiert l'activité du réseau d'acto-myosine

Pendant la morphogénèse d'un organe ou pour assurer le maintien d'un tissu épithélial adulte, les cellules changent de taille, de forme, de position et de nombre. Le changement du nombre de cellules est la résultante de la prolifération et de la mort cellulaire, tandis qu'un équilibre entre ces deux processus est nécessaire pour atteindre l'homéostasie d'un tissu avec un nombre stable de cellules.

L'élimination des cellules épithéliales se fait par un processus appelé « l'extrusion cellulaire » qui doit être finement régulé dans le temps et l'espace afin de maintenir l'intégrité du tissu pour qu'il puisse effectuer sa fonction de barrière. De plus, l'extrusion des cellules épithéliales entraîne des changements de forme dans la cellule qui va être éliminée ainsi que dans ses cellules voisines, impliquant également le réseau d'acto-myosine et leurs connections avec les JA.

A. L'homéostasie et l'apoptose dans le développement

Le terme homéostasie qui provient du grec *hómoios* « similaire », et *stásis*, « stade, stabilité » correspond à un état d'équilibre dynamique par lequel les êtres vivants maintiennent une condition interne stable face à un environnement externe changeant. Ceci se fait grâce aux échanges de matière et d'énergie entre ces deux compartiments. Des mécanismes de régulation doivent ainsi se mettre en place afin de rétablir l'équilibre interne chaque fois que celui-ci est altéré. Si cette régulation est perturbée, l'instabilité règnera dans le milieu interne et les réponses du système dépendront de la sévérité de déséquilibre généré. Par conséquent, la mort cellulaire doit être un processus impeccablement régulé au cours du développement afin d'assurer la bonne formation de l'organisme. Mais l'homéostasie joue également un rôle crucial chez l'adulte puisque des défauts dans le taux de mort cellulaire peuvent générer des pathologies telles des maladies dégénératives ou auto-immunes (Favaloro et al., 2012).

La mort cellulaire programmée ou « apoptose » est un processus génétiquement contrôlé dans lequel les cellules induisent leur propre mort. Elle peut être déclenchée soit par des stimuli externes (voie extrinsèque), dans le cas notamment d'élimination normale de cellules qui sont produites en surnombre, soit par des stimuli internes (voie intrinsèque) lorsqu'il s'agit de cellules qui présentent des dégâts génétiques ou qui n'ont pas été bien développées (Flusberg and Sorger, 2015). Par opposition à d'autres types de mort cellulaire, l'apoptose est un processus physiologique qui contribue à la formation et au maintien des tissus.

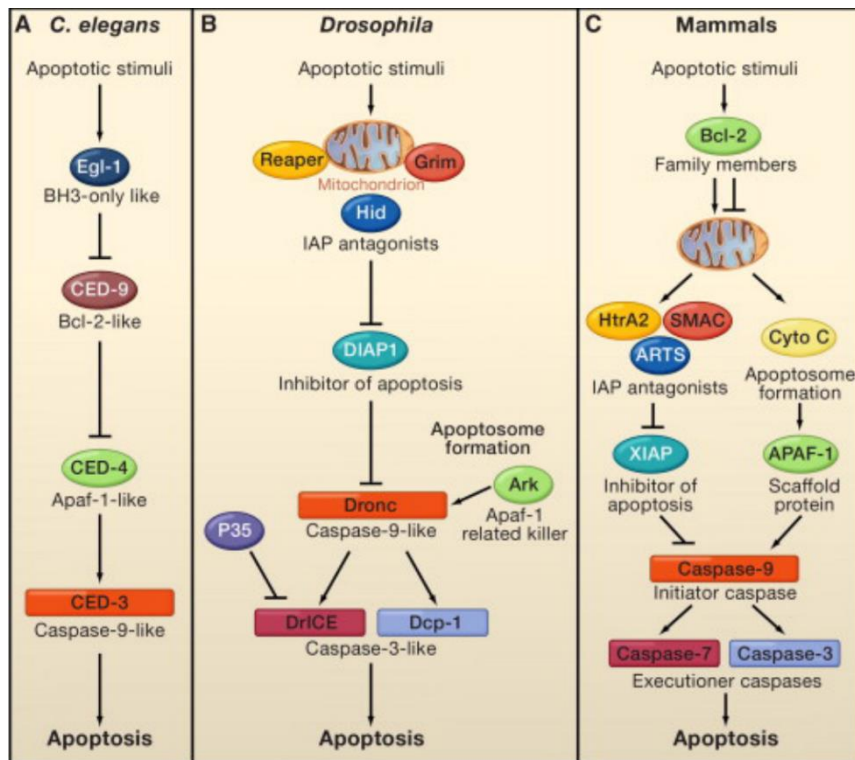


Figure 11. Conservation évolutive et composants de la machinerie apoptotique. La comparaison des voies apoptotiques entre *C. elegans*, *Drosophila* et les Mammifères révèle une forte conservation des gènes impliqués. La machinerie fait intervenir l'activation d'un facteur pro-apoptotique qui va se lier aux « Inhibitors of Apoptosis Proteins » (IAP), afin de déstabiliser le complexe IAP-Caspases. Une fois les caspases activées, elles commencent le clivage de protéines vitales, ce qui aboutit à la mort de la cellule. D'après Fuchs and Steller, 2011.

Au cours du développement, l'apoptose peut éliminer des cellules d'un tissu selon plusieurs modalités. Dans les processus de mort cellulaire morphogénétique, l'apoptose agit comme un sculpteur afin de plier, creuser ou fusionner des tissus, comme c'est le cas par exemple pour la séparation des doigts par l'élimination des cellules interdigitales chez les vertébrés supérieurs (Zou and Niswander, 1996). L'apoptose phylogénétique sert à éliminer des cellules ou des structures qui ont été héritées d'un ancêtre mais qui ne sont pas requise chez l'organisme adulte, comme c'est le cas pour l'élimination de la queue des têtards au cours de la métamorphose (Ishizuya-Oka et al., 2010) ou pour la différenciation des organes génitaux chez l'homme. La mort cellulaire histogénétique, quant à elle, sert à éliminer des cellules pour atteindre le nombre désiré, comme par exemple lors de l'élimination des neurones pendant le développement du système nerveux central et périphérique chez la souris (Yamaguchi and Miura, 2015) ou pour le contrôle du nombre de cellules inter-ommatidiales dans l'œil de la drosophile (Brachmann and Cagan, 2003). Plus récemment, il a été identifié que les cellules qui meurent pouvaient promouvoir le remodelage et le mouvement des cellules et/ou des tissus par la génération de forces mécaniques. Ce processus est de plus en plus étudié grâce à la microscopie en temps réel et permet de révéler l'impact de cette apoptose sur les cellules voisines dont voici quelques exemples: la rotation des organes génitaux chez le mâle de la drosophile (Suzanne et al., 2010), la fermeture du tube neural chez les vertébrés (Yamaguchi et al., 2011), la formation de plis pendant le développement de la patte chez la drosophile (Monier et al., 2015) et la fermeture dorsale chez la drosophile également (Toyama et al., 2008).

1. La cascade canonique de l'apoptose

L'apoptose repose sur l'activation d'un groupe de protéases de cystéines appelées les Caspases qui induisent des clivages protéolytiques de protéines cibles (Moffitt et al., 2010). Les Caspases sont maintenues inactives dans la plupart des cellules par des interactions directes au sein de complexes comprenant des inhibiteurs (Inhibitors of Apoptosis Protein, IAP) (Figure 11). Au cours du développement, des signaux pro-apoptotiques stimulent l'expression ou l'activité de régulateurs de

la famille Reaper/Hid/Grim (RHG cluster) - Smac/Diablo qui déclenchent l'apoptose dans des cellules bien précises. En interagissant physiquement avec les IAP, les protéines RHG-Smac/Diablo déstabilisent les liaisons IAP-Caspases (Leulier et al., 2006), induisant la dégradation des IAP. Cette cascade est décrite comme étant la voie canonique de l'apoptose et les gènes codant les acteurs de cette cascade (RHG, IAP, Caspases) sont très conservés chez les animaux (Figure 11) (Meier et al., 2000).

L'activité des Caspases conduit au démantèlement des cellules par le clivage des composants du cytosquelette et des JA. Des liens étroits existent entre l'apoptose et l'adhésion cellulaire. Par exemple, chez des embryons de drosophile mutants pour le gène *thread (th)* (le gène qui code la protéine IAP chez la drosophile, Diap1), l'expression de deux composants des JA (E-Cadhérine et β -Caténine) est fortement réduite, provoquant un changement dans la forme des cellules épidermiques et conduisant finalement à l'effondrement de l'épithélium. Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont conduit à l'identification des sites de coupure des Caspases sur la β -Caténine et ont permis de conclure que les protéines des JA sont en effet des substrats des Caspases (Kessler and Müller, 2009). Dans ces conditions expérimentales, la perte d'adhésion suivie de l'effondrement de l'épithélium sont donc des conséquences de l'activité des Caspases. Inversement, une perte d'adhésion cellulaire ou de polarité peut entraîner l'activation des Caspases et conduire à la mort cellulaire. C'est le cas de la perte de fonction de *crumbs* qui induit l'apoptose des cellules de l'épithélium épidermique de l'embryon de drosophile et donc l'effondrement du tissu. Cette perte de fonction active la transcription du gène pro-apoptotique *reaper* de façon dépendante de l'activité de la voie de stress carboxy-terminal JUN kinase (JNK) (Kolahgar et al., 2011). Ainsi la mort cellulaire peut être une cause ou une conséquence des changements de la forme des cellules épithéliales.

2. Les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose

Les voies de signalisation qui régulent l'apoptose pendant le développement sont multiples (Arya and White, 2015). Quelques-unes de ces voies, selon le contexte de la cellule, peuvent influencer

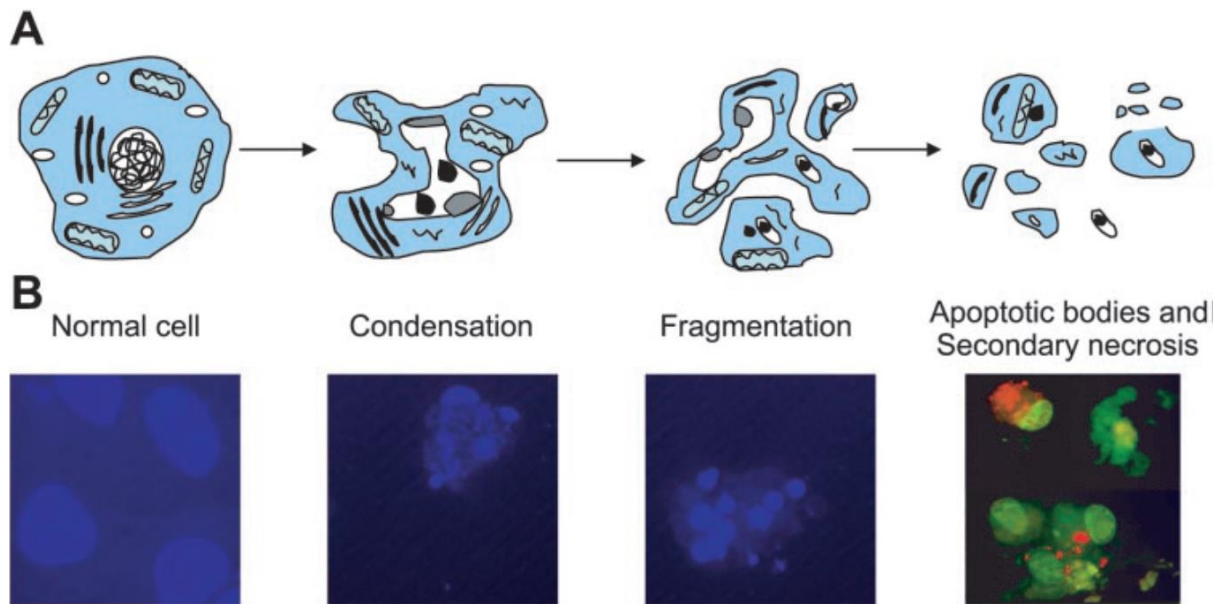


Figure 12. Changements morphologiques qui ont lieu pendant la mort des cellules isolées ou en culture. A) Schémas montrant la condensation, la fragmentation et les corps apoptotiques générés par la mort cellulaire. *In vivo* les corps apoptotiques sont phagocytés par les cellules voisines tandis que *in vitro* ils réduisent en taille et subissent une lyse ou nécrose secondaire. **B)** Des images de cellules LLC-PK1 subissant les différents changements morphologiques indiqués en A. L'apoptose a été induite dans ces cellules en utilisant la drogue cisplatine. Les cellules des trois premières images sont marquées par le DAPI (noyaux) et celles de la dernière image par l'acridine orange (cellules apoptotiques) et le bromure d'éthidium (ADN). Les cellules viables apparaissent en vert, celles en apoptose avec une membrane encore intacte en jaune et celles à des stades plus tardifs de l'apoptose en orange ou rouge dû à l'entrée du bromure d'éthidium. *D'après Padanilam, 2003.*

l'apoptose positivement ou négativement telles que Notch, Akt et Wnt/Wg. Par exemple, dans les neurones du lobe optique chez la drosophile, l'activité du cluster RGH (*reaper*, *hid* et *grim*) est dépendant de la présence ou de l'absence de Notch, ce qui conduit à la mort ou à la survie des cellules respectivement (Bertet et al., 2014). D'autres voies de signalisation agissent comme des régulateurs positifs de la mort programmée, comme Fat/Hippo qui permet l'activation du gène *hid* régulant négativement Yorkie (Yki) dans les cellules de la rétine chez la drosophile (Huang et al., 2005). D'autres voies encore agissent comme des régulateurs négatifs de l'apoptose. C'est le cas de la voie PI3K dépendante de l'insuline qui doit être inhibée pour permettre l'activation du cluster RGH et conduire finalement à l'apoptose des cellules souches du corps pédonculé pendant la neurogenèse de la drosophile adulte (Siegrist et al., 2010). L'activation de la cascade apoptotique est donc un mécanisme clé dans lequel plusieurs voies de signalisation convergent pour réguler le développement de façon spatio-temporelle.

3. Les changements morphologiques des cellules apoptotiques

L'étude des conséquences de l'induction de l'apoptose (ex. par irradiations aux UV) dans des modèles de cellules circulantes (ex. lymphocytes) en culture a permis la caractérisation de plusieurs des changements morphologiques que subissent les cellules apoptotiques (Figure 12) (Bottone et al., 2013; Elmore, 2007; Saraste and Pulkki, 2000). Ces cellules présentent la formation des protrusions de la membrane (appelés «blebs»), une diminution de leur volume, la phosphatidylsérine est exposée sur le feuillet externe de leur membrane plasmique comme un signal pour être phagocytée, le cytoplasme et les organites se condensent, les mitochondries libèrent des facteurs qui promouvront la mort cellulaire, les noyaux se désintègrent, l'ADN se condense, et les cellules finissent par être désintégrées en formant des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont finalement internalisés et dégradés par des phagocytes environnants. Mais, qu'en est-il de l'élimination par apoptose d'une cellule lorsqu'elle se trouve au sein d'un tissu épithélial ?

B. Les mécanismes connus pour l'extrusion des cellules épithéliales

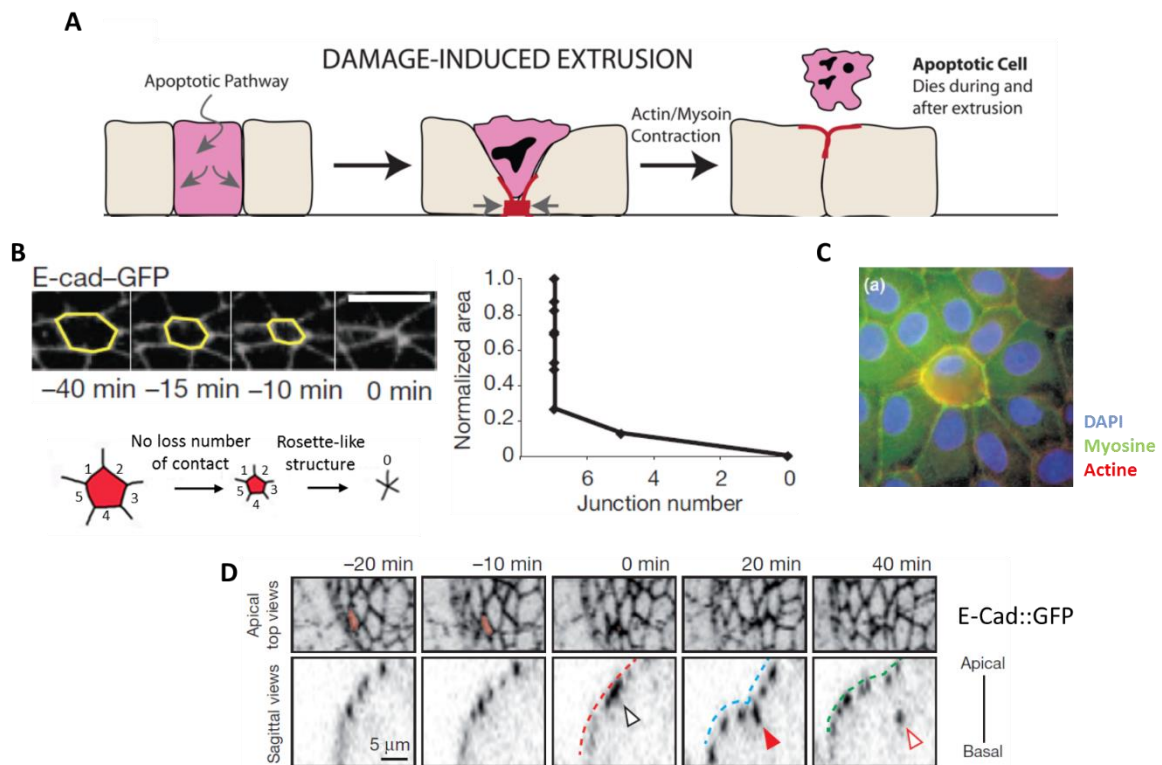


Figure 13. Extrusion des cellules apoptotiques. **A)** Illustration de trois cellules épithéliales dont une (cellule rose) reçoit des signaux apoptotiques déclenchant son processus d'extrusion cellulaire. Au cours de l'apoptose, cette cellule accumule basalement de l'Actine et de la Myosine et est finalement extrudée apicalement. **B)** En haut à gauche ; images en temps réel du marquage E-Cadhérine (E-cad-GFP) montrant la réduction de la surface apicale d'une cellule apoptotique (trait jaune) dans le tissu du notum chez la drosophile. La réduction de son aire se fait de façon symétrique, le nombre de contacts avec les cellules voisines étant maintenu, ce qui conduit à la formation de structures en rosette (schéma du bas). A droite ; quantification de l'aire apicale de la cellule apoptotique montrée à gauche en fonction de son nombre de jonctions. Le nombre de jonctions commence à être réduit lorsque la cellule a diminué cinq fois son aire initiale. **C)** Image de cellules MDCK en culture montrant une cellule apoptotique identifiée par le petit noyau révélé par le marquage DAPI (bleu). Cette cellule accumule la Myosine (vert) et l'Actine (rouge) en forme d'anneau au niveau de ses jonctions. La formation de l'anneau d'acto-myosine indique que la cellule est dans la première phase du processus d'extrusion cellulaire. **D)** Images en temps réel de cellules épithéliales exprimant la E-Cadhérine (E-Cad::GFP) pendant la morphogénèse de la patte de la drosophile. En haut une vue apicale et en bas une vue sagittale du tissu. En haut, une cellule apoptotique réduit sa surface apicale progressivement (orange) jusqu'à l'effondrement au collapse de ce domaine $t=0$. D'après Eisenhoffer et al., 2012; Gu et al., 2011a; Marinari et al., 2012; Monier et al., 2015; Rosenblatt et al., 2001.

L'élimination des cellules épithéliales se fait par extrusion cellulaire et implique activement les cellules voisines (Rosenblatt et al., 2001). L'extrusion cellulaire peut avoir lieu soit par le domaine apical, dirigeant ainsi la cellule extrudée vers le lumen de l'épithélium, soit par le domaine basal, ce qui dirige alors la cellule vers le tissu sous-jacent. Chez les vertébrés et la drosophile, les deux orientations d'extrusion ont été décrites, bien que l'extrusion apicale soit plus fréquente chez les premiers, tandis que l'extrusion basale se retrouve principalement chez la deuxième (Gudipaty and Rosenblatt, 2016). Deux types d'extrusion cellulaire ont été identifiés à ce jour : une extrusion des cellules apoptotiques et une extrusion des cellules vivantes.

Dans l'extrusion des cellules apoptotiques, l'extrusion de cellules est une conséquence de leur état apoptotique. Un stimulus apoptotique est le signal qui déclenche cette mort cellulaire (Figure 13A). Dans l'extrusion des cellules vivantes, les cellules sont encore vivantes lorsqu'elles sont extrudées et une contrainte mécanique générée par la surpopulation est à l'origine de cette extrusion (Figure 14A). Dans ce dernier type d'extrusion, le côté par lequel les cellules quittent l'épithélium est crucial pour déterminer leur destin. Si l'extrusion est apicale, ces cellules meurent en absence de signaux trophiques car le lumen des épithéliums de recouvrement est une cavité creuse. En revanche, si elles sont extrudées basalement, elles peuvent être phagocytées par des macrophages ou bien migrer et envahir d'autres tissus (Gudipaty and Rosenblatt, 2016).

Des études *in vivo* et *in vitro* faites sur des cellules où l'apoptose était physiologique ou induite ou faites sur des tissus surpeuplés ont permis d'identifier que les deux types d'extrusion s'effectuaient en deux phases (Gudipaty and Rosenblatt, 2016; Kuipers et al., 2014; Marinari et al., 2012; Rosenblatt et al., 2001). Une première phase dans laquelle il y a la formation d'un anneau circonférentiel d'acto-myosine dans les cellules à être extrudées (Figure 13C et 14C) suivi par une deuxième phase dans laquelle l'anneau d'acto-myosine est formé dans le domaine latérale des cellules voisines.

Les premiers évènements morphologiques des extrusions des cellules vivantes ou apoptotiques ont été décrits chez la drosophile et correspondent donc au remodelage du domaine apical car les cellules

sont extrudées majoritairement par le domaine basal. Marinari et al., 2012 ont montré que pendant le développement du notum, les cellules vivantes et les cellules apoptotiques à être extrudées remodelent leur domaine apical de façon différente. Tandis que dans l'extrusion des cellules vivantes, la cellule à être extrudée réduit progressivement son nombre de jonctions impliquant un changement de ses voisins (Figure 14B), dans l'extrusion apoptotique, les jonctions de cette cellule diminuent leur longueur de façon symétrique mais sans changer en nombre (Figure 13B). Ces différents types de remodelage conduisent à la diminution de l'aire du domaine apical. Ils ont également observé que quand le domaine apical de la cellule à être extrudée est diminué d'environ 25% par rapport à son aire initiale, le cytosquelette d'acto-myosine s'accumule apicalement de façon circonférentielle et génère la force contractile pour fermer ce domaine et donc détacher la cellule constituant ainsi la première phase de l'extrusion (Figure 13C et 14C). Cet anneau est aussi observé dans les cellules à être extrudées chez les vertébrés (Gu et al., 2011a; Gudipaty and Rosenblatt, 2016; Kuipers et al., 2014; Slattum et al., 2009). De cette façon, si l'extrusion est apicale, cet anneau d'acto-myosine est formé dans le domaine basal de la cellule tandis que si l'extrusion est basale, il est formé apicalement. Le rôle autonome cellulaire de cet anneau d'acto-myosine a été établi par des études d'inhibition de Myosine ou de ses régulateurs chez les vertébrés (Gu et al., 2011a; Kuipers et al., 2014; Slattum et al., 2009) ainsi que par l'expression stable de deux transgènes d'Actine fusionnés à différents gènes codant des protéines fluorescentes dans des cellules en culture MDCK (Kuipers et al., 2014). Cette phase de remodelage apical et contraction de l'anneau d'acto-myosine a une durée de 40-50 minutes (Kuipers et al., 2014, Marinari et al 2012)

Par ailleurs, la réduction de la surface apicale au cours de l'élimination des cellules épithéliales peut se faire par un autre mécanisme comme il a été mis en évidence lors de la morphogenèse de la patte chez la drosophile et de façon ectopique dans d'autres tissus (Figure 13D) (Monier et al., 2015). Il a été montré qu'un câble apico-basal de Myosine, mis en place par l'activité des Caspases, conduisait à des changements de forme de la cellule apoptotique (réduction du domaine apical et élongation) puis

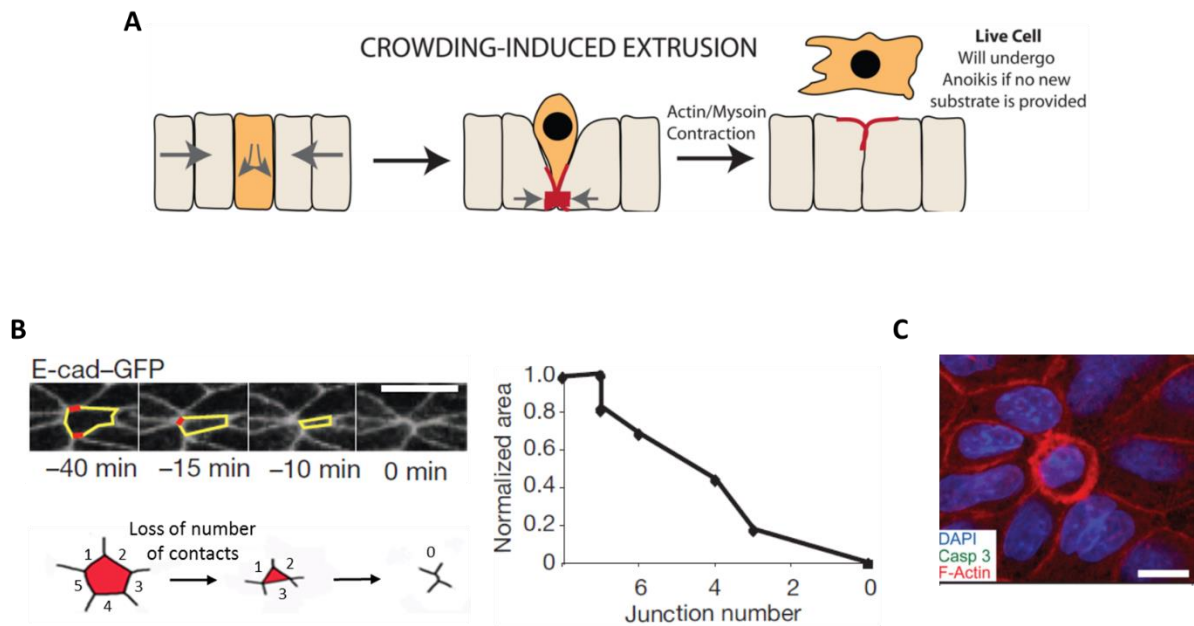


Figure 14. Extrusion des cellules vivantes. **A)** Illustration de cellules épithéliales sous l'influence de forces mécaniques (flèches grises) générées par la surpopulation du tissu. Ces forces déclenchent le processus d'extrusion cellulaire dans une de ces cellules (cellule orange). Cette cellule accumule basalement de l'Actine et de la Myosine et est finalement extrudée apicalement encore vivante. **B)** En haut à gauche, images en temps réel du marquage E-Cadhérine (E-cad-GFP) montrant la réduction de la surface apicale d'une cellule qui va être extrudée lorsqu'elle est encore vivante (trait jaune) dans le tissu du notum chez la drosophile. La réduction de son aire se fait de façon asymétrique, accompagnée d'un changement du nombre de contacts avec les cellules voisines (traits rouges) au cours du temps (schéma du bas). A droite, un graphique montrant la quantification de l'aire apicale de la cellule montrée à gauche en fonction de son nombre de jonctions. L'aire de la surface apicale diminue avec la réduction du nombre de jonctions. **C)** Image de cellules MDCK en culture avec leurs noyaux identifiés par le DAPI (en bleu). Dans une de ces cellules, la F-Actine (en rouge) est accumulée en forme d'anneau au niveau de ses jonctions. La formation de l'anneau d'acto-myosine indique que la cellule est dans la première phase du processus d'extrusion cellulaire. Cette cellule n'est pas marquée par l'anticorps anti-Caspase (en vert) indiquant qu'elle est encore vivante. *D'après Eisenhoffer et al., 2012; Marinari et al., 2012.*

de ses cellules voisines, via l'accumulation de Myosine dans leurs JA par des signaux encore inconnus. Dans tous les cas, cette première phase d'extrusion cellulaire s'achève avec le détachement apical de la cellule et dure entre 15 et 30 minutes.

Dans la deuxième phase de l'extrusion des cellules épithéliales, un anneau d'acto-myosine se forme cette fois dans le domaine latéral des cellules voisines en contact avec les cellules à être extrudées et il est nécessaire pour générer la force pour l'extrusion. La perturbation de l'actine ou de la myosine dans les cellules voisines conduit à une inhibition de l'extrusion des cellules. Par exemple dans l'extrusion d'une cellule apoptotique, lorsqu'elle meurt, des espaces sont créés et la fonction de barrière de l'épithélium est compromise (Gu et al., 2011a). La contraction latérale requiert l'aide des microtubules dans les cellules voisines ainsi que dans la cellule qui va être extrudée afin d'établir l'orientation de l'extrusion de cette dernière (Slattum et al., 2009). Si la formation de ces microtubules est affectée dans cette cellule, l'extrusion se fait quand même mais l'orientation de celle-ci s'inverse (Gudipaty and Rosenblatt, 2016).

L'extrusion des cellules apoptotiques aussi bien que celle des cellules vivantes implique la formation d'anneaux d'acto-myosine dans les cellules qui doivent être extrudées ainsi que dans les cellules voisines afin de générer la force qui permettra le détachement et l'extrusion des cellules.

- C. La voie de signalisation Sphingosine-1-phosphate (S1P) est régulée par la voie de signalisation JNK dans les cellules apoptotiques et par les canaux ioniques calciques dans les cellules vivantes.

Une voie de signalisation régulant l'extrusion des cellules apoptotiques et vivantes a été identifiée par l'équipe de Rosenblatt dans l'épiderme du poisson zèbre, ainsi que dans des tissus de colon humain

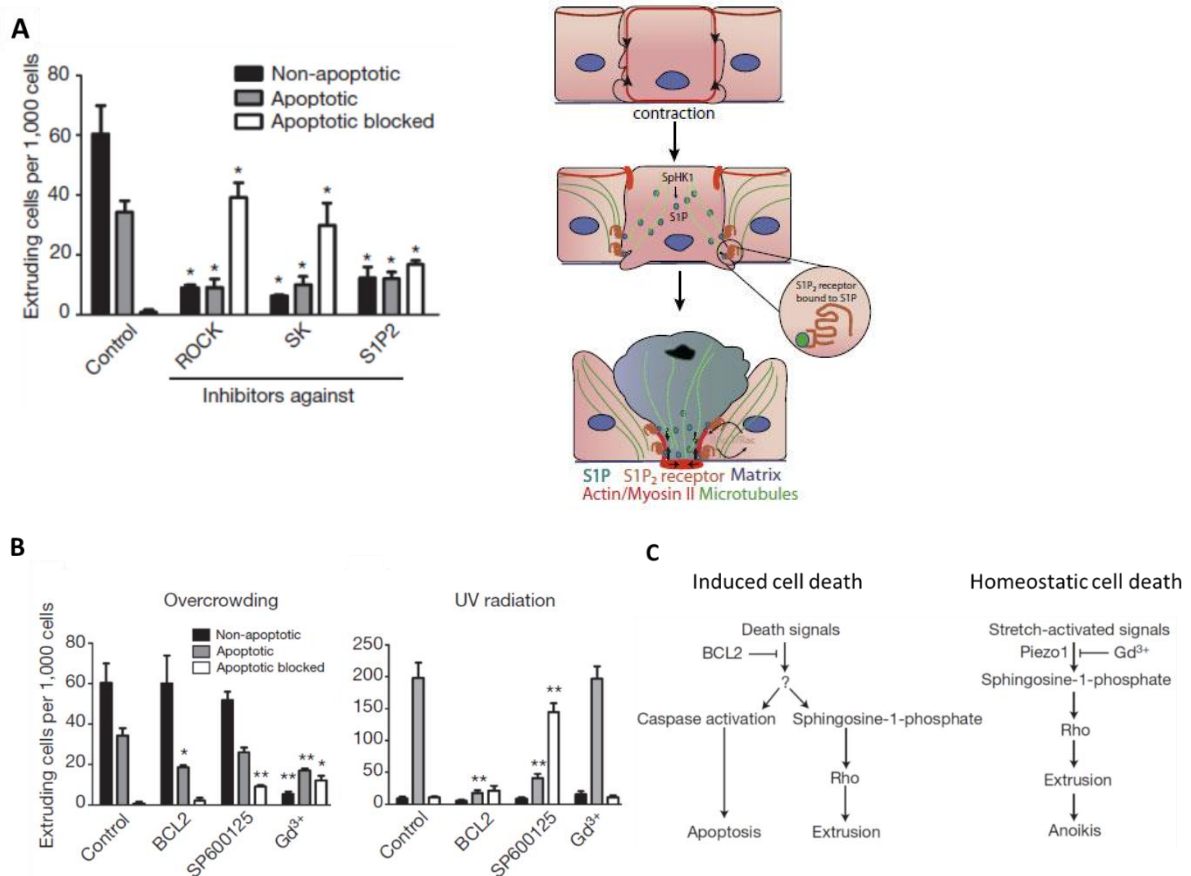


Figure 15. La voie de signalisation Sphingosine-1-phosphate (S1P) est régulée par la voie de signalisation JNK dans les cellules apoptotiques et par les canaux ioniques calciques mécanodépendantes dans les cellules vivantes. A) A gauche, quantification de l'extrusion des cellules confluentes MDCK dans des conditions d'inhibition de ROCK, de Sphingosine Kinase (SK) et du récepteur du S1P (S1P2). Ces trois protéines sont requises pour l'extrusion des cellules apoptotiques et vivantes. A droite, illustration d'une extrusion apicale d'une cellule apoptotique activant la voie de signalisation S1P-S1P2-Rho. **B)** Quantification de l'extrusion des cellules MDCK confluentes ou irradiées par UV avec des cellules surexprimant BCL2 (protéine anti-apoptotique), traitées avec un inhibiteur de la voie de signalisation JNK (SP600125), ou traitées avec un inhibiteur des canaux calciques (le gadolinium, Gd³⁺). L'inhibition de la voie de signalisation JNK ainsi que la suractivation de la protéine BCL2 bloquent l'extrusion de cellules apoptotiques (irradiées par UV) tandis que l'inhibition des canaux calciques par le gadolinium dans des cellules confluentes bloque l'extrusion des cellules vivantes. **C)** Représentation graphique des voies de signalisation impliquées dans l'extrusion des cellules apoptotiques (à gauche) et des cellules vivantes (à droite). D'après Eisenhoffer et al., 2012; Gudipaty and Rosenblatt, 2016.

et dans des cellules épithéliales en culture Madin–Darby canine kidney (MDCK) (Eisenhoffer et al., 2012). Dans les deux types d'extrusion, la cellule apoptotique ou vivante devant être extrudée doit produire et sécréter le lipide S1P, un sphingolipide impliqué dans la signalisation de plusieurs processus cellulaires (Maceyka et al., 2012). Les cellules voisines expriment le récepteur S1P2 qui va se lier à S1P. Cette liaison mène à l'activation de Rho dans les cellules voisines. À son tour, Rho recrute de l'Actine et de la Myosine au niveau de la surface baso-latérale des cellules en contact avec la cellule apoptotique ou vivante qui doit être extrudée et conduit finalement à l'extrusion de cette dernière. La perturbation de Rok, de S1P2 ou du réseau d'acto-myosine dans les cellules voisines ou dans la cellule apoptotique/vivante bloque leur extrusion et forme des amas cellulaires dans l'épithélium (Figure 15A) (Gu et al., 2011b; Gudipaty and Rosenblatt, 2016; Slattum et al., 2009).

L'inhibition de la voie de signalisation JNK ainsi que la suractivation de la protéine anti-apoptotique Bcl2 bloquent l'extrusion de cellules apoptotiques tandis que l'inhibition dans des tissus surpeuplés de canaux ioniques calciques mécano-dépendants bloque l'extrusion des cellules vivantes (Figure 15B-C) (Eisenhoffer et al., 2012). Dans les cellules apoptotiques, on ne sait pas encore de quelle façon JNK pourrait activer la voie S1P-S1P2-Rho. Pour l'extrusion de cellules vivantes, il a été montré que l'inhibition du canal calcique, Piezo1, dans les embryons du poisson zèbre, générait le même phénotype que la perturbation de la voie S1P-S1P2-Rho. Bien que le mécanisme qui connecte cette voie et Piezo1 ne soit pas encore connu, celui-ci est actuellement placé en amont de S1P. Toutes les cellules des tissus surpeuplés activent Piezo1 tandis que S1P est uniquement produit par les cellules qui doivent être extrudées. De plus, récemment il a été découvert que Piezo1 changeait sa localisation en fonction de la densité du tissu, suggérant une fonction homéostatique mécano-dépendante pour ce canal ionique (Jody Rosenblatt, *ibioseminars*, Epithelial Homeostasis, <https://www.ibiology.org/ibioseminars/cell-biology/epithelial-homeostasis-cell-division.html>).

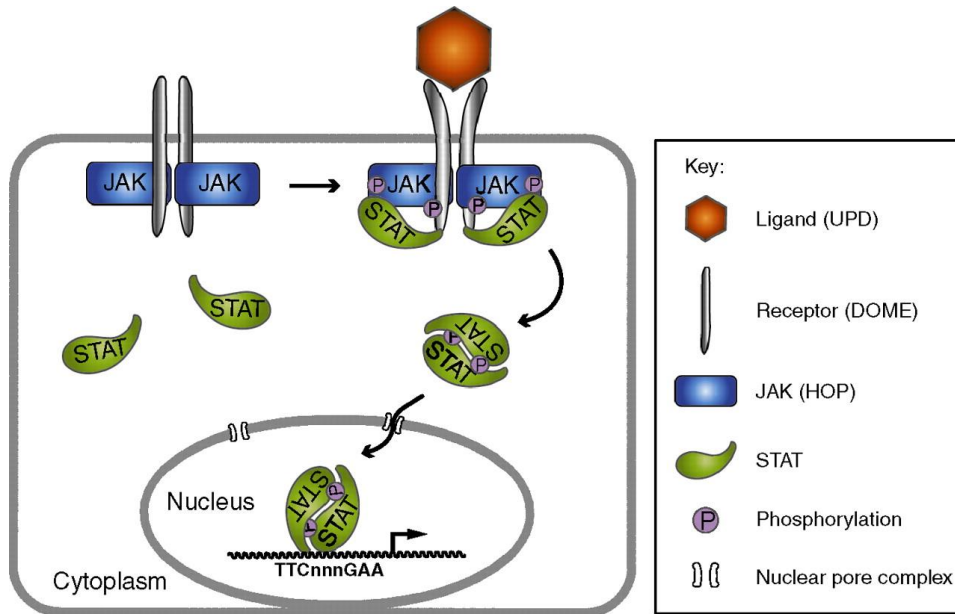


Figure 16. La voie de signalisation canonique JAK/STAT. La fixation du ligand sur son récepteur membranaire provoque la dimérisation de ce dernier et la trans-phosphorylation de la protéine kinase associée. Puis, la kinase phosphoryle le récepteur et le facteur de transcription, ce qui induit la dimérisation de celui-ci et sa translocation au noyau afin d'activer ou de réprimer l'expression des gènes cibles. Les protéines de la voie de signalisation JAK/STAT chez la drosophile sont indiquées entre parenthèses à droite. *D'après Arbouzova and Zeidler, 2006.*

En conclusion, les molécules du réseau d'acto-myosine sont directement impliquées dans le changement de la forme de la cellule qui doit être extrudée ainsi que de ses cellules voisines. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'extrusion cellulaire fassent l'objet de nombreuses recherches, les voies de signalisation qui les contrôlent spatialement et temporellement en amont des régulateurs des molécules d'acto-myosine sont moins étudiées.

IV. La signalisation JAK/STAT est requise pour la morphogenèse de plusieurs épithéliums

Au cours du développement, la voie de signalisation JAK/STAT est essentielle pour la morphogenèse de structures très variées. Elle est requise par exemple pour le développement des alvéoles de la glande mammaire, pour la migration du mésoderme axial et l'extension convergente du mésoderme latéral chez le poisson zèbre, ainsi que pour le processus d'extension convergente dans l'embryon de drosophile qui a déjà été décrit dans le chapitre II (section B-2b) (Hombría and Sotillos, 2008). Chez la drosophile encore, la voie de signalisation JAK/STAT est également requise pour la morphogenèse de l'intestin antérieur et postérieur, ainsi que pour le remodelage des spiracles (Hombría and Sotillos, 2008). Ces derniers exemples seront abordés dans ce chapitre.

A. Les composants, les fonctions et la régulation de la voie de signalisation JAK/STAT

Des recherches sur la transcription induite par l'Interféron ont mené à la découverte de la voie de signalisation JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) au début des années 90. La signalisation JAK/STAT est une voie de transduction de signaux activée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance. Elle est très conservée chez les métazoaires et elle implique : un ligand diffusible, un récepteur transmembranaire, une tyrosine kinase Janus (JAK) et un facteur de transcription STAT (Figure 16). Chez les vertébrés, il existe plusieurs ligands incluant des cytokines, des facteurs de croissance et des interférons; plus d'une dizaine de récepteurs de cytokines; quatre kinases JAK (JAK1, JAK2, JAK3 and Tyk2) et sept facteurs de transcription STAT (STAT1, STAT2, STAT3,

STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6) (Pfeifer et al., 2008). En revanche, chez la drosophile, cette voie de signalisation est beaucoup plus simple à étudier puisque dans son génome il n'y a que trois gènes codant des ligands cytokines Unpaired (1, 2, 3), un seul récepteur (Domeless ou Dome), une seule tyrosine kinase (Hopscotch ou Hop) et un seul facteur de transcription STAT (Stat92E).

La voie de signalisation JAK/STAT est nécessaire au maintien de l'homéostasie et au développement en jouant un rôle sur la régulation de processus aussi variés que la prolifération, la différenciation, la migration, la survie et la mort cellulaire (Arbouzova and Zeidler, 2006; Harrison, 2012; Stark and Darnell, 2012). Ceci explique aussi pourquoi une dérégulation de la voie JAK/STAT est associée à plusieurs pathologies humaines. Par exemple, l'activation constitutive de STAT3 et STAT5 a été détectée dans de nombreuses tumeurs solides de grave pronostic et une mutation ponctuelle qui rend JAK2 constitutivement active (l'échange d'une Valine pour Phénylalanine V617F) a été associée à une variété de maladies hématologiques (Thomas et al., 2015). Ceci fait de JAK une cible pour la thérapie génique. Divers inhibiteurs de JAK2 ont été testés dans des essais cliniques sur des patients présentant des risques de développer ces maladies hématologiques et certains d'entre eux ont déjà été approuvés (Quintás-Cardama and Verstovsek, 2013).

1. La voie JAK/STAT canonique

La voie de signalisation canonique de JAK/STAT commence par l'activation du récepteur de membrane qui ne possède pas une activité enzymatique intrinsèque. L'union du ligand dans le domaine extracellulaire du récepteur conduit à un changement dans la conformation du domaine intracellulaire. Ceci génère une homo- ou hétéro-dimérisation du récepteur qui permet le recrutement et l'activation des protéines JAK. Ces protéines s'activent par transphosphorylation puis phosphorylent à leur tour le récepteur. La phosphorylation du récepteur génère des sites d'union pour des protéines cytoplasmiques avec des domaines SH2 (Src homology 2) telle que les protéines STAT. Des monomères inactifs de STAT se lient sur des résidus spécifiques de phosphotyrosine sur le

récepteur activé et sont phosphorylés par JAK. Ensuite, les monomères actifs de STAT se détachent du récepteur, se dimérisent (en homo- ou hétérodimères) et sont finalement transloqués au noyau. Dans le noyau, les dimères de STAT se lient à l'ADN sur la séquence consensus (TTNnnGAA) et activent la transcription de gènes cibles spécifiques (Figure 16) (Arbouzova and Zeidler, 2006; Chen et al., 2014; Harrison, 2012).

Des modifications post-traductionnelles (phospho- et déphosphorylation, acétylation/déacétylation, ubiquitination, sumoylation, entre autres) de STAT sont cruciales pour la dimérisation, la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN et pour moduler son activité transcriptionnelle (Lim and Cao, 2006). Les facteurs de transcription STAT peuvent également être activés par d'autres types de récepteurs qui présentent une activité tyrosine kinase comme c'est le cas du récepteur à l'EGF, EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor »). Ce récepteur a été associé à l'activation de plusieurs STAT dans divers cancers (Quesnelle et al., 2007).

La voie JAK/STAT canonique est régulée négativement par différents mécanismes ; 1) par des phosphatases cytoplasmiques et nucléaires qui déphosphorylent les récepteurs ainsi que les JAK et les STAT activés (Böhmer and Friedrich, 2014) ; 2) par l'expression d'un groupe de protéines non inductibles PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) qui se lient sur les STAT et induisent leur dégradation par sumoylation (Arbouzova and Zeidler, 2006) ; 3) par l'expression de protéines SOCS (Suppressors Of Cytokine Signalling) et CIS (Cytokine-Inducible SH2-containing). Ces protéines se lient aux JAK et aux récepteurs de cytokines phosphorylés via leur domaine SH2 (Gisselbrecht, 1999), ce qui engendre leur dégradation impliquant une activité Ubiquitine E3 ligase (Kile et al., 2002).

2. La voie JAK/STAT non canonique

Les protéines JAK et STAT peuvent également contribuer à la signalisation selon un mode non conventionnel ou non-canonique. Cette voie JAK/STAT non-canonique a été découverte chez la drosophile (Shi et al., 2006, 2008). La suractivation de Hop (l'homologue de JAK) réprime l'expression de gènes qui ne sont pas des cibles de STAT, via la perturbation de l'hétérochromatine

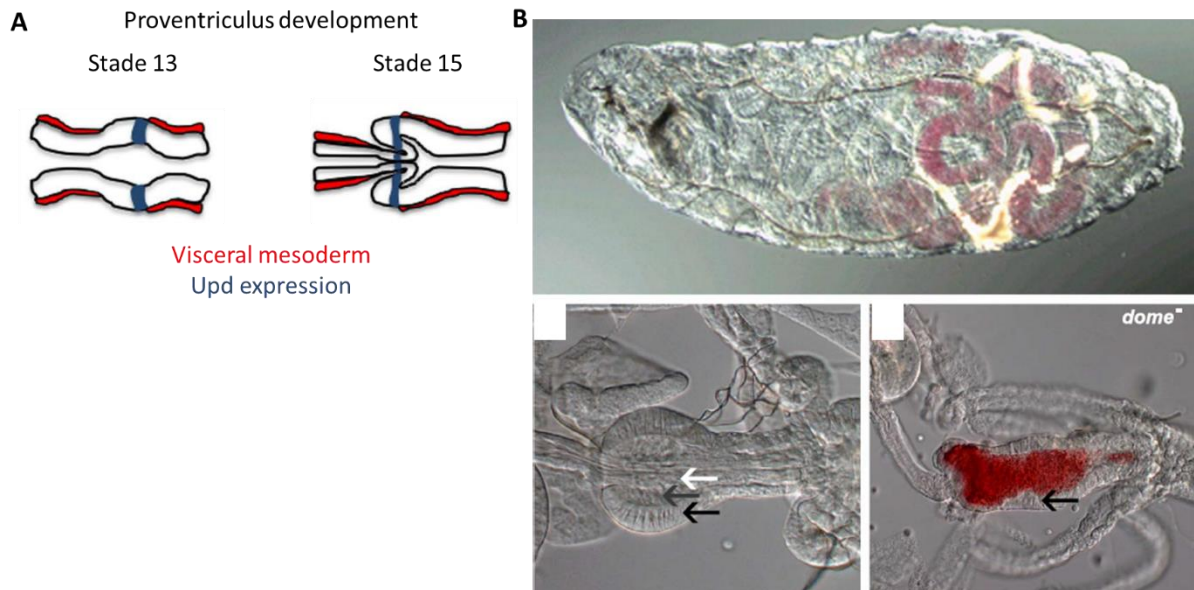


Figure 17. La voie de signalisation JAK/STAT est requise pour le remodelage du proventriculus dans l'intestin antérieur chez la drosophile. A) Illustration du développement du proventriculus entre les stades 13 et 15 de l'embryon. Le proventriculus a une forme de serrure au stade 13 et passe à une forme de cœur au stade 15. Le mésoderme viscéral est en rouge. L'expression du ligand de la voie JAK/STAT, Unpaired (Upd) est montré en bleu. B) En haut, une larve L1 contrôlée nourrie avec de la levure teinte en rouge. En bas à gauche, un proventriculus d'une larve contrôlée composé d'une couche interne (flèche blanche), d'une couche intermédiaire (flèche grise) et d'une couche externe endodermique (flèche noire). En bas à droite, un proventriculus d'une larve mutante pour *dome* dans laquelle les couches interne et intermédiaire ne sont pas invaginées et la couche endodermique est désorganisée. D'après *Hombria and Sotillos, 2013; Josten et al., 2004.*

(Shi et al., 2006). Cette perturbation de l'état hétérochromatinien se fait en présence d'une proportion de STAT non-phosphorylés localisés au noyau et associés à la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Shi et al., 2008). Par ailleurs, des études conduites dans des cellules humaines de l'hippocampe ont suggéré un rôle cytoplasmique de la protéine STAT3 indépendamment de son activité transcriptionnelle, pour la plasticité synaptique des neurones, ce qui représenterait une autre forme non-canonique de la voie de signalisation JAK/STAT (Nicolas et al., 2012, 2013).

B. La voie de signalisation JAK/STAT dans la morphogenèse de deux tissus chez la drosophile

La voie de signalisation JAK/STAT est requise pendant le développement de l'intestin et des spiracles chez la drosophile (Johansen et al., 2003; Josten et al., 2004; Lovegrove et al., 2006; Wells et al., 2013a). L'intestin est composé d'un épithélium monocouche tubulaire. Il est divisé en trois parties : l'intestin antérieur, moyen et postérieur. Upd (le ligand de JAK/STAT) est exprimé dans l'intestin antérieur et postérieur entre les stades 11 et 15 de l'embryogenèse et il est nécessaire pour induire des réarrangements ou des changements de forme cellulaires.

1. Remodelage du proventriculus dans l'intestin antérieur

Dans l'intestin antérieur, la voie de signalisation JAK/STAT est nécessaire à la morphogenèse du proventriculus, une structure située au niveau le plus postérieur de l'intestin antérieur. Le proventriculus se génère par des réarrangements cellulaires conduisant à la formation de plusieurs repliements du tissu (Figure 17A). Upd est exprimé par des cellules formant un anneau dans l'intestin antérieur. Des analyses de perte et de gain de fonction de composants de la voie JAK/STAT ont révélé que les cellules du proventriculus ne parvenaient pas à effectuer le mouvement qui conduit à la formation de plis lorsque la voie JAK/STAT était affectée (Figure 17B) (Josten et al., 2004). De plus, la voie de signalisation Notch ainsi que le gène *short stop* (*shot*, une cible de Notch) qui code une

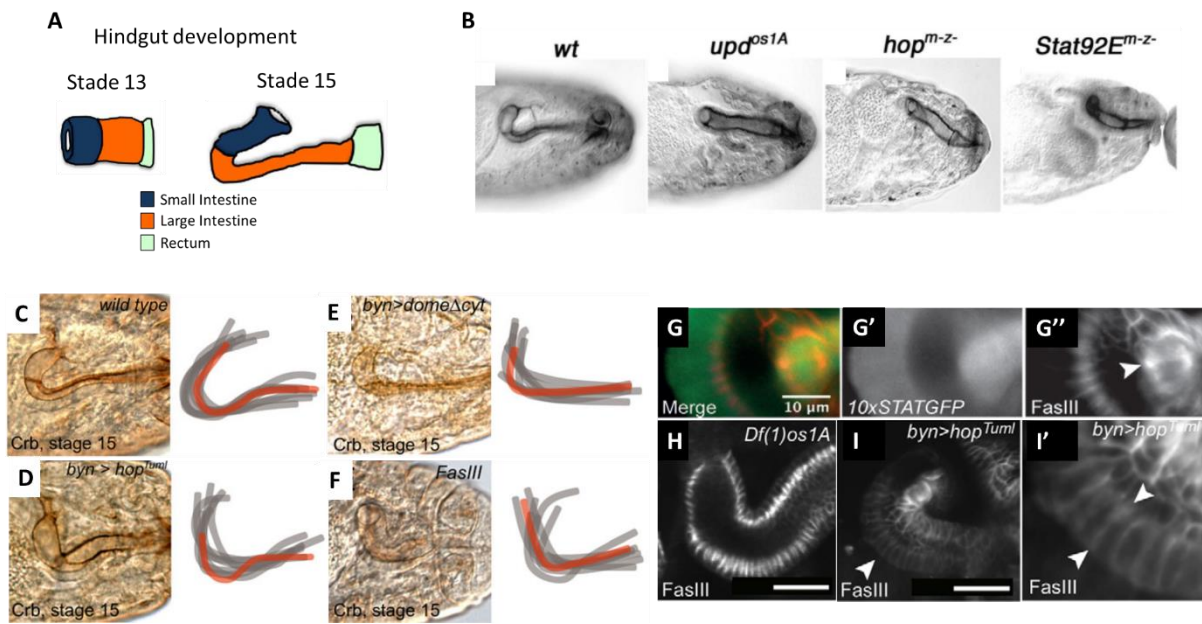


Figure 18. La voie de signalisation JAK/STAT est requise pour le remodelage de l'intestin postérieur dans l'embryon de drosophile. **A)** Illustration du développement de l'intestin postérieur entre les stades 13 et 15 de l'embryon. L'intestin postérieur est subdivisé en trois régions : le petit intestin (bleu), l'intestin large (orange) et le rectum (vert clair) qui forment une structure tubulaire courte et large au stade 13 et deviennent une structure tubulaire longue et étroite au stade 15. **B)** Des embryons contrôle (*wt*), mutants pour les trois gènes *upd* (*upd^{os1A}*), mutants pour *hop* (*hop^{m-z}*) ou mutants pour *stat92E* (*stat92E^{m-z}*) au stade 16 marqués avec l'anticorps anti-Crubs (*crumbs*, un gène cible de Stat92E). L'intestin est plus court et large chez les mutants indiquant que la voie JAK/STAT est requise pour ce remodelage. **C-F)** Des intestins d'embryons contrôle (wild-type, **C**), exprimant une forme constitutivement active de Hop (Hop^{TUM}, **D**), exprimant un dominant négatif de *dome* (*domeΔcyt*, **E**) ou des mutants *FasIII* (**F**), visualisés grâce à l'expression de Crumbs. Les schémas à droite de chaque image montrent la forme de 8 intestins (gris) avec leur superposition (orange) par génotype. La courbure de l'intestin est altérée en D-F. **G-G'')** Image d'un intestin exprimant un gène rapporteur de la voie JAK/STAT (vert) et marqués pour FasIII (rouge). FasIII est latéralisé dans le côté intérieur de la courbure de l'intestin. **H-I')** Images d'un embryon mutant pour les trois gènes *upd* (*upd^{os1A}*, **H**) et d'un intestin dont les cellules expriment une forme constitutivement active de Hop (Hop^{TUM}, **I**), marquées par FasIII. L'image I' correspond à un grossissement de la région indiquée par la pointe de flèche en I. L'asymétrie du marquage FasIII est perdue dans les intestins de ces génotypes. D'après Johansen et al., 2003; Hombría and Sotillos, 2013; Wells et al., 2013.

protéine de connexion des intégrines au cytosquelette, sont dérégulés lorsque la voie de signalisation JAK/STAT est réprimée (Josten et al., 2004). Le mécanisme moléculaire par lequel JAK/STAT contrôle les réarrangements cellulaires durant le développement du proventriculus n'est pas encore connu, mais cette régulation implique l'expression de protéines du cytosquelette via l'activité de Notch.

2. Remodelage de l'intestin postérieur

L'intestin postérieur est subdivisé en trois régions, le petit intestin, l'intestin large et le rectum, en allant de la plus antérieure à la plus postérieure (Figure 18A). Upd est exprimé par les cellules du petit intestin mais il agit de façon non-autonome cellulaire à grandes distances dans l'intestin large. Pendant le développement de l'intestin postérieur, deux processus morphogénétiques ont lieu : entre les stades 12 et 14 du développement, un mouvement d'extension convergente transforme la structure tubulaire courte et large en une structure tubulaire longue et étroite, tandis qu'au stade 15, l'intestin postérieur se courbe selon un angle de 136° (Figure 18A-I').

Des embryons mutants pour des composants de la voie JAK/STAT ou les exprimant de façon ectopique présentent un intestin court et large en conséquence de l'inhibition des réarrangements cellulaires (Figure 18B) (Johansen et al., 2003). Etant donné qu'Upd est un morphogène et que la perte et le gain de composants de la voie JAK/STAT génèrent le même phénotype dans ce tissu, les auteurs suggèrent que ce n'est pas l'activité de JAK/STAT en elle-même qui régule les mouvements cellulaires mais la différence de son activité entre les cellules qui orienterait les réarrangements cellulaires (Johansen et al., 2003). Il serait intéressant d'identifier la localisation subcellulaire des composants du cytosquelette d'acto-myosine ainsi que de leurs régulateurs dans ce tissu afin de déterminer si JAK/STAT pourrait utiliser les mêmes mécanismes moléculaires qu'au cours de la régulation du mouvement de l'extension convergente de la GBE.

D'autre part, la voie de signalisation JAK/STAT régule positivement l'expression de Fasciclin III (Fas3), une protéine d'adhésion cellulaire, dans l'intestin postérieur de la drosophile à partir du stade 12 de

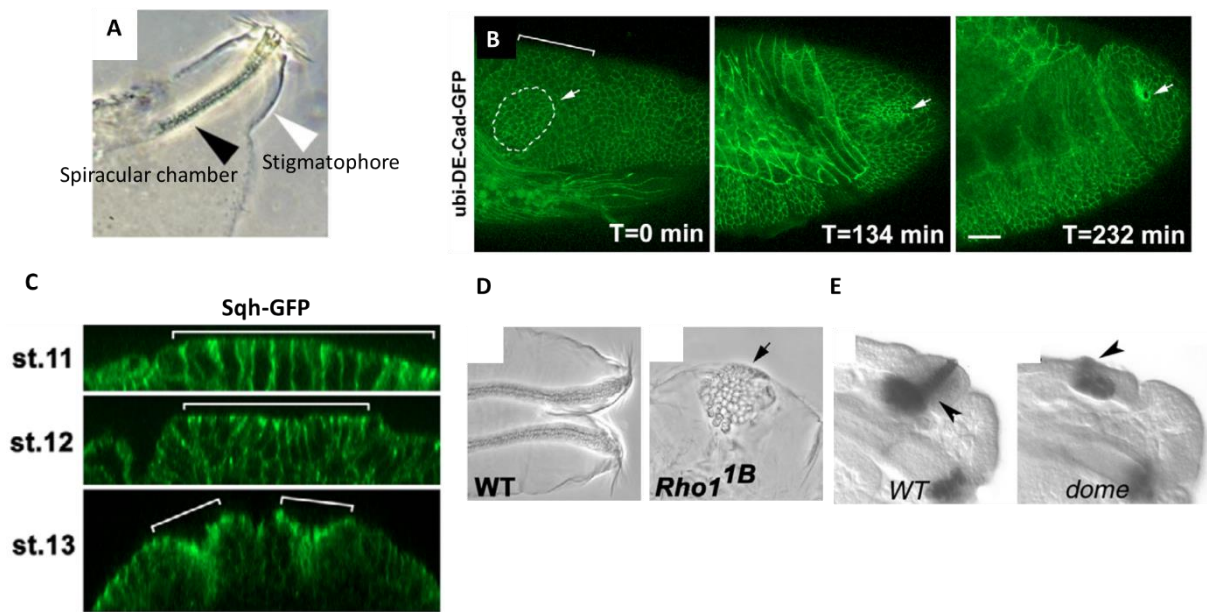


Figure 19. La voie de signalisation JAK/STAT est requise pour le remodelage des spiracles chez la drosophile. **A)** Spiracle postérieur d'une larve de drosophile. Le stigmatophore et la chambre des spiracles sont indiqués. **B)** Images en temps réel des cellules exprimant ubi-DE-Cadhérine:GFP. Le segment A8 est indiqué par le crochet blanc. Au stage 11 (t=0 minutes), la chambre des spiracles (pointillés blanc) est superficielle et localisée postérieurement à la fosse trachéale du segmente A8 (flèche). Plus tard, les cellules qui vont constituer la chambre des spiracles se contractent et s'internalisent pour former le lumen (flèche, t=232 minutes). **C)** Images sagittales des embryons à différents stades exprimant une protéine de fusion Sqh :GFP. Les crochets indiquent la position des cellules des spiracles qui s'invaginent. **D)** Filzkörpers dans un contexte contrôle (wt) et un Filzkörpers non invaginé (flèche) dans un embryon mutant pour Rho (*Rho1^{1B}*). **E)** Embryons *grh-lacZ* (marqueur des spiracles postérieurs) au stade 15 présentant une chambre des spiracles allongée (pointe de flèche pour le contrôle, wt) marquée par le β-galactosidase ou non allongée (pointe de flèche) dans un embryon mutant pour *dome*. D'après Hu and Castelli-Gair, 1999; Simões et al., 2006; Lovegrove et al., 2006.

l'embryogenèse (Wells et al., 2013a). Des embryons hétérozygotes mutants pour les trois gènes *upd* ou pour *fas3*, ou exprimant ectopiquement Upd ou JAK, ont des intestins moins courbés et moins serrés (Figure 18C-F). En effet, l'activation asymétrique de JAK/STAT induit l'expression puis la latéralisation de Fas3 en allongeant les membranes d'un groupe de cellules de l'intestin postérieur (Figure 18G-I'). Ceci est suffisant pour augmenter la cohésion de ces cellules et donc générer la formation de la courbure de ce tissu ($\Theta=136^\circ$). Il est connu que les forces d'adhésion contrecarrent la tension créée par les forces du réseau d'acto-myosine dans les cellules épithéliales (Guillot and Lecuit, 2013). Une approche *in silico* qui module la tension et la cohésion de cellules de l'intestin postérieur a montré que la courbure de cette structure était dépendante de ces paramètres. Notamment, si la tension augmentait (moins de cohésion) ou diminuait (plus de cohésion) dans toutes les cellules du tissu, l'angle de la courbure était plus petit, comme c'était le cas pour les mutants d'acteurs de la voie JAK/STAT ou *fas3* ($\Theta=111^\circ$) ou en surexprimant Upd ou Hop ($\Theta=114^\circ$). Ce modèle a révélé qu'en fait une diminution de la tension (soit une augmentation de la cohésion) dans uniquement 18 cellules serait suffisant pour provoquer un angle correct de courbure de ce tissu (136°) (Wells et al., 2013a).

3. Remodelage des spiracles

L'activité de la voie de signalisation JAK/STAT est également nécessaire à la formation des spiracles qui sont des ouvertures du système respiratoire qui connectent la trachée avec l'extérieur pour réaliser les échanges gazeux dans l'embryon de drosophile. JAK/STAT contrôle l'invagination et l'élongation ainsi que des réarrangements cellulaires de ce tissu. Chez l'embryon, les spiracles postérieurs se forment dans la région dorsale du segment abdominal A8. Ces spiracles sont constitués de deux structures formées à différents stades du développement : la chambre des spiracles (une structure tubulaire qui permet la connexion avec la trachée) et le stigmatophore externe (une protrusion externe qui héberge la chambre des spiracles) (Figure 19A) (Hu and Castelli-Gair, 1999). Au stade 11 du développement embryonnaire, les cellules du spiracle postérieur présomptif réduisent

leur surface apicale et s'invaginent selon un mécanisme qui implique l'activation du réseau d'acto-myosine via Rho1 (Figure 19B-D) (Lovegrove et al., 2006; Simões et al., 2006b). Ces cellules vont constituer la chambre des spiracles en continuité avec le tronc trachéal dorsal. De plus, quelques-unes de ces cellules qui s'invaginent s'allongent selon l'axe apico-basal, augmentant 4 fois la surface de leurs membranes latérales. Ce changement de la forme est indépendant de l'invagination puisque cet allongement se fait même lorsque les spiracles ne s'invaginent pas (Hu and Castelli-Gair, 1999; Lovegrove et al., 2006). Ensuite, au stade 13, les cellules de l'ectoderme qui recouvrent les cellules les plus internes de la chambre des spiracles, deviennent spécifiées et forment le stigmatophore par un processus de réarrangement cellulaire. *Upd* est exprimé dans les cellules précurseurs des spiracles sous le contrôle d'*Abdominal-B* avant que leur invagination ne commence (Lovegrove et al., 2006). Dans des embryons mutants pour *upd*, les cellules des spiracles ne réalisent pas leur invagination, leur élongation et leurs réarrangements cellulaires (Figure 19E) (Lovegrove et al., 2006). Des embryons dans lesquels l'expression de Rho, de différentes Cadhérines non classiques ou de la protéine de polarité apicale Crumbs sont inhibées présentent les mêmes phénotypes que l'inhibition de JAK/STAT sur les cellules des spiracles (Figure 19D,E) (Lovegrove et al., 2006). Le mécanisme par lequel JAK/STAT contrôle les mouvements morphogénétiques dans les cellules des spiracles n'est pas encore connu, il se pourrait qu'il implique des protéines associées au réseau d'acto-myosine.

Les mécanismes moléculaires par lesquels la voie JAK/STAT régule ces différents types de remodelage cellulaire n'ont pas encore été identifiés, mais le fait que cette voie régule des processus similaires à différents stades et dans différents tissus au cours du développement suggère que JAK/STAT pourrait jouer un rôle universel dans le changement de la forme des cellules épithéliales en contrôlant par exemple les molécules du réseau d'acto-myosine ainsi que des JA.

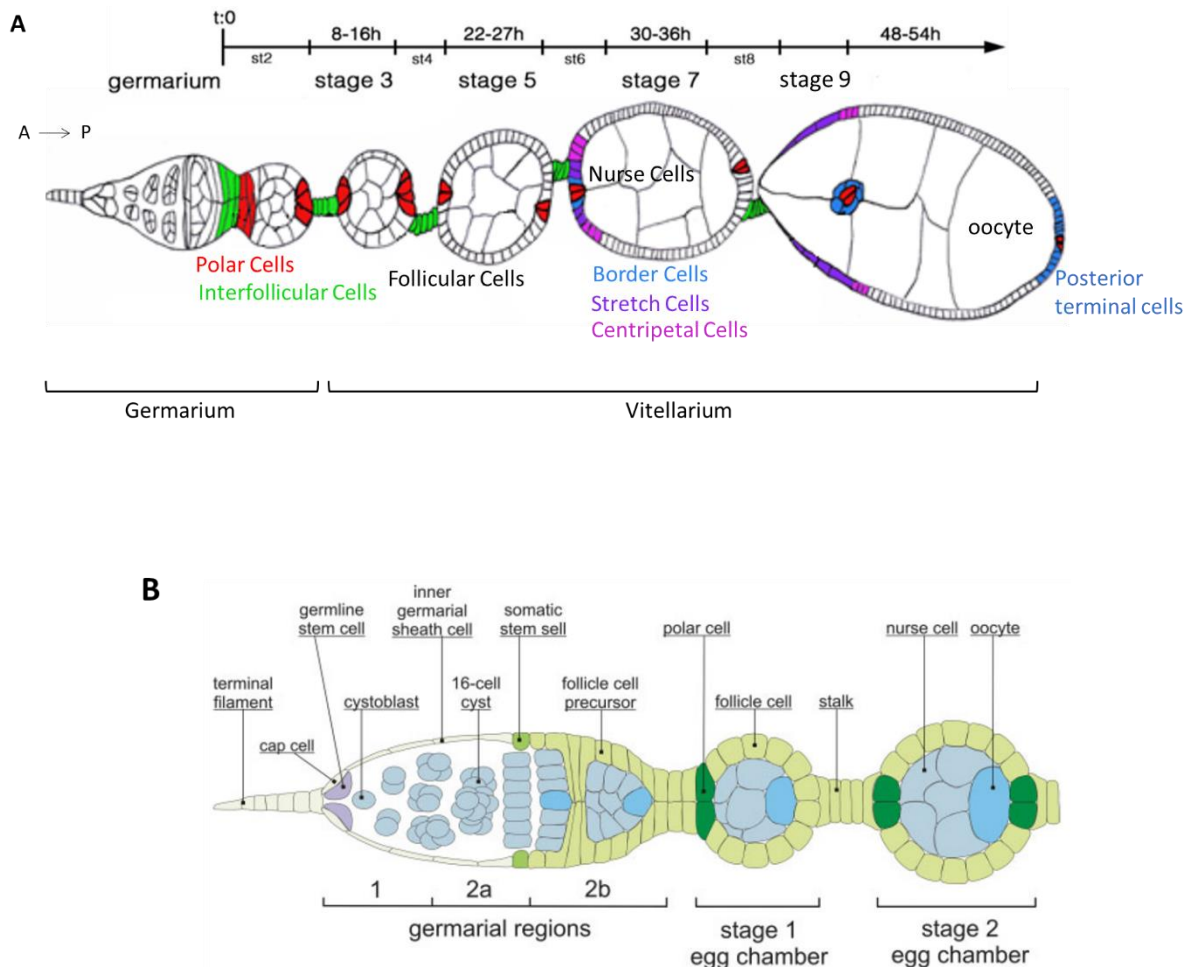


Figure 20. Organisation d'une ovariole et du germarium. A) Représentation d'une ovariole. Les follicules ou chambres à œufs mûrissent le long de l'axe antéro-postérieur (A-P). Chaque follicule est constitué par un cyste germinale entouré d'un épithélium monocouche. Aux stades précoces de l'ovogenèse, trois populations de cellules somatiques sont différenciées : les cellules folliculaires (CF), les cellules interfolliculaires (en vert) et les cellules polaires (CP) à chaque extrémité du follicule (en rouge). Au stade 7, au pôle antérieur, les CF les plus proches des CP se différencient en cellules de bordure (border cells, bleu clair), en cellules squameuses (stretch cells, violet) et en cellules centripètes (centripetal cells, magenta). Au pôle postérieur les CF proches des CP se différencient et maintiennent un destin postérieur (bleu foncé). Au stade 9 de l'ovogenèse, les CP entourées par les cellules de bordure migrent collectivement entre les cellules nourricières pour atteindre l'ovocyte et constituer le micropyle : le point d'entrée du spermatozoïde. **B)** Le germarium est divisé en trois régions différentes : la région 1, 2a et 2b. La région 1 contient les cellules souches germinales qui donnent lieu au cyste germinale. Les cellules souches somatiques sont localisées à la limite des régions 2a et 2b. Ces cellules donnent lieu aux précurseurs des CF qui vont se différencier en CF de la région centrale (« main body »), en précurseurs des CP ou en cellules interfolliculaires. *D'après Horne-Badovinac and Bilder, 2005; Khammari et al., 2011.*

V. Le follicule ovarien de la drosophile comme modèle d'étude de la signalisation JAK/STAT.

A. Ovaires, ovarioles et ovogenèse

Les ovaires de drosophile constituent un organe modèle présentant des intérêts très variés dans les domaines de la biologie cellulaire, du développement et des cellules souches. Il s'agit de l'organe le plus grand de la mouche qui est facile à isoler et visualiser au microscope. Les avancées en génétique et en microscopie ainsi que des analyses complémentaires réalisées sur tissus fixés et vivants, ont permis de caractériser plusieurs processus et mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation de cet organe. Notamment, les études en temps réel permettent d'affiner les analyses en générant de l'information sur des échelles de temps variées.

La femelle adulte de la drosophile possède une paire d'ovaires localisés dans son abdomen. Ils sont entourés par une enveloppe de tissu conjonctif qui permet la connexion entre eux par l'oviducte. Chaque ovaire possède de 15 à 20 structures individuelles et fonctionnelles appelées les ovarioles qui sont entourées par une membrane musculaire. Une ovariole est une structure linéaire et polarisée le long de laquelle murissent les follicules ovariens ou chambres à œuf (Figure 20A). La région la plus antérieure de chaque ovariole est appelée le germarium. Celle-ci se caractérise par la présence de cellules souches germinales et somatiques qui sont à l'origine des toutes les cellules du follicule ovarien. Le follicule est une structure composée d'un cyste germinale entouré par une monocouche de cellules folliculaires somatiques. Lorsqu'un follicule sort du germarium, il poursuit progressivement son développement dans la partie postérieure de l'ovariole appelée le vitellarium. Une fois la maturation de l'ovocyte achevée, il atteint l'oviducte où il pourra être fécondé puis pondue. Le stade d'un follicule peut être déterminé selon des critères morphologiques qui divisent l'ovogenèse en 14 stades avec le stade 1 correspondant au follicule bourgeonnant hors du germarium et le stade 14 correspondant à l'œuf mature (Spradling, 1993). L'ovogenèse dure entre 4 et 5 jours et dépend

d'interactions des cellules de la lignée germinale du cyste entre elles ainsi que qu'avec les cellules folliculaires qui les entourent (Horne-Badovinac and Bilder, 2005).

1. Ovogenèse dans le germarium

Le germarium est divisé en trois régions différentes : la région 1, 2a et 2b (Figure 20B). La région 1 contient deux ou trois cellules souches germinales (GSC, Germline Stem Cells) en contact avec une structure considérée comme la niche des GSC. Dans cette région 1, une GSC se divise de façon asymétrique générant une cellule fille qui restera en contact avec la niche et gardera l'identité GSC, et l'autre cellule fille qui commencera sa différenciation. Quatre divisions mitotiques avec des cytodières incomplètes forment un cyste de 16 cellules toutes reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques (ou canaux) générés à chaque division (Spradling, 1993). De cette façon à la fin des divisions, le cyste contiendra 2 cellules avec 4 ponts cytoplasmiques, 2 cellules à 3 ponts, 4 cellules à 2 ponts et 8 cellules à un seul pont (Figure 20B). Le cyste rentre alors dans la région 2a du germarium, où l'une des deux cellules avec 4 canaux, par des mécanismes encore inconnus, commence à accumuler les protéines BicD, Egl, Orb et Cup ainsi que les ARNm *oskar* et *BicD* pour devenir l'ovocyte (Huynh and St Johnston, 2000). Les autres 15 cellules du cyste deviendront les cellules nourricières. Entre-temps, les cellules souches somatiques (SSC, Somatic Stem Cells) localisées à la limite des régions 2a et 2b du germarium (Margolis and Spradling, 1995) se divisent générant les précurseurs des Cellules Folliculaires (CF) qui sont placées postérieurement (Figure 20B). Dans la région 2b, l'ovocyte se positionne dans la partie postérieure du cyste, établissant la polarité Antéro-Postérieure (A-P), et commence à être enveloppé par une couche de précurseurs des CF afin de produire une chambre à œuf individualisée. Les précurseurs des CF qui entourent un cyste germinale se différencient en CF de la région centrale (« main body ») et en précurseurs de deux autres populations cellulaires épithéliales qui ne se diviseront plus tout au long de l'ovogenèse: les Cellules Polaires (CP) et les cellules interfolliculaires (CIF) (Figure 20B) (Nystul and Spradling, 2010).

2. Ovogenèse dans le vitellarium

Depuis leur bourgeonnement, les cellules nourricières augmentent drastiquement de taille suite à plusieurs cycles d'endoréplication, où la synthèse d'ADN est effectuée mais en absence de cytotélerèse. Pour sa part, l'ovocyte reste bloqué en métaphase I de la méiose jusqu'à son passage de l'oviducte à l'utérus.

Le tissu qui enveloppe le cyste germinale étant un épithélium, il va subir des changements très variés de formes et de mouvements cellulaires. Aux stades précoces de l'ovogenèse, les CF présentent une forme cuboïde et se divisent continuellement jusqu'au stade 6 (Margolis and Spradling, 1995). Puis elles rentrent dans un période de croissance et de trois cycles d'endoréplication jusqu'au stade 10 de l'ovogenèse (Calvi and Spradling, 1999). La transition d'un stade prolifératif à un état de croissance et d'endoréplication des CF est dépendant de la liaison de Notch présent dans les CF avec son ligand Delta exprimé dans la lignée germinale, ce qui active cette voie de signalisation (Deng et al., 2001).

La postériorisation de l'ovocyte dans le germarium et donc son absence antérieure permet la spécification de différentes identités des CF antérieures ainsi que l'établissement d'un destin de CF postérieur entre les stades 7 et 10 de l'ovogenèse (Figure 20A). Ainsi, trois populations cellulaires vont être spécifiées du côté antérieur en réponse à l'activité de la voie de signalisation JAK/STAT (McGregor et al., 2002; Xi et al., 2003). On trouvera, du côté le plus proche du pôle au plus éloigné : les cellules de bordure (CB), les cellules squameuses et les cellules centripètes. Les CB subissent une transition épithélio-mésenchymateuse au stade 9 de l'ovogenèse. Elles vont entourer les CP et migrer collectivement à l'intérieur du follicule à travers les cellules nourricières pour atteindre la partie antérieure de l'ovocyte au stade 10A (McGregor et al., 2002; Silver and Montell, 2001). En même temps, les autres CF réorganisent leur cytosquelette et changent drastiquement de forme. D'une part, les cellules squameuses s'aplatissent pour couvrir les cellules nourricières qui occupent la moitié antérieure de la chambre à œuf au stade 10A. D'autre part, les cellules centripètes localisées autour

de l'ovocyte deviennent colonnaires et migrent entre les cellules nourricières et l'ovocyte afin de l'entourer.

Du côté postérieur de la chambre, l'ovocyte, les CF et les CP communiquent ensemble via les voies de signalisation JAK/STAT et EGFR afin de maintenir un destin postérieur aux stades 6/7 de l'ovogenèse (Xi et al., 2003). Au stade 7, les CF et CP du côté postérieur envoient un signal de nature encore inconnue à l'ovocyte, entraînant une réorganisation A-P de leur cytosquelette de microtubules et générant ainsi une force qui pousse son noyau du côté dorso-antérieur (Zhao et al., 2012). Ce mouvement du noyau permettra l'établissement de la polarité Dorso-Ventrale de l'ovocyte.

Ensuite, entre les stades 10B et 11 de l'ovogenèse, les cellules nourricières transfèrent tout leur contenu dans l'ovocyte au cours d'un processus appelé le *dumping* cytoplasmique et leurs restes sont dégradés entre les stades 12 et 13 de l'ovogenèse. Parallèlement, entre les stades 11 et 14 de l'ovogenèse, deux groupes de CF colonnaires localisées en position antéro-dorsale se réorganisent pour former des tubes. Ces tubes secrètent des composants de la coquille d'œuf dans le lumen afin de générer les appendices chorioniques qui permettront la respiration des œufs (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). Les cellules centripètes vont également former l'operculum, une structure qui permettra à la larve de quitter l'enveloppe de l'œuf. Finalement, entre les stades 13 et 14, le groupe CB/CP localisé du côté antérieur de l'ovocyte forme le micropyle, le point d'entrée des spermatozoïdes.

Deux processus morphogénétiques reposant sur la polarité de l'épithélium folliculaire ont également été identifiés au cours de l'ovogenèse : l'élongation et la rotation de la chambre à œuf. A partir du stade 5, les follicules s'allongent le long l'axe A-P et passent ainsi d'une forme sphérique à une forme allongée jusqu'à être 2,5 fois plus longs que à la fin de l'ovogenèse. A partir d'analyses sur des follicules fixés entre les stades 10 et 11, un mécanisme de « corset moléculaire » avait été proposé pour expliquer le processus d'élongation de la chambre à œuf (Gutzeit et al., 1991). Selon ce modèle, des faisceaux d'Actine localisés sur la surface basale des CF en association avec des structures fibrillaires

de la matrice extracellulaire, alignés de façon perpendiculaire à l'axe d'élongation, seraient à la base du processus d'élongation du tissu. Une des premières études conduites en temps réel sur des chambres à œuf a révélé que la rotation des follicules était nécessaire à la polarisation des fibres de la matrice extracellulaire, liant ainsi la rotation avec le corset moléculaire (Haigo and Bilder, 2011). L'alignement des faisceaux d'Actine au niveau du tissu requis pour l'élongation des follicules est établi très tôt au cours de l'ovogenèse par le processus de rotation (Cetera et al., 2014). En parallèle, le groupe de Denise Montell a mis en évidence le caractère dynamique du corset moléculaire (He et al., 2010). Les chercheurs ont déterminé qu'entre les stades 9 et 10 de l'ovogenèse, des cycles de contraction générés par une accumulation basale d'acto-myosine dans les CF et en association avec des composants de la matrice extracellulaire, étaient nécessaires à l'élongation des follicules (He et al., 2010). Plus récemment, l'équipe de Vincent Mirouse a proposé deux phases pour expliquer l'élongation de la chambre à œuf (Mirouse). La première phase qui a lieu entre les stades 3 et 7 de l'ovogenèse est basée sur un mécanisme de pulsations apicales des CF contrôlées par la signalisation JAK/STAT et indépendant du processus de rotation. Puis, une deuxième phase d'élongation a lieu entre les stades 8 et 14 et implique la Cadhérine atypique Fat2 au niveau basal.

B. La voie de signalisation JAK/STAT joue divers rôles durant l'ovogenèse

1. Spécification des Cellules Polaires et des Cellules Interfolliculaires

Les précurseurs des CF se différencient soit en précurseurs des CP/CIF soit en CF du « main body » au niveau du germarium. A ce stade de l'ovogenèse, l'interaction entre les voies de signalisation Notch et JAK/STAT détermine la spécification du destin CP/CIF. Le précurseur de ce lignage va générer à la fois des cellules qui sont en contact direct avec la lignée germinale (les CP) et des cellules qui ne le sont pas (les CIF). De cette façon, les CIF seront les cellules qui vont connecter les follicules en cours



Figure 21. Les cellules polaires sont les uniques cellules de l'épithélium folliculaire à exprimer *upd*. Image d'une ovariole contrôle montrant un marquage par hybridation *in situ* permettant de visualiser les transcrits *upd*. Antérieur à gauche, postérieur à droite. D'après *McGregor et al., 2002*.

de maturation et les CP seront localisées à chaque pôle des follicules. Elles sont les seules cellules de l'épithélium folliculaire à produire et sécréter Upd, le ligand de la voie de signalisation JAK/STAT (Figure 21).

La perte de Delta (un des ligands de Notch) dans la lignée germinale et également la perte de Notch dans les précurseurs des CF entraînent la formation de follicules fusionnés dépourvus de CP et de CIF, indiquant que la voie de signalisation Notch est nécessaire dans le lignage CP/CIF pour l'encapsulation du cyste germinale (Bai and Montell, 2002; Grammont and Irvine, 2001; López-Schier and St Johnston, 2001). L'utilisation de lignées rapportrices de Notch a permis d'identifier que les trois populations de cellules épithéliales (CIF, CP et CF) présentaient différents niveaux d'activité de Notch au stade 1 de l'ovogenèse (Assa-Kunik et al., 2007). Les plus forts niveaux de Notch sont localisés dans les futures CP, les niveaux les plus faibles au niveau des futures CIF et les niveaux intermédiaires dans les CF. Une augmentation de l'expression de Delta dans les CF conduit à un excès de CP dans le follicule, ce qui suggère l'implication de la voie Notch dans la différenciation des CP. De plus, une analyse de clones mitotiques de perte de fonction de *delta* a révélé que les CIF sont absentes lorsque les CP du pôle antérieur sont mutantes, suggérant que les faibles niveaux d'activation de la voie Notch observés dans les CIF pourraient être dus à une faible expression de Delta par les CP localisées dans le pôle antérieur du follicule (Assa-Kunik et al., 2007).

Depuis leur spécification par Notch dans le germarium, les CP commencent à sécréter Upd et activent la voie de signalisation JAK/STAT dans les cellules voisines. Une surexpression d'Upd dans les CP conduit à une augmentation du nombre de CIF, suggérant que la voie JAK/STAT est requise pour la spécification des CIF. De plus, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre STAT92E a révélé une localisation nucléaire de ce facteur de transcription dans les CIF et cytoplasmique dans les CP et les CF au stade 1 de l'ovogenèse. Lorsque Notch est inhibée dans les CF par des clones mutants, STAT est transloqué au noyau dans les CF clonales à proximité des CP, tandis que dans les CF clonales éloignées des CP, STAT reste cytoplasmique, ce qui suggère que la voie Notch exerce un effet inhibiteur sur la

voie JAK/STAT. Par ailleurs, une diminution de l'activité JAK/STAT par de clones hypomorphes de Hop conduit à une augmentation de la signalisation Notch dans les CIF, ce qui est suffisant pour engendrer leur différenciation en CP (Assa-Kunik et al., 2007). Ces résultats mettent en évidence une régulation négative réciproque entre les voies JAK/STAT et Notch dans le germarium permettant la spécification des CIF et des CP (Assa-Kunik et al., 2007).

2. Différenciation des cellules folliculaires

Les CP jouent un rôle de centre organisateur de l'épithélium folliculaire au stade 7 de l'ovogenèse permettant la différenciation des différents types de CF terminales antérieures et le destin des CF terminales postérieures (Grammont and Irvine, 2002). Dans le pôle antérieur, Upd agit comme un morphogène, c'est-à-dire qu'un gradient décroissant d'Upd est établi à partir de la source, les CP, et les cellules dans lesquelles la voie JAK/STAT est activée se différencient différemment en réponse à la concentration d'Upd reçue. De cette façon, les CF juste à côté des CP se différencient en CB, celles d'après deviennent des cellules squameuses et celles qui suivent à ces dernières se différencient en cellules centripètes (Figure 20A) (Silver and Montell, 2001; Xi et al., 2003). Puisque Upd est sécrété apicalement par les CP, sa dispersion est influencée par le tissu adjacent, c'est-à-dire, par les cellules nourricières (Manning et al., 2015). Le contact entre deux cellules nourricières et l'épithélium folliculaire crée un interstice où s'accumule Upd, conduisant à une activation asymétrique de la voie JAK/STAT dans les CF. De plus, l'effet morphogène d'Upd est également régulé par des protéoglycans d'héparane sulfate (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs). Chez la drosophile, deux HSPGs de la famille des glypicans : dally et dally-like protein (Dlp) contrôlent plusieurs voies de signalisation dont Hedgehog, BMP, Wnt et JAK/STAT. En effet, des mutations dans ces deux gènes HSPGs, affectent l'activation de la voie JAK/STAT et donc perturbent la spécification des CF dans les stades tardifs de l'ovogenèse (Hayashi et al., 2012).

Dans le pôle postérieur, Upd n'agit pas comme un morphogène en raison d'une interaction de la voie JAK/STAT avec la voie du récepteur à l'EGF dans cette région. L'EGFR est localisé dans les CF

postérieures qui entourent l'ovocyte et est activé par le ligand Gurken qui est localisé dans la partie postérieure de l'ovocyte. La perte d'*Egfr* ou de *gurken*, conduit à la différenciation des CF postérieures, reproduisant le destin des CF antérieures (González-Reyes et al., 1995; Xi et al., 2003). L'activité de l'EGFR dans les CF postérieures requiert l'expression des facteurs de transcription *midline* (Mid) et *H15* (Fregoso Lomas et al., 2013). Cette expression est induite par l'interaction entre Gurken et Upd, impliquant la voie JAK/STAT canonique (Fregoso Lomas et al., 2016).

3. Migration des cellules de bordure

Au stade 9 de l'ovogenèse, 6 à 8 CB entourent les CP et migrent entre les cellules nourricières jusqu'à atteindre l'ovocyte (Figure 20A). La migration des CB constitue en soi un système modèle pour étudier toutes les étapes impliquées dans l'acquisition de comportements migratoires de cellules épithéliales, offrant ainsi un modèle de choix pour la formation des (Montell, 2003). La migration des CB joue un rôle fonctionnel pendant l'ovogenèse puisque ces cellules vont constituer la structure qui sert de point d'entrée du spermatozoïde et par conséquent est nécessaire pour la fertilité.

Le facteur de transcription Slbo codé par le gène *slow border cells*, est exprimé dans les CB avant et pendant leur migration. L'activation de la voie canonique JAK/STAT régule la transcription de Slbo. En effet, des mutations de n'importe quel composant de la voie JAK/STAT perturbe négativement l'expression de Slbo tandis que l'expression ectopique d'Upd ou de JAK la perturbe positivement. Dans les deux cas la migration des CB est affectée, engendrant une stérilité des femelles (Beccari et al., 2002; Silver et al., 2005).

Les CP sont localisées à l'intérieur du groupe des CB et secrètent Upd qui est requis durant toute la durée de la migration du groupe. Le mécanisme par lequel JAK/STAT contrôle la migration des CB reste encore méconnu mais des analyses *in vivo* ont révélé l'implication des molécules de polarité, de JA et du cytosquelette d'acto-myosine dans ce processus. Par exemple, l'expression des protéines Par6, Bazooka et de hauts niveaux de E-Cadhérine promeuvent la cohésion entre les cellules du groupe pendant leur migration (Cai et al., 2014; Pinheiro and Montell, 2004). Ces cellules bougent les unes

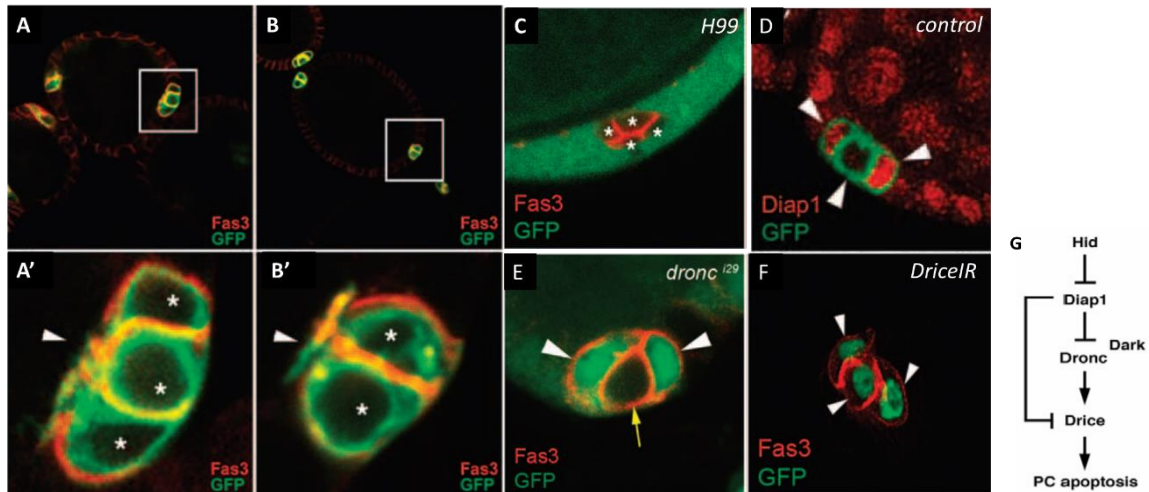


Figure 22. Les cellules polaires (CP) surnuméraires sont éliminées par la cascade canonique de l'apoptose. A-B' Des follicules contrôles (exprimant le transgène UAS-mCD8 :GFP dans les CP au pilote *upd-Gal4*) au stade 3 (A) et au stade 6 (B). Les CP sont marquées par Fas3 (rouge) et par la GFP (vert). A' et B' correspondent à des grossissements des régions indiquées en A et B respectivement. A partir du stade 5, tous les pôles des follicules contrôles contiennent 2CP. **C, E** Images des pôles des follicules à des stades tardifs montrant en C un groupe de CP mutantes pour *H99* (une délétion qui couvre les trois gènes de la famille RGH : *reaper*, *hid* et *grim*) et en E une CP mutante pour *dronc* (*droncⁱ²⁹*). Les clones sont marqués par l'absence de la GFP (vert) et les CP sont identifiées par la Fas3 (rouge) en C, E, F. **D** Image d'un pôle d'un follicule précoce contrôlé. Les CP sont identifiées par le marquage GFP (même génotype mentionné en A-B'). La protéine anti-apoptotique Diap1 (rouge) est absente dans la CP du milieu du groupe suggérant que les Caspases sont actives dans cette cellule. **F** Image d'un pôle d'un follicule tardif exprimant un ARNi dirigé contre le gène *drice* spécifiquement dans les CP. Un excès de CP dû à la diminution de la Caspase effectrice Drice est observé. **G** Schématisation de la cascade apoptotique des CP surnuméraires. D'après Khammari et al., 2011.

par rapport aux autres et émettent de protrusions d'Actine pour avancer vers l'ovocyte qui les attire par chemotaxis (Montell et al., 2012; Prasad and Montell, 2007). L'enrichissement de la Myosine et de son régulateur Rok à la périphérie du groupe contribuent également au maintien de sa forme comme unité, et à créer une tension corticale pour résister aux forces exercées par les cellules nourricières, permettant ainsi leur mouvement migratoire (Aranjuez et al., 2016).

4. Apoptose des CP surnuméraires

Les CP sont une population de cellules épithéliales qui sont produites en léger surnombre, 4 à 6 cellules par pôle aux stades précoces de l'ovogenèse. Ce nombre est réduit systématiquement à 2CP entre les stades 2 et 4, de telle façon qu'à partir du stade 5, tous les follicules contiendront 2CP à chaque pôle (Besse and Pret, 2003). Le choix entre les 2CP qui survivent et celles qui meurent se fait au niveau du germarium par un mécanisme dépendant de la signalisation Notch (Vachias et al., 2010). Spécifiquement, les deux CP destinées à survivre sont d'une part la CP qui est réfractaire à la signalisation Notch, et d'autre part celle qui présente au contraire les plus hauts niveaux d'activité de cette voie de signalisation parmi les cellules du groupe de CP. Mon équipe a montré que les CP en léger surnombre subissaient une mort cellulaire programmée activant la cascade canonique de l'apoptose (Figure 22A-G) (Khammari et al., 2011). Notamment, la perte de fonction des Caspases ou du facteur pro-apoptotique Hid par des approches clonales, par ARNi ou par l'utilisation de mutants, conduit à un excès des CP aux stades tardifs de l'ovogenèse. Ils ont également identifié que la CP qui va mourir se détache du domaine apical et s'arrondit progressivement jusqu'à disparaître. La transcription de *hid* est détectée uniquement lorsque la CP est arrondie, Diap1 est alors dérégulée et les Caspases sont activées conduisant à la dégradation de la CP. Ceci suggère que l'activation de la voie canonique de l'apoptose n'est pas requise pour les premiers événements de remodelage cellulaire des CP surnuméraires.

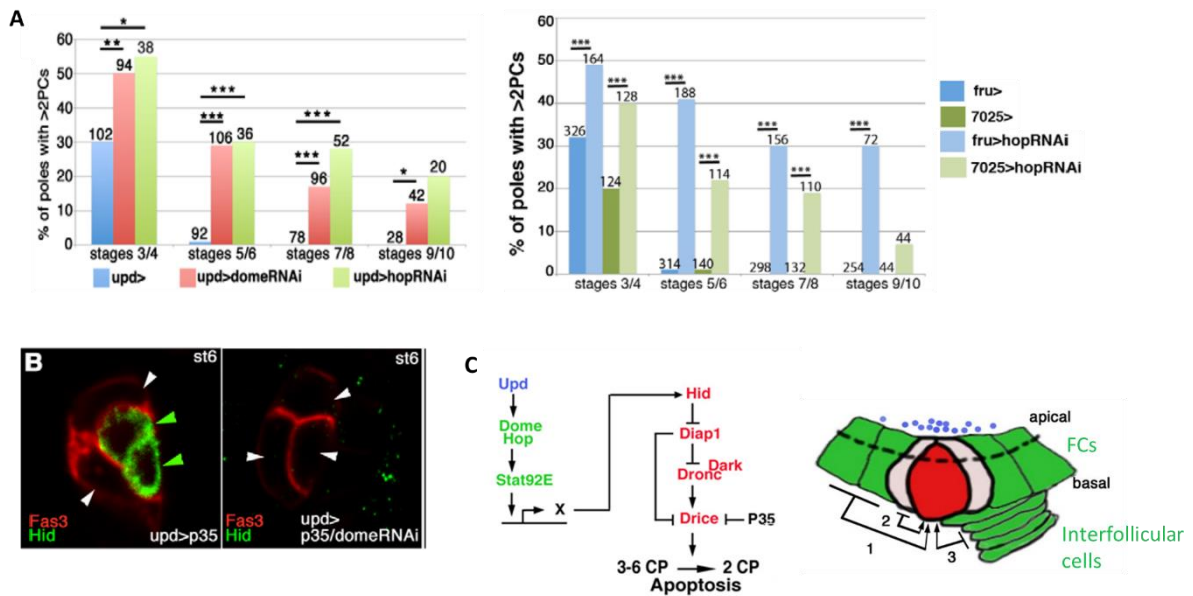


Figure 23. La voie de signalisation JAK/STAT est requise dans les CF, les CIF et les CP pour l'activation de la cascade apoptotique des CP surnuméraires. A) Quantification du pourcentage de pôles avec des CP surnuméraires au cours de l'ovogenèse pour les génotypes indiqués en dessous de chaque graphique. A gauche, la voie JAK/STAT est diminuée spécifiquement dans les CP grâce au pilote *unpaired-Gal4* (*upd>*). A droite, cette voie est diminuée spécifiquement dans les CF grâce au pilote *fruitless-Gal4* (*fru>*) et spécifiquement dans les CIF grâce au pilote *7025-Gal4* (*7025>*). Des CP surnuméraires sont présentes aux stades tardifs lorsque la voie de signalisation JAK/STAT est diminuée dans ces trois différentes populations cellulaires. **B)** Images des follicules au stade 6 marqués pour Fas3 et pour la protéine pro-apoptotique Hid (en vert, à gauche). Cette protéine n'est pas observée lorsqu'un ARNi dirigé contre *dome* est exprimé dans les CP (à droite). Hid peut uniquement être détecté dans un contexte d'inhibition de Caspases via p35. **C)** Modèle proposé par le laboratoire dans lequel l'activation de JAK/STAT dans les différentes populations de l'épithélium folliculaire génère un signal de retour vers les CP surnuméraires pour activer leur apoptose. D'après Borensztein et al., 2013.

Mon équipe a également mis en évidence que la voie de signalisation JAK/STAT était requise de façon autonome et non-autonome cellulaire pour l'élimination des CP surnuméraires (Figure 23A-C) (Borensztejn et al., 2013). La diminution ou l'absence des composants de la voie JAK/STAT dans les CP, dans les CF ou dans les CIF conduit à une survie prolongée des CP surnuméraires, comme conséquence de l'inhibition de la cascade apoptotique dans ces dernières cellules (Figure 23A-C). Ces résultats ont permis de relier la signalisation JAK/STAT avec l'apoptose au cours de l'ovogenèse chez la drosophile. Ils suggèrent que l'expression d'Upd pourrait être nécessaire pour réguler négativement la production du ligand en induisant l'apoptose des CP surnuméraires et en diminuant par conséquent le nombre de cellules qui produisent le ligand de la voie JAK/STAT. De plus, ils permettent de proposer un modèle dans lequel la production du ligand par les CP entraînant l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT dans les différentes populations de l'épithélium folliculaire génère un signal de retour (de nature encore inconnue) vers les CP surnuméraires pour activer leur apoptose (Figure 23C). Cependant, ce modèle n'écarte pas la possibilité que des forces mécaniques pourraient être à la base de cette mort cellulaire programmée.

La voie de signalisation JAK/STAT est requise durant toute l'ovogenèse. Différents comportements cellulaires se mettent en place en réponse au gradient du morphogène Upd. Les CP constituent le centre organisateur de la chambre à œuf puisqu'elles sont l'unique source de sécrétion d'Upd dans l'épithélium folliculaire. Leur nombre est aussi important, il est contrôlé par une mort cellulaire programmée dans les stades précoces de l'ovogenèse. L'élimination des CP surnuméraires par extrusion apoptotique est ainsi un bon modèle pour étudier le rôle potentiel suggéré de la voie de signalisation JAK/STAT dans des changements de forme cellulaire nécessaires à l'extrusion.

PROJET DE THESE : LIEN ENTRE SIGNALISATION JAK/STAT, REMODELAGE CELLULAIRE ET EXTRUSION D'UN GROUPE DE CELLULES EPITHELIALES DANS L'OVAIRE DE DROSOPHILE.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à déterminer comment la voie de signalisation JAK/STAT régulait l'élimination des CP surnuméraires de façon spatio-temporelle dans l'épithélium folliculaire de la drosophile. En utilisant l'imagerie confocale en temps réel ainsi que sur des tissus fixés, j'ai commencé par caractériser précisément les changements de forme du groupe des CP associés à l'extrusion des CP surnuméraires au cours du temps.

Puisque nous avons vu que la voie de signalisation JAK/STAT était impliquée dans divers évènements de morphogenèse chez la drosophile ainsi que dans d'autres modèles, je me suis demandée si cette voie régulait l'apoptose ou bien plutôt le processus de morphogenèse préalable à l'extrusion des CP en cherchant à déterminer à quel moment du processus d'élimination des CP la voie JAK/STAT était requise.

Ensuite, en utilisant une approche gènes candidats, j'ai effectué des perturbations génétiques de différentes molécules connues pour être impliquées dans le remodelage de la forme cellulaire afin de savoir si elles étaient impliquées dans l'extrusion des CP. Pour cela j'ai perturbé l'expression de la Myosine, de la Cadhérine et de différents régulateurs du réseau d'Actine dans les CP et/ou dans les CF et j'ai analysé l'effet de ces perturbations sur l'élimination des CP. Puisque nous avons vu que ces protéines pouvaient agir sur la morphogenèse des tissus épithéliaux selon différentes modalités, j'ai également évalué la dynamique de certaines de ces molécules en temps réel afin de déterminer si elles se trouvaient dans des états particuliers dans de cellules des follicules ovariens.

Finalement, comme des liens ont été établis entre la voie de signalisation JAK/STAT et le réseau d'acto-myosine mais que les mécanismes de cette régulation restent encore inconnus, je me suis demandée si la voie JAK/STAT régulait ces molécules de façon autonome et non-autonome cellulaire pour l'extrusion des CP surnuméraires et si oui par quel mécanisme.

RESULTATS

Dans la première partie de ma thèse, j'ai visé à répondre à deux questions : 1) Quels sont les évènements de remodelage cellulaire que subissent les CP au cours de l'élimination des CP surnuméraires ? 2) Quel est le lien entre la cascade apoptotique en jeu (Khammari et al., 2011) et les évènements de remodelage cellulaire au cours de l'élimination des CP surnuméraires ? 3) Pour quels évènements de remodelage la voie de signalisation JAK/STAT est-elle requise ? Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article actuellement soumis. Cet article est intitulé : "Programmed epithelial cell extrusion in the *Drosophila* ovary requires JAK/STAT dependent cell remodeling prior to apoptosis "

En utilisant la microscopie confocale en temps réel et sur des tissus fixés, j'ai caractérisé une séquence stéréotypée d'évènements de remodelage cellulaire qui a lieu dans le groupe de CP et qui précède l'extrusion apoptotique des CP surnuméraires. J'ai montré qu'avant de rentrer en apoptose, la CP surnuméraire se voyait enveloppée complètement par les autres CP. Au cours de ce processus, la CP qui est isolée réduit progressivement sa surface apicale et ses contacts avec les CF voisines et perd aussi ses contacts avec les cellules germinales et la lame basale. Ce remodelage des CP dure plusieurs heures au cours desquelles la cellule est totalement enveloppée et légèrement détachée par rapport à la surface apicale de l'épithélium folliculaire. Il est suivi par un déclenchement de l'apoptose matérialisé par l'expression de Hid et d'un rapporteur de sa transcription uniquement dans l'état isolé/détaché, suivi d'une extrusion latérale rapide de la CP surnuméraire sous la forme de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques migrent indépendamment les uns des autres entre les CF voisines, puis finissent par être internalisés et dégradés par plusieurs de ces CF. Nous avons montré que la voie de signalisation JAK/STAT est requise de façon autonome et non-autonome cellulaire pour les premiers évènements de remodelage des CP. Mes résultats permettent de proposer un modèle dans lequel l'élimination des CP surnuméraires procède en trois étapes, la voie de signalisation JAK/STAT étant requise lors de la première étape : 1) un remodelage cellulaire, 2) l'activation de la cascade apoptotique suivi de la production de corps apoptotiques et 3) la phagocytose des corps apoptotiques par les CF voisines.

1 Title: **JAK/STAT signaling is necessary for cell monosis prior to epithelial cell apoptotic**
2 **extrusion**

3

4

5

6

7 Authors: Alba Yurani Torres¹, Marianne Malartre¹, Anne-Marie Pret^{1,2} and François Agnès¹

8 ¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud,
9 Université Paris-Saclay 91198 Gif-sur-Yvette, France

10 ² Université de Versailles St Quentin-en-Yvelines, UFR des Sciences, 78035 Versailles,
11 France

12

13 Correspondence: F Agnès and A.M Pret, I2BC, Bât 21, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-
14 sur-Yvette, France Tel: 33 169824682; E-mail: francois.agnes@i2bc.paris-saclay.fr ; [15 \[marie.pret@i2bc.paris-saclay.fr\]\(mailto:marie.pret@i2bc.paris-saclay.fr\)](mailto:anne-</p></div><div data-bbox=)

16

17

18

19

20

21

22 **Abstract**

23 Epithelial cell extrusion is crucial for proper development and tissue homeostasis. Using high-
24 resolution 3D reconstruction and 4D imaging, we have identified a novel extrusion modality
25 for the elimination of specialized somatic cells from the follicular epithelium in the *Drosophila*
26 ovary. We show here that Polar Cells (PCs) to be eliminated from the follicular epithelium are
27 always fully enveloped by PC neighbors, laterally, apically, in conjunction with highly-
28 reinforced adherens junctions, and basally. The PC to be eliminated thus loses all contact with
29 follicle cells, germline cells and the basement membrane in a process we have called cell
30 "monosis", for cell "isolation" in Greek. PC monosis always precedes, and is independent of
31 activation of apoptosis. In contrast, monosis requires JAK/STAT signaling non cell-
32 autonomously within the follicular epithelium. Shortly after monosis is complete, PC apoptotic
33 corpses are formed and extruded laterally within the epithelium to be engulfed by surrounding
34 follicle cells. This study therefore shows the non cell-autonomous impact of an epithelium, via
35 JAK/STAT signaling activation, on cell morphogenesis events leading to apoptotic extrusion.
36 In addition, new extrusion modalities are revealed here. Cell monosis and lateral extrusion
37 within an epithelium. It is likely that high-resolution 3D and 4D imaging will demonstrate that
38 these modalities can be generalized to other cases of epithelial cell extrusion.

39

40

41

42 **Introduction**

43 Cell extrusion is a process by which single cells are removed from an epithelium. It is
44 crucial for tissue morphogenesis and homeostasis. Its perturbation leads to loss of epithelial
45 integrity and has severe consequences on development and health¹, leading to epithelial
46 pathologies, including hyper-immune response in asthma, coeliac disease and irritable bowel
47 syndrome, pathogenic bacterial infection, tumor cell invasion and metastasis. A few studies
48 conducted in various developmental models and in cell culture have described the cell
49 remodeling events occurring during epithelial cell extrusion. These studies indicate a diversity
50 of extrusion modalities including either live or apoptotic cell extrusion and different types of
51 cell-cell contact exchanges^{2,3,4}. Epithelial cells can extrude apically or basally with a potential
52 role for basal epithelial cell extrusion in tumor formation^{5,6,7}. A role for acto-myosin
53 contraction, which can take place in the cell to be extruded or in the surrounding epithelial cells,
54 has also been reported^{8,9,10}. Although real-time imaging has been used in some of these studies,
55 high 3D resolution and non-induced cell extrusion models are lacking to fully comprehend the
56 cell remodeling events occurring at the cellular and tissue levels during cell extrusion. In
57 addition, how signaling between cells allows coordination of these events in an epithelium
58 remains largely unknown^{11,12}.

59 JAK/STAT signaling is highly conserved between *Drosophila* and mammals, both
60 structurally and functionally¹³, and its misregulation has important implications in human
61 health¹⁴. In the adult *Drosophila* ovary, JAK/STAT activity within the somatic mono-layered
62 follicular epithelium surrounding the germline cysts has been shown to control several
63 epithelial morphogenetic events. Polar Cells (PCs) located at the poles of each follicle secrete
64 the cytokine Unpaired (Upd), which activates JAK/STAT signaling in the surrounding follicle
65 cells (FCs) throughout oogenesis¹⁵. Between stage 7 and 9, JAK/STAT activity is necessary in
66 the vicinity of PCs for border cells recruitment, epithelial-mesenchymal transition and

67 migration between nurse cells, which represents a model of invasive cell migration¹⁵⁻¹⁷.
68 Between stage 2 and 4, groups of 3 to 6 PCs reduce their number to exactly two cells by
69 apoptosis¹⁸. We showed that JAK/STAT activity is required both in PCs and neighboring FCs
70 to trigger activation of the Hid-Diap1-Caspase apoptotic pathway in the supernumerary
71 PCs^{19,20}. On the other hand, selection of the polar cell pair destined to survive relies on a two-
72 step Notch-dependent mechanism²¹.
73 Here we reveal for the first time the precise cell remodeling events leading to PC elimination
74 as well as new extrusion modalities. For this, we used 3D high-resolution image analyses of
75 both fixed tissues and living tissues in real-time. The first modality is a cell isolation step in
76 which the PC to be eliminated is fully enveloped by its PC neighbors, thus becoming isolated
77 from the surrounding FCs and the germline cells. We have termed this process "monosis", for
78 "isolation" in Greek. Cell monosis is followed by lateral extrusion of PC apoptotic corpses in
79 the follicular epithelium, which become engulfed and digested by neighboring FCs.
80 Furthermore, our results also show that JAK/STAT signaling drives PC monosis non cell-
81 autonomously, which constitutes a prerequisite to achieve apoptotic extrusion.

82

83

84

85

86

87

88

89 **Results**

90 **PCs to be eliminated go through cell monosis, a full envelopment by their neighbors**

91 Cell remodeling events occurring during elimination of supernumerary PCs were characterized
92 using high-resolution confocal images acquired from top view (objective 2, Figure 1a) and
93 processed for 3D renditions. Follicles were immunostained for Fascilin 3 (Fas3), a marker of
94 lateral membranes that is upregulated in PCs. The analysis was performed primarily on groups
95 of three PCs since these were the most frequent and specific configurations were systematically
96 recovered. This allowed us to propose a stereotyped sequence of remodeling steps
97 characterizing a whole envelopment of the PC to be eliminated by the two other PCs followed
98 by cell shrinkage (Figure 1a-e, Movie 1). In the "initial state", the three PCs presented radial
99 symmetry (Figure 1b and Movie 1). PC-PC and PC-FC interface lengths at the mid-lateral level
100 (Figure 1b',b'') were similar for the three PCs (Figure 1i,i'). No visible criterion was thus
101 available at this step to identify the supernumerary PC fated to die. Next, in the "partial
102 envelopment state", two PCs began to wrap the third PC, which was no longer equivalent to the
103 other two (Figure 1c-c'' and Movie 1). Reduction of PC-FC junction length was observed for
104 one PC (o3), while the other two displayed increased PC-FC contact length, illustrating the
105 envelopment process (o1 and o2) (Figure 1i'). In the following "full lateral envelopment state",
106 the central PC lost all contacts with FCs (Figure 1d-d'' and Movie 1). The two outer PCs
107 completely surrounded it, forming new vertices (Figure 1d'-d'' and i'). Following this, in the
108 "apical detachment state", the laterally-enveloped PC became fully covered apically by the two
109 enveloping PCs, leading to the loss of apical attachment of the enveloped PC (Figure 1e and
110 Movie 1). At this stage, the basal attachment was not removed yet by the envelopment process
111 (Figure 1e'-inset, Supplementary Figure 1b,c). After PC envelopment, in the "shrinkage stage",
112 the fully embedded PC presented a reduced size (Figure 1f). This stage was rarely observed,
113 suggesting that it is a fast process. Groups of four or more PCs, although much less represented,

114 were also analyzed and the envelopment process was similar (Figure 1g,g'-h,h' and
115 Supplementary Figure 1b,b'). Taken together, these data reveal the steps of the whole
116 envelopment process of supernumerary PCs by their neighboring PCs. We have named it
117 monosis as PCs destined to die become fully isolated from other cells within the tissue (Model
118 in Figure 8a).

119

120 **Adherens junctions are reinforced during supernumerary PCs monosis**

121 We used an E-Cadherin:GFP (E-Cad:GFP) line to visualize subapical adherens junctions
122 (AJs) and characterize cell remodeling events occurring in the apical domain during PC
123 envelopment (Figure 2a-d and a'-d', Movie 2). E-Cad:GFP accumulation was higher at subapical
124 PC-PC interfaces than at PC-FC and FC-FC interfaces during the envelopment process (Figure
125 2a'-d'''), with the highest levels between the PC being enveloped and its two PC neighbors
126 (Figure 2a''-d'' and Movie 2). This is thus the first molecular marker predicting the PC apoptotic
127 fate before significant cell remodeling has occurred (Figure 2a',a'', red asterisk). The same
128 result was obtained using immunostaining with antibodies directed against E-Cad
129 (Supplementary Figure 1a,a',b,b'). Armadillo and Bazooka, respectively the β -catenin and Par3
130 *Drosophila* homologs, were also enriched specifically in the sub-apical domain of the PC being
131 enveloped, precisely at the two PC interfaces (Supplementary Figure 1c-g). AJs in the sub-
132 apical domain are therefore reinforced between PCs during the envelopment process. Later on,
133 when the fully embedded supernumerary PC reaches the shrinkage stage, E-Cad staining was
134 lower and the protein was homogeneously distributed throughout the cortex of the dying cell
135 (Supplementary Figure 1b,b'). Our data thus show that remodeling of the apical domain during
136 supernumerary PC envelopment involves the formation of reinforced AJs with neighboring PCs
137 prior to apical detachment and shrinkage (see model, Figure 8a,b).

138

139 **Both apical and basal constrictions occur during supernumerary PCs monosis**

140 PC subapical, lateral and basal surface areas were analyzed during PC envelopment,
141 using ECad:GFP and Fas3 markers. Significant decrease of the subapical domain, but not the
142 lateral domain, was found for the PC to be eliminated relative to the two surviving PCs (Figure
143 2e-f). The basal cell area was also reduced both at the full lateral envelopment and apical
144 detachment stages (Figure 1d', inset and data not shown). The PC to be eliminated therefore
145 constricts both in its sub-apical and basal domains, while the lateral domain does not reduce in
146 size during the envelopment process. Our results hence suggest that supernumerary PC monosis
147 involves apical and basal constrictions prior to detachment and shrinkage (Figure 8a,b).

148

149 **The number of follicle cell contacts is reduced during supernumerary PC monosis**
150 **until no contact with FCs remains**

151 We next determined the number of PC-FC contacts during PC monosis using
152 ECad:GFP. At the initial state, each PC formed subapical contacts with two or more FCs, where
153 subapical domains defined 4, 5 or 6-sided polygons (4SP, 5SP, 6SP, Figure 2a'-a''' and data not
154 shown). Next, the PC being partially enveloped formed subapical contacts with one or two FCs
155 defining domains with 3SP or 4SP shapes (Figure 2b-b'''). When the PC is fully laterally
156 enveloped, it has finally lost all contacts with FCs forming a 2SP (lens-shaped) subapical
157 domain (Figure 2c-c'''). Upon apical detachment, as evidenced by the new subapical contact
158 formed between the enveloping PCs (Figure 2d',z1), the detaching PC maintained a 2SP
159 subapical domain which had sunken to a lower level (Figure 2d',z2). The same sequence of
160 progressive loss of FC contacts also occurs in all the groups at the lateral domain of the PC to
161 be eliminated (Figure 2a-d).

162

163 **PC monosis requires several hours whereas apoptotic extrusion occurs quickly**

164 Real-time imaging was conducted on stage 3-4 follicles from ECad:GFP flies also
165 carrying a Pleckstrin Homology Domain:CherryFP (PH:ChFP) transgene. This allowed us to
166 characterize PC remodeling events at the AJs level and to determine overall cell shape changes
167 of both PCs and surrounding FCs. Imaging of the entire volume of PC groups over several hours
168 enabled us to confirm the sequential order of remodeling events we had deduced from fixed
169 tissues analysis. In addition, they also provided the timing for the different phases. The initial
170 state to full lateral envelopment phase revealed transitions from the 4SP to the 2SP shapes
171 encompassing a total period of about four hours (Figure 3a-c and Movie 3; n=2 films). During
172 this period, the supernumerary PCs subapical surface areas progressively decreased, while that
173 of the two outer PCs did not exhibit oscillating size changes (Figure 3d and Movie 3).

174 Real-time imaging also allowed visualizing the extrusion events occurring upon
175 completion of PC monosis, which had not been possible using fixed-tissue analysis. Groups of
176 three PCs at the detached stage but still possessing a 2SP subapical structure were filmed,
177 revealing that the ECad:GFP-enriched structure did not change for more than four hours (Figure
178 4a-a' and Movie 4; n=2 films). The three PCs exhibited similar dynamic cell shape changes and
179 area size oscillations during this time period (Figure 4a-d). Lateral surface areas of the isolated
180 PCs had not reduced in size yet (Figure 4i). Then, the enveloped PC completed subapical
181 surface area reduction (sealing, Figure 4d'), while the basal surface began to reduce (Figure 4a"-
182 d") to complete its constriction during the extrusion (Figure 4e"-g"). Strikingly, only within a
183 few minutes (3-6 min) after sealing, protuberances from the enveloped PC started to form and
184 extrude laterally, out of the two enveloping PCs. They next grew in size while remaining in
185 continuity with the enveloped PC, which concomitantly reduced and eventually collapsed
186 (Figure 4e-h and Movie 4). These results indicate that, while the detachment step was long (>
187 4h), the destruction phase begun just minutes after full reduction and collapse of the subapical
188 domain, suggesting that completion of envelopment may trigger the apoptotic phase.

189

190 **PC apoptotic corpses are extruded laterally within the epithelium and engulfed by**
191 **surrounding follicle cells**

192 Real-time imaging also revealed for the first time the fate of the PC apoptotic corpses.
193 Once laterally expelled within the follicular epithelium, these are engulfed by neighboring FCs
194 (Figure 5a-f, Movie 5; n=4 films). Some apoptotic corpses were fully internalized by
195 immediately adjacent FCs within about 1h of extrusion, while other migrated past the adjacent
196 FCs to be engulfed by a FC not in contact with the PC group within about 2h (Figure 5a-e). In
197 both cases, the complete elimination of engulfed apoptotic material took several hours (Figure
198 5f). PC apoptotic material engulfed by FCs was also observed in fixed tissues using a Par3:GFP
199 fusion protein specifically expressed in PCs (Figure 5g-g"). Par3:GFP accumulated in not yet
200 engulfed Fas3⁺ apoptotic corpses, and in globular Fas3⁺ apoptotic remnants present in the
201 cytoplasm of adjacent FCs (Figure 5g'-g"). Therefore, FCs behave as macrophages to eliminate
202 apoptotic corpses.

203

204 **PC monosis does not require the activation of the apoptotic cascade**

205 We previously reported that supernumerary PCs die through apoptosis via the
206 transcriptional upregulation of *hid* and consequent posttranslational downregulation of Diap1,
207 leading to caspase activation¹⁹. In the present study, we wished to determine when the apoptosis
208 cascade was activated with respect to the remodeling steps of the PC extrusion process. We
209 found that both Hid protein and *hid* transcription (as evidenced by a *hid-lacZ* reporter transgene)
210 were detected only when supernumerary PC monosis was already complete (Figure 6a-d, a'-d'
211 and Movie 6). This was also the case for Diap1 protein downregulation (Figure 6e-e") and
212 caspase activation (Figure 6f-f, g-g"). The use of four different markers therefore indicated that
213 the apoptosis cascade was active only after the supernumerary PC was fully enveloped.

214 Next, we inhibited caspase activity by expressing p35 specifically in PCs. As previously
215 reported, under these conditions many follicle poles exhibited more than 2PCs after stage 5
216 (63%, n=611 compared to 1% in controls, n=658). We found that the majority of these 3PC and
217 4PC groups (52%, n=458 and 59%, n=88, respectively) contained supernumerary PCs that had
218 already rounded-up and shrunk (Figure 6h-h''', Supplementary Figure 3a-c). Therefore,
219 inhibiting caspase activity did not block primary PC remodeling steps but later apoptotic
220 expulsion.

221 Using 3D reconstructions, we next quantified the proportion of apical PC shapes (5SP-
222 2SP and detached) observed upon p35-mediated caspase inhibition. At early stages (3-5), there
223 was no obvious difference between p35-expressing and control PC groups (Figure 7d).
224 However, during later stages (6-9), a significantly higher proportion of p35-expressing PC
225 groups with supernumerary cells had undergone cell monosis and were detached apically
226 (Figure 7e). Therefore, inhibiting caspase activity did not impede the early monosis and apical
227 detachment processes but blocked later elimination of supernumerary PCs. Altogether, these
228 results indicate that the apoptosis cascade involving Hid, Diap1 and Caspases, is dispensable
229 for the early remodeling steps of the PC group.

230 Since AJ components have been shown to be targets of caspase activity²², we compared
231 Ecad accumulation in PCs in which caspase activity was inhibited by p35 to that of controls.
232 Whereas p35 expression in PCs did not seem to affect apical Ecad accumulation during the
233 early PC remodeling steps (data not shown), it led to abnormally high accumulation of Ecad in
234 shrinking supernumerary PCs (Figure 6i-k). This result suggests that AJs are lost in
235 supernumerary PCs during the apoptotic phase in a caspase-dependent manner (Figure 6l).

236

237 **JAK/STAT signaling is necessary for PC monosis prior to apoptotic extrusion**

238 As previously reported²⁰, RNAi-mediated reduction of Upd in the follicle resulted in
239 prolonged survival of supernumerary PCs late into oogenesis (58%, n=397) as compared to the
240 control (0.5%, n= 508). We hence wished to determine which step of PC elimination was
241 affected in these conditions. For this, shapes of 3PC-containing groups were classified as
242 attached, detached or round in 2D (Supplementary Figure 3a). Up to stage 5, a higher proportion
243 of supernumerary PCs were found in the attached configuration in Upd depleted follicles
244 (Supplementary Figure 3b-left graph). From stage 6 onwards, supernumerary Upd-deficient
245 PCs remained attached (59%, n=257), while very few proceeded to the round and shrinking
246 stage (7%, n=257) (Supplementary Figure 3b-right graph). Similar results were obtained in 4
247 PC groups (Supplementary Figure 3c) and in follicles depleted for Stat92E specifically in PCs
248 or in FCs (Figure 7f-g and data not shown). Together, these results indicate that the activity
249 of the JAK/STAT pathway is necessary for the primary PC remodeling events to occur
250 efficiently.

251 We next analyzed PC monosis in different contexts of JAK/STAT signaling reduction
252 (*upd-Gal4>upd-RNAi* and *fru-Gal4>Stat92E-RNAi*). Up to stage 5, supernumerary PCs were
253 still in contact with FCs (\geq 4SP and 3SP states) in a majority of cases (76%, n=34), as opposed
254 to controls (37%, n=41) (Figure 7d,h). However, progressive reduction in the subapical surface
255 area was still observed upon Upd inhibition (Figure 7c). At later stages, 34% of groups (n=41)
256 were found blocked in the remodeling phase in Upd-deficient follicles (Figure 7b, Movie 7).
257 Their distribution was shifted towards the more advanced remodeling states (2SP and apically-
258 detached), resembling the distribution observed in early control oogenesis stages (Figure 7d-e).
259 We observed a stronger block in primary PC remodeling states (\geq 4SP and 3SP) upon RNAi-
260 mediated inhibition of *Stat92E* in FCs, both at early and late stages of oogenesis (Figure 7f-h,
261 Movie 8). Finally, clonal analysis using two different *stat92E* null alleles also showed that loss
262 of *stat92E* in either PCs or FCs led to prolonged survival of supernumerary PCs blocked during

263 early monosis (Supplementary Figure 2 and data not shown). Altogether these results
264 demonstrate that JAK/STAT signaling is required for the early PC remodeling events occurring
265 during cell monosis.

266 **Discussion**

267 This study has identified a highly-stereotyped process of developmentally-programmed
268 epithelial cell extrusion with striking features. First, a long phase of cell remodeling (>7h) with
269 no signs of apoptosis or cell shrinkage takes place. This phase involves the full envelopment of
270 the PC to be eliminated by its PC neighbors, which then become isolated from follicle cells,
271 germline cells, and the basement membrane. We have thus termed this process cell "monosis",
272 for "isolation" in Greek. Second, a quick apoptotic phase (<1h) occurs. Strikingly, the PC
273 apoptotic corpses are expelled laterally within the follicular epithelium, only few minutes after
274 apical domain collapse. Finally, a third long (>7h) clearance phase follows, during which
275 apoptotic corpses are engulfed by neighboring FCs and fully eliminated over several hours.

276 Our results suggest a functional link between the CP remodeling events and the
277 activation of the apoptosis cascade. At least two mechanisms can be proposed to explain how
278 PC monosis could trigger apoptosis. PCs to be eliminated transit from a primary prismatic to a
279 spherical shape. This state may be sensed by the cell as a higher internal pressure, which could
280 be translated into a signal for *hid* transcriptional activation. Similarly, mechanical pressure has
281 been reported to induce specific gene transcription in the *Drosophila* embryo²³, and cell
282 crowding can induce live cell extrusion in vertebrates via a stretch receptor signal
283 transduction^{2,3}. Alternatively, PCs which become fully isolated upon monosis might not receive
284 trophic/survival signals leading to apoptosis activation, in accordance with the trophic model
285 for cell survival³³.

286 The reinforcement of AJs between PCs during monosis may be important before
287 extrusion. Similarly, an active role for AJs in tissue remodeling, including cell extrusion, has
288 been reported^{24,25}. During the later apoptotic shrinking phase, AJ components are lost in a
289 caspase-dependent manner, which is in agreement with studies indicating that AJ components
290 are bona fide caspase substrates^{22,26-28}.

291 A parallel can be drawn between the cell monosis process and cases of cells wrapping
292 around other cells in various biological processes. For instance, glial cells insulate axons to
293 ensure fast and reliable transmission of action potentials²⁹. In the *Drosophila* pupal
294 ommatidium, the four central cone cells become progressively surrounded laterally by two
295 enwrapping primary pigment cells, which isolate them from secondary and tertiary pigment
296 cells³⁰. In *Drosophila* late stage follicles, the surviving PC pair will be surrounded by a group
297 of 6-8 FCs (border cells), and then be transported passively at the center of the group by outer
298 border cells that adopt invasive migratory properties^{15,31}. Cell monosis as a preparation for
299 epithelial cell extrusion has not been described elsewhere. It is possible that this is because
300 other extrusion events within complex tissues have not been characterized with sufficiently
301 high-resolution 3D reconstruction and 4D imaging.

302 Cases of both apical and basal epithelial cell extrusion have been reported⁵⁻⁷, but this is
303 to our knowledge the first example of lateral extrusion in an animal epithelial tissue. We expect
304 this mode of extrusion not to be a unique process but to depend on specific tissue constraints.
305 In the case of PCs for example, pressure may be exerted apically from the growing germline
306 cyst and basally from the presence of the basement membrane, leading to lateral extrusion.
307 Further study of cell extrusion and tissue remodeling events occurring in human gastrointestinal
308 or ovarian epithelium tissues, where cells are intensely renewed, would be of great interest.
309 This would allow testing the universality of cell monosis and lateral cell extrusion and could
310 provide important insights for future cancer drug development.

311 The live imaging system we developed also clearly revealed the fate of the dying
312 supernumerary PCs. Some apoptotic corpses were engulfed and completely digested by
313 immediately adjacent FCs, while other corpses travelled further away within the epithelium to
314 be engulfed by more distant FCs. This confirms that FCs have proficient clearance properties

315 since they are also responsible for the uptake of nurse cell and oocyte remains upon nutritional-
316 dependent egg chamber degeneration³².

317 Finally, our results showed that JAK/STAT signaling is required for cell remodeling
318 events occurring prior apoptosis. Monosis is thus a prerequisite to activate the apoptotic cascade
319 in the supernumerary PCs, leading to lateral extrusion of apoptotic corpses (Fig. 8). Indeed,
320 there is no expression of apoptotic markers during the long cell monosis phase and blocking the
321 apoptotic cascade did not block the early cell monosis events but rather the later formation of
322 apoptotic corpses for expulsion. In contrast, PC monosis was inhibited upon reduction of
323 JAK/STAT signaling such that largely unremodeled PC groups with supernumerary PCs
324 showing no signs of apoptosis were maintained until at least stage 10 of oogenesis (40h longer
325 than in controls). These results therefore support a model in which the JAK/STAT pathway is
326 active whereas the apoptotic cascade is inactive during primary PC remodeling events. Later,
327 caspase-dependent downregulation of AJ components possibly facilitates the extrusion of PC
328 apoptotic corpses.

329 In recent years, the highly-conserved tumorigenic JAK/STAT pathway has been
330 implicated in epithelial morphogenesis both in *Drosophila* and in mammals for the
331 development of many different organs^{13,14,34,35}. However, the cellular and molecular
332 mechanisms underlying these processes and the specific target genes involved remain largely
333 unknown. Future work on JAK/STAT signaling in PCs and surrounding FCs will address these
334 questions.

335

336

337 **Materials and methods**

338 ***Drosophila* stocks and genetics**

339 Strains carrying the following transgenes were used in this study: UAS-mCD8:GFP (chr. II),
340 UAS-p35 (chr. II), UAS-Par3:GFP (kindly provided by Antoine Guichet), P (PZ) *hid*⁰⁵¹⁴ (Hid
341 lacZ enhancer trap), E-Cad:GFP^{KI} (knock-in, Huang et al, 2011), E-Cadh:GFP^{KI}, ubi-
342 PH:mChFP (chr. II) (kindly provided by Y. Bellaiche). Strains carrying RNAi constructs from
343 VDRC (Vienna, Austria) collections were UAS-upd-RNAi (3282) and UAS-stat92ERNai
344 (43866). The *upd-Gal4*¹⁹ and *fruitless-Gal4*²⁰ enhancer traps were used to specifically target
345 PCs and FCs, respectively. TubP-Gal80^{ts} (chr. II) (kindly provided by Jacques Montagne) was
346 used to avoid embryonic lethality associated with expression of *UAS-Stat92E-RNAi* in FCs. All
347 crosses targeting PCs were conducted at 25°C until mid-pupariation. Then, they were placed at
348 29°C and dissected four or five days after eclosion. For crosses involving Gal80^{ts}, they were
349 conducted at 18°C until eclosion and then, shifted to 29°C until dissection four or five days
350 later.

351

352 **Immunohistochemistry**

353 Ovary dissections were performed according to²⁰ except that Triton 0.3X was used instead of
354 Tween-20 and nuclei were stained with DAPI (1 ng/ml final concentration). The following
355 primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-Fas3 (1:20, DSHB, 7G10), rat anti-E-
356 Cad (1:50, DSHB, DCAD2), rabbit anti-Par3 (1:500, Andreas Wodarz), rabbit anti-GFP
357 (1:500, Interchim), rabbit anti-human cleaved caspase 3 (1:20, Ozyme), guinea pig polyclonal
358 anti-Hid (1:100, a gift from D. Ryoo, New York University, USA), mouse monoclonal anti-
359 Diap1 (1:200, B. Hay laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA),
360 rabbit polyclonal anti-β-galactosidase (1:200, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). The

361 Alexa Fluor anti-rabbit (488) and anti-rat (647) secondary antibodies (Molecular Probes) were
362 used at 1:200 and anti-mouse-Cy3 (Jackson Immunoresearch) was used at 1:100.

363

364 **Microscopy and figure montages**

365 Confocal images in Figures 2, 3, 4, 5 were captured with a Leica TSC SP8 microscope using
366 LAS X software. Confocal images in Figures 1, 6, 7 and Supplementary Figures 1 and 2 were
367 taken with a Nikon eclipse TE 2000-U microscope using the EZ-C1 3.30 software. Confocal
368 images stacks were exported in original format and processed using FIJI software. All images
369 were then processed further using Photoshop CS5 (Adobe) software.

370

371 **Egg chamber culturing and live imaging**

372 In order to address the dynamics of the PC remodeling events in real time, we adapted a system
373 for live imaging that was initially designed for late ovarian follicles³⁶. We established culture
374 conditions allowing imaging of young follicles over long periods of time (up to 10h), which
375 was essential since supernumerary PC elimination turned out to be a lengthy process. The
376 number of movies obtained was limited by the fact that young follicles in ovariole cultures were
377 infrequently positioned appropriately for real-time imaging (see Figure 1a). Also due to the
378 length of time needed for PC elimination and the fact that small young follicles (< 50 μm
379 diameter) were not always stationary, the entire sequence of events was captured on separate
380 films, each covering overlapping parts of the full sequence. In order to preserve stages 3-4 egg
381 chambers, extraction was performed by anteriorly pulling stages 9-10 egg chamber. Removal
382 of the muscular sheath enveloping the ovariole was a critical step. Its gentle disruption was
383 performed using a tungsten needle. Dissected ovarioles were transferred onto a micro-glass
384 slide and mounted in 50 μl medium containing insulin (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) on a Lumox dish (Sarstedt,
385 946077410) sealed with carbon oil, to allow gas exchanges. Confocal image stacks of stages 3-

386 4 egg chambers with more than two PCs were acquired for several hours. Due to the location
387 of PCs at egg chamber poles, and the fact that successive egg chambers are connected to each
388 other at the poles, mounted ovarioles most often presented PCs with the apical-basal axis
389 parallel to the XY plane of view from the objective (objective 1 Figure A1). Therefore imaging
390 of the apical domain of the PCs over time necessitated 3D renditions of deep stack acquisitions
391 of the follicles with $0.3 < z \text{ step} < 0.5 \mu\text{m}$. Since imaging over long periods greatly affects
392 fluorescent signals, this type of acquisition did not allow filming of PC over sufficient durations.
393 However, some follicles were oriented such that the apical-basal axis of the PCs was along the
394 XZ plane of view from the objective (objective 2, Figure 1A), greatly facilitating stack
395 acquisitions. For Figure 3, eight films of different durations each separated by 5 minutes were
396 concatenated. Image stacks of 20 slices ($0.5 \mu\text{m}$ z steps) were acquired at 5 minutes time
397 intervals. For Figures 4 and 5, image stacks of 10 slices ($1 \mu\text{m}$ z steps) were taken every 1.5
398 minutes.

399

400

401

402 **Image treatments using FIJI software**

403 Confocal image stacks were processed with FIJI software (All platforms, no JREs). Reslices
404 and 3D renditions, necessary for certain orientations of the PC group (objective 1, Figure 1A),
405 were made in order to determine area and shape of PCs except when PC orientation did not
406 require them (objective 2, Figure 1A). Z slice projections were of 1 slice (Figures 4-5, z step:
407 $1 \mu\text{m}$), 2-3 consecutive slices (Figures 1-2, 6-7, z step: $0.2\text{-}0.5 \mu\text{m}$) and 5 consecutive slices
408 (Figure 3, z step: $0.5 \mu\text{m}$). 3D projections were of 30-40 consecutive slices (Figure 1 and 7, z
409 steps: $0.2 \mu\text{m}$). For Figure 3, the focal plane with the highest intensity of E-Cad:GFP signal (at
410 the subapical adherens junction domain) was selected for each image stack at all time points

411 and a (+2/-2) sub-stack was extracted using a macro written and kindly provided by Y.
412 Bellaïche. Resulting five image stacks were projected using SUM slices. To compensate for
413 global tissue movements and make PC tracking simpler, we used the Fiji plug-in “StackReg”.

414

415 **PC shape quantifications**

416 Image stacks of supernumerary PC groups were cropped and treated if necessary either for
417 reslicing or 3D rendering in order to determine their respective shapes in the apical domain
418 using E-Cadherin:GFP accumulation. 4SP-2SP nomenclatures were used for PCs with ≥ 4 to 2
419 contacts with FCs (including 2PC contacts). Supernumerary PCs were considered detached
420 when the E-Cadherin:GFP positive lens-shape structure was found beneath an apical contact
421 between enveloping PCs. Apical domain area measurements were made from image stack
422 reslices or 3D renditions using the freehand selection of ImageJ. In Figures 2g and 6i, bars
423 correspond to the mean of three different measures of apical domain surface areas for
424 supernumerary PCs and in Figure 6J for the 2PCs destined to survive. Error bars correspond to
425 Standard Deviation (SD) of the different PC areas found by shape category (Figures 2G and 6I)
426 or by stage (Fig 6J). Figure 2H corresponds to the mean area of three different measures for
427 the apical domain of PCs destined to die over the mean area of three different measures for the
428 apical domain of the 2PCs destined to survive for each shape category.

429

430 **Statistical analysis**

431 For Figures 1i-i', 2e,f 7c normal distribution was tested with Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov)
432 normality test. One-way ANOVA post-hoc Tukey contrasts were performed to compare sample
433 means. For Figure 6k, E-Cadherin:GFP sample means intensities were contrasted using
434 Welch's t-test. All statistical analysis was performed with R version 3.2.1. Significance for the

435 statistical test was coded in the following way based on the p-values: * : $0.01 < p < 0.05$; **
436 : $0.001 < p < 0.01$; *** : $0 < p < 0.001$.

437 **Acknowledgments**

438 We are grateful to Y Bellaïche, A Guichet, B Hay, HD Ryoo, A Wodarz for providing us with
439 antibodies and fly stocks without which this work could not have been carried out. We are
440 grateful to D. Montell and W. Dai for their critical reading of the manuscript. We also warmly
441 thank Y. Bellaïche for providing us a FIJI macro. We acknowledge the Developmental
442 Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at the University of Iowa
443 (UAS). We acknowledge the Flybase. AY Torres was funded by a doctoral fellowship from the
444 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was financed by the
445 Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), the Université Paris-Saclay, the Université
446 Paris-Sud and the Université de Versailles St Quentin-en-Yvelines.

447

448 **Conflict of interest:**

449 The authors declare that there are no competing financial interests in relation to the work
450 described.

451

452 **Author contribution:**

453 AMP and FA conceived and designed project. AYT, FA, MM performed experiments. AYT,
454 MM, AMP, FA analyzed data. AYT and FA set-up live imaging system. AYT performed
455 statistical analyses. AMP and FA wrote manuscript. FA assembled artwork. AYT and MM
456 edited manuscript and artwork.

457

458

459 **References**

- 460 1. Gudipaty, S. A. & Rosenblatt, J. Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies.
 461 *Semin. Cell Dev. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.semcdb.2016.05.010
- 462 2. Eisenhoffer, G. T. *et al.* Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic
 463 cell numbers in epithelia. *Nature* **484**, 546–549 (2012).
- 464 3. Marinari, E. *et al.* Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit
 465 tissue overcrowding. *Nature* **484**, 542–545 (2012).
- 466 4. Muliylil, S., Krishnakumar, P. & Narasimha, M. Spatial, temporal and molecular
 467 hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Development* **138**, 3043–
 468 3054 (2011).
- 469 5. Slattum, G. M. & Rosenblatt, J. Tumour cell invasion: an emerging role for basal
 470 epithelial cell extrusion. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 495–501 (2014).
- 471 6. Gu, Y. *et al.* Defective apical extrusion signaling contributes to aggressive tumor
 472 hallmarks. *eLife* **4**, e04069 (2015).
- 473 7. Marshall, T. W., Lloyd, I. E., Delalande, J. M., Näthke, I. & Rosenblatt, J. The tumor
 474 suppressor adenomatous polyposis coli controls the direction in which a cell extrudes from an
 475 epithelium. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3962–3970 (2011).
- 476 8. Rosenblatt, J., Raff, M. C. & Cramer, L. P. An epithelial cell destined for apoptosis
 477 signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.*
 478 *CB* **11**, 1847–1857 (2001).
- 479 9. Kuipers, D. *et al.* Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and
 480 then by their neighbours. *J. Cell Sci.* **127**, 1229–1241 (2014).
- 481 10. Monier, B. *et al.* Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding.
 482 *Nature* **518**, 245–248 (2015).
- 483 11. Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R. & Rosenblatt, J. Epithelial cell extrusion requires
 484 the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J. Cell Biol.* **193**, 667–676 (2011).
- 485 12. Manjón, C., Sánchez-Herrero, E. & Suzanne, M. Sharp boundaries of Dpp signalling
 486 trigger local cell death required for Drosophila leg morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **9**, 57–63
 487 (2007).
- 488 13. Arbouzova, N. I. & Zeidler, M. P. JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into
 489 conserved regulatory and cellular functions. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 2605–2616 (2006).
- 490 14. Amoyel, M., Anderson, A. M. & Bach, E. A. JAK/STAT pathway dysregulation in
 491 tumors: a Drosophila perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**, 96–103 (2014).
- 492 15. Silver, D. L. & Montell, D. J. Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway
 493 activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. *Cell* **107**, 831–841 (2001).
- 494 16. Silver, D. L., Geisbrecht, E. R. & Montell, D. J. Requirement for JAK/STAT signaling
 495 throughout border cell migration in Drosophila. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 3483–3492 (2005).
- 496 17. Naora, H. & Montell, D. J. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from
 497 disparate model organisms. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 355–366 (2005).
- 498 18. Besse, F. & Pret, A.-M. Apoptosis-mediated cell death within the ovarian polar cell
 499 lineage of Drosophila melanogaster. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 1017–1027 (2003).
- 500 19. Khammari, A., Agnès, F., Gandille, P. & Pret, A.-M. Physiological apoptosis of polar
 501 cells during Drosophila oogenesis is mediated by Hid-dependent regulation of Diap1. *Cell*
 502 *Death Differ.* **18**, 793–805 (2011).
- 503 20. Borensztein, A., Boissoneau, E., Fernandez, G., Agnès, F. & Pret, A.-M. JAK/STAT
 504 autocontrol of ligand-producing cell number through apoptosis. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 195–
 505 204 (2013).
- 506 21. Vachias, C., Couderc, J.-L. & Grammont, M. A two-step Notch-dependant mechanism
 507 controls the selection of the polar cell pair in Drosophila oogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **137**,

- 508 2703–2711 (2010).
- 509 22. Kessler, T. & Müller, H. A. J. Cleavage of Armadillo/beta-catenin by the caspase DrICE
510 in *Drosophila* apoptotic epithelial cells. *BMC Dev. Biol.* **9**, 15 (2009).
- 511 23. Farge, E. Mechanical induction of Twist in the *Drosophila* foregut/stomodaeal
512 primordium. *Curr. Biol. CB* **13**, 1365–1377 (2003).
- 513 24. Baum, B. & Georgiou, M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment,
514 maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* **192**, 907–917 (2011).
- 515 25. Lubkov, V. & Bar-Sagi, D. E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic
516 cell extrusion. *Curr. Biol. CB* **24**, 868–874 (2014).
- 517 26. Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J. & Schneider, C. Dismantling cell-cell
518 contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-
519 catenin. *J. Cell Biol.* **139**, 759–771 (1997).
- 520 27. Chandraratna, D., Lawrence, N., Welchman, D. P. & Sanson, B. An in vivo model of
521 apoptosis: linking cell behaviours and caspase substrates in embryos lacking DIAP1. *J. Cell*
522 *Sci.* **120**, 2594–2608 (2007).
- 523 28. Andrade, D. & Rosenblatt, J. Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion.
524 *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **16**, 491–501 (2011).
- 525 29. Fields, R. D. in *Encyclopedia of Human Behavior (Second Edition)* 255–260 (Academic
526 Press, 2012).
- 527 30. Larson, D. E., Liberman, Z. & Cagan, R. L. Cellular behavior in the developing
528 *Drosophila* pupal retina. *Mech. Dev.* **125**, 223–232 (2008).
- 529 31. Manning, L. A., Weideman, A. M., Percy, B. E. & Starz-Gaiano, M. Tissue landscape
530 alters adjacent cell fates during *Drosophila* egg development. *Nat. Commun.* **6**, 7356 (2015).
- 531 32. Etchegaray, J. I. *et al.* Draper acts through the JNK pathway to control synchronous
532 engulfment of dying germline cells by follicular epithelial cells. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 4029–
533 4039 (2012).
- 534 33. Hombria, J. C.-G. & Sotillos, S. JAK-STAT pathway in *Drosophila* morphogenesis.
535 *JAK-STAT* **2**, (2013).
- 536 34. Wells, R. E. *et al.* Control of tissue morphology by Fasciclin III-mediated intercellular
537 adhesion. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 3858–3868 (2013).
- 538 35. Prasad, M., Jang, A. C.-C., Starz-Gaiano, M., Melani, M. & Montell, D. J. A protocol
539 for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging. *Nat. Protoc.* **2**,
540 2467–2473 (2007).
- 541 36. Spradling, A. C. in *Developmental genetics of oogenesis* (1993).

543

544

545

546

547

548 **Figure legends**

549 **Figure 1. PCs to be eliminated are fully enveloped by adjacent PCs before rounding-up**
550 **and shrinking. a)** Schematic representation of a germarium at the anterior tip of an ovariole
551 and its associated stage 2-7 follicles. In each follicle, a germline cyst composed of nurse cells
552 (nc) and an oocyte (oo) are in white, surrounded by a monolayered epithelium of somatic
553 follicular cells (fc) in green, with apical towards the germline. Follicles are separated from each
554 other by a stalk of somatic interfollicular cells in green. The duration of each follicle stage is
555 indicated above the ovariole³⁶. Polar cells (PCs) within the follicular epithelium at follicle poles
556 are in red. PCs are produced in excess upon follicle formation (up to six cells per follicle pole;
557 ^{18,19}) and then reduced by apoptosis to two cells at all follicle poles between stage 1 within the
558 germarium (not shown) and stage 5. Microscope objective drawings (1 and 2) indicate the
559 orientation of the views for analysis of PC groups with (1) being called a side view in which
560 apical is oriented to the top for images in all the figures corresponding to this viewpoint and (2)
561 a top view in which the apical-basal axis is parallel to observers viewpoint. **a')** Schematic
562 representation of the JAK/STAT signaling pathway in *Drosophila* (left) that we have shown to
563 be necessary for activation of the apoptotic cascade within supernumerary PCs²⁰. Unpaired
564 (Upd) is a demonstrated cytokine-like ligand that binds the Domeless receptor (Dome) thereby
565 recruiting the sole *Drosophila* Janus Kinase or JAK, called Hopscotch (Hop), and activating
566 the sole *Drosophila* transcription factor STAT, called Stat92E. Via an as yet uncharacterized
567 mechanism (X), JAK/STAT signaling allows transcriptional activation of the IBM(IAP Binding
568 Motif)-containing pro-apoptotic factor Hid which leads to downregulation of the anti-apoptotic
569 factor *Drosophila* Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (Diap1) and activation of the initiator caspase
570 Dronc, requiring the activity of its co-factor Dark/Apaf1, and of at least one executing caspase
571 Drice²⁰. Caspase activity can be blocked by the Baculovirus protein p35.

572 **(b-e)** 3D reconstructions of confocal stack top views (see objective 2 in **a**) of groups of 3 PCs
573 immunostained for the membrane protein Fasciclin 3 (Fas3). A putative temporal sequence of
574 events is ordered from **(b-e)** as indicated at the top of the columns from initial, partial
575 envelopment, full lateral envelopment, to apical detachment states (see supplementary Movie
576 1). Red arrowheads (**d,e**) point to the limit between the subapical domain of enveloped PCs and
577 the apical domain devoid of Fas3. The inset in **(e)** presents an apical lateral slice of the
578 corresponding 3D reconstruction indicating the contact between the two PCs that have covered
579 the enveloped PC apically as evidence by high Fas3 accumulation (red arrowhead) and the rest
580 of the apical perimeter of these two cells with lower levels of Fas3 (white arrows). **(b'-e')** A
581 lateral slice of each 3D projection in **(b-e)**. Asterisks indicate the PCs being enveloped by the
582 two other PCs **(c'-e')**. The inset in **(e')** presents a lateral slice of the corresponding 3D
583 reconstruction indicating the basal domain of the enveloped PC (asterisk), which has not
584 detached as yet. **(f)** Confocal side view of a group of 3 PCs (see objective 1 in **a**) showing a
585 round and shrunk PC in the group marked with an asterisk and **(f')** a 3D reslice of confocal
586 stack corresponding to **(f)** indicating that the round, shrunk PC (asterisk) is enveloped by its
587 two PC neighbors. **(b''-f'')** Drawings of panels **(b'-f')** indicating PC-PC interfaces (i in green,
588 for the initial state and for the other states, i1 in green between the two surviving PCs, i2 and i3
589 in red between the PC being enveloped and the two enveloping PCs) and PC-FC interfaces (o
590 in grey for the initial state, o1 and o2 in light and dark blue for the two enveloping PCs and o3
591 in grey for the PC being enveloped). Arrows in **(d'')** point to the positions at which the i1 and
592 o3 interfaces have disappeared as compared to **(c'')**. **(g,h)** 3D reconstructions of confocal stacks
593 of 4 PC-containing groups. In **(g)**, one supernumerary PC is fully enveloped laterally while the
594 second one is in an initial state indistinguishable from the other two PCs. In **(h)**, both
595 supernumerary PCs are fully enveloped laterally by the other two PCs. Red arrowheads **(g,h)**
596 point to the limit between the subapical domain of enveloped PCs and the apical domain devoid

597 of Fas3. (**g',h'**) Single confocal lateral slices from the 3D reconstructions in (**g,h**). Asterisks
598 indicate the enveloped PCs. Scale bars: 5 μm except for (**e'**) 2.5 μm . (**i-i'**) Quantifications of
599 PC-PC and PC-FC interface lengths using the symbol and color codes presented in (**b''-e''**).
600 The 3PC-containing groups at the three steps of the phase (n=31) were ordered according to the
601 decrease in the o3 PC-FC interface of the supernumerary PC being enveloped for both. In the
602 initial state, the supernumerary PC to be eliminated cannot be distinguished from the other two
603 PCs so the PC-PC and PC-FC interfaces lengths (green bars) and PC-FC (grey bars) are given
604 the same color code. (**i**) In the initial state, the PC-PC interface lengths were averaged to
605 simplify the representation in the graph (o*). Comparisons of i vs i2/i3 average and o vs o1/o2
606 average lengths distribution between the three different categories (initial to full lateral
607 envelopment) show significant statistical differences, $p=8.57^{e-05}$ and $p=1.55^{e-04}$, respectively.

608

609 **Figure 2. Envelopment of supernumerary PCs involves progressive apical constriction**
610 **and loss of FC contacts associated with reinforced AJ. (a-d)** E-Cad:GFP stage 3-4 follicles
611 carrying the ECad:GFP knock-in transgene were immunostained for Fas3 and GFP. Projections
612 are presented of confocal slices through the lateral domain of 3 PC-containing groups from top
613 views (see objective 2 in Figure 1a) which indicate the different states of envelopment. White
614 asterisks point to the FCs in contact with PCs. Supernumerary PCs which are enveloped are
615 indicated by red asterisks. (**a'-d'**) Projections of confocal slices of the same PC groups as in (**a-**
616 **d**) which presented the highest levels of ECad:GFP in the PC being enveloped (corresponding
617 to the subapical domain of this cell). ECad:GFP in the PC being enveloped subapical domain
618 delimited 4 sided-, 3-sided and 2-sided (or lens-shaped) polygons (4SP,3SP,2SP- red asterisks)
619 as envelopment of the supernumerary PC produced progressive reduction in the number of cell
620 contacts with FCs (white asterisks). In **d'**, z1 presents a subapical slice of the two enveloping
621 PC forming a new contact, while z2 is a slice that is 0.3 μm lower than z1 where the presence

622 of the lens-shaped ECad:GFP domain of the supernumerary PC indicates it has detached
623 apically. (**a''-d''**) Images in (**a'-d'**) panels treated with a royal color code. The calibration bar
624 is shown in (**d''**); blue indicates the lowest and white the highest intensities. (**a'''-e'''**)
625 Schematics of images in (**a'-d'**). The different PC/PC contacts (i1-i3) are drawn in red except
626 for i1 in (**b''**) which had a shorter length than in (**d''**). PC-FC and FC-FC outlines are in grey.
627 Yellow dots materialize all vertices. During apical detachment (**d''**), the most apical portion of
628 the cell destined to die (red lines) is beneath the surface of the two enveloping PCs. (**f,g**) Ratios
629 of the apical and lateral surface areas, respectively, of the supernumerary PC being enveloped
630 over those of its adjacent PCs as a function of the state of envelopment. n = the total number of
631 groups of 3 PCs analyzed per point. *** p=0.001, ** p=0.00595, * p=0.01206.

632

633 **Figure 3. Real-time imaging of the early steps in supernumerary PC envelopment. (a-c)**
634 Three individual frames of a 5h live time-lapse confocal image acquisition of a group of 3PCs
635 within the follicular epithelium of a stage 3 follicle expressing ECad:GFP (GFP detection in
636 shades of grey). t=0 corresponds to >2 hours from the beginning of image acquisition of the
637 cultured follicle. PCs are identified by higher ECad:GFP accumulation at a subapical level
638 compared to their FC neighbors (as observed from an objective 2 position, see Figure 1a). The
639 PC being enveloped is indicated with an asterisk and the two enveloping PCs with arrows.
640 Three FCs have been false colored in pink, blue and green. The PC being enveloped first has
641 two FC and two PC interfaces (**a-4SP**), then one FC and two PC interfaces (**b-3SP**) and finally
642 only two PC interfaces (**c-2SP** or lens shape). The arrowheads point to the i1 PC-PC interface
643 (see Figure 1c"), which progressively reduces until disappearing. Scale bars: 5 μ m. (**d**) Graph
644 plotting subapical cell surface areas as delimited by ECad:GFP in the supernumerary PC being
645 enveloped (blue) and surrounding PCs (red and green) at different times of the Supplementary
646 movie 3 corresponding to (**a-c**).

647

648 **Figure 4. Real-time imaging of supernumerary PC fragmentation and lateral expulsion of**

649 **apoptotic corpses. (a-h)** Individual frames of live time-lapse confocal image acquisitions

650 covering 67min of >10h of image acquisitions of a stage 3 follicle expressing ECad:GFP and

651 PH:chFP. Lateral, subapical and basal slices (a-h, a'-h' and a''-h'', respectively) are presented

652 through a group of 3 PCs within the follicular epithelium using the objective 2 viewpoint (see

653 Figure 1a). The supernumerary PC that is fully laterally enveloped by two adjacent PCs

654 (asterisk in **a**) and apically detached (data not shown) presents a 2SP or lens-shaped subapical

655 domain as delimited by ECad:GFP (**a'**), as in Figure 2d'z2 and Supplementary Figure 1c''z2.

656 (**a**) The first frame corresponds to 3h25 min after the beginning of image acquisition of the

657 cultured follicle. The scale bar represents 5 μm and is the same for all the images. (**a'-d'**) Apical

658 surface reduction of the supernumerary PC (arrow in **a'-d'**) is observed until sealing of this

659 domain into a line (**d'**), which was considered as time $t=0\text{min}$. (**e-h**) At $t=+4\text{min}30$, lateral

660 expulsion of a first apoptotic corpse within the follicular epithelium is observed (**e**-arrowhead).

661 At few minutes later, at $t=+9\text{min}$, a second apoptotic corpse is expelled (**f**-bottom arrowhead)

662 and by $t=+27\text{min}$ the enveloped supernumerary PC has collapsed and its contents is within the

663 expelled apoptotic corpses (**h**). (**a''-h''**) Full basal cell surface area sealing was also observed

664 (compare a''-f'' to g'',h'', arrows) and it occurred after complete apical cell surface reduction and

665 the beginning of extrusion of apoptotic corpses (g'' $t=+15\text{min}$). (**i**) Graph plotting lateral cell

666 surface areas of the supernumerary PC (blue) and surrounding two PCs (red and green) from

667 127min before apical detachment (2SP) to apical detachment (or sealing).

668

669 **Figure 5. Apoptotic corpses are engulfed and digested by neighboring FCs. (a-f)** Frames

670 of live time-lapse confocal image acquisition of a stage 3 follicle expressing PH:chFP beginning

671 61min30 after apical detachment of the supernumerary PC and covering the following 710min.

672 Lateral slices are presented through a group of 3 PCs within the follicular epithelium using the
673 objective 2 viewpoint (see Figure 1a). Asterisks indicate the two surviving PCs, arrows mark
674 the two expelled apoptotic corpses between FCs and arrowheads the apoptotic corpses once
675 engulfed by a neighboring FC. Scale bar: 5 μ m. **(d-f)** The two engulfed apoptotic corpses
676 decrease in size within the FCs and finally disappear (between **e** and **f**). **(g-g'')** Subapical, lateral
677 and more basal confocal image projections taken from the viewpoint of objective 2 (see Figure
678 1A) of a follicle pole from fixed tissue (*upd-Gal4>UAS-par3:GFP*) immunostained for Fas3
679 and GFP to visualize Par3. Scale bar: 5 μ m. **(g')** Debris from a PC apoptotic corpse, marked by
680 Fas3 and Par3:GFP is detected inside a FC (**g'**, arrowhead) adjacent to a PC pair marked by
681 strong Fas3 membrane accumulation. **(g'')** An extruded apoptotic corpse is found at a more
682 basal level marked with both Fas3 and Par3:GFP (arrow).

683

684 **Figure 6. Molecular and functional evidence for a PC apoptotic phase occurring after PC**
685 **envelopment and apical detachment phases. (a-h)** 3-5 PC-containing groups immunostained
686 for the PC membrane Fas3 marker. 3D reconstruction top views of stacks of confocal images
687 **(a,b-objective 2 Figure 1a)** and corresponding lateral slice projections **(a',b')**, confocal
688 projections **(c,e,f,g,h')** and 3D reconstructions **(h)** from side views (see objective 1 Figure 1a)
689 and corresponding XZ reslices **(e',e'',f',f'',g',g'',h'-h''')** at the levels indicated by the
690 horizontal bars in **(e,f,g,h')**. **(a-h)** Asterisks indicate PCs that are participating to envelopment
691 of a supernumerary PC. **(a-d,h)** All PCs express the casapse inhibitor p35 using the *upd-Gal4*
692 and *UAS-p35* transgenes. **(a',b')** show Hid immunostaining, **(c,d)** *hid-lacZ* transcriptional
693 reporter expression, **(e-e'')** specific absence of Diap1 immunostaining and **(f-f'',g-g'')** caspase
694 activation, only in enveloped supernumerary PCs. **(h-h''')** A stage 7 follicle expressing the
695 caspase inhibitor p35 in PCs (presence of the *upd-Gal4* and *UAS-p35* transgenes) exhibits
696 prolonged survival of supernumerary PCs that have already been enveloped and are round and

697 shrinking. **(i,j)** Early stage control (upd-Gal4/UAS-mcD8:GFP) and upd-Gal4/UAS-p35/UAS-
698 mcD8:GFP follicle with > 2 PCs immunostained for Fas3 and endogenous ECad. Two different
699 lateral projections (Z1 and Z2, objective 1 side view in Figure 1a) for each PC group is shown
700 **(i,i',j,j')**. The supernumerary PCs at different states of rounding-up and shrinking are indicated
701 with asterisks and these show low levels of ECad in the control compared to the high levels in
702 the caspase-inactivated case. **(k)** Box-plots of ECad mean intensity in control apoptotic
703 (average diameter: 2.9 μm) and p35-expressing blocked (average diameter: 4.7 μm)
704 supernumerary PCs. Mean intensity was calculated for each cell or corpse as the average of
705 ECad signal intensity within the area delimited by Fas3 staining in all the slices of the confocal
706 image stacks. Genotypes are the same as in **(i,j)**. *** $p=5.05\text{e-}06$. **(l)** Schematic model showing
707 temporal caspase-dependent targeting of ECad during the apoptotic phase. In the control
708 situation to the left, the supernumerary PC being enveloped is in the middle with its interfaces
709 with the two other PCs drawn in dark green at the level of the subapical AJ and in light green
710 at the lateral-basal interfaces. ECad is much lower once the supernumerary PC has been
711 remodeled, rounding up and shrinking. Depletion of caspase activity with p35 blocks at the
712 rounded-up and shrinking state and ECad levels remain high. Therefore, ECad may be a target
713 of caspase-dependent degradation only at the late apoptotic phase.

714

715 **Figure 7. JAK/STAT signaling is necessary for the supernumerary PC remodeling phase**
716 **leading to apoptosis.** Subapical **(a,b)** and lateral **(a',b')** slices from confocal image stacks taken
717 from the top view (see objective 2 in Figure 1a) for control and *upd*-RNAi expressing stage 7
718 follicles immunostained for the PC membrane marker Fas3 and an E-Cad:GFP fusion protein
719 from a knock-in construct. These images are schematized in **(a,a',b,b')** with the PC-PC contacts
720 indicated in red and green and denoted i1-i3 as in Figure 1, while PC-FC and FC-FC contacts
721 are in grey. At stage 7, the control follicle presents a pair of PCs (asterisks **a1,a1'**), while at this

722 same stage, the *upd*-RNAi follicle presents a group of 3 PCs with the supernumerary PC just
723 beginning to be enveloped at the 4SP state subapically (**b,b'**) and 5SP state laterally (**b1,b1'**-
724 enveloping PCs are indicated by an asterisk). Scale bars: 5 μ m. (c) Ratio of the subapical surface
725 area as determined by E-Cad:GFP accumulation between enveloped and surrounding PCs in
726 *upd*-RNAi follicles. (d,e,h) Bar graphs presenting the number of supernumerary PCs exhibiting
727 different subapical domain shapes (\geq 4SP, 3SP, 2SP/lens) as determined by E-Cad:GFP
728 accumulation from groups of 3, 4 and 5 PCs (green, red and blue bars respectively). (d,e)
729 Control: *upd-gal4/+; E-Cad:GFP/+*. p35: *upd-gal4/+; E-Cad:GFP/UAS-p35*. updRNAi: *upd-*
730 *gal4/+; E-Cad:GFP/UAS-upd-RNAi*. (h) Control: *E-Cad:GFP/+; fruitless-gal4/+*. statRNAi:
731 *tub-gal80^{ts}/+; E-Cad:GFP/UAS-Stat92E-RNAi; fruitless-gal4/+*. "early" corresponds to
732 oogenesis stages 2-5 and "late" to stages 6-10. (f) 3D reconstruction of a confocal stack of
733 images from a side view (objective 1, Figure 1A) of a group of 4PCs from a stage 7 *stat92E-*
734 *RNAi (fruitless-Gal4>UAS-Stat92E-RNAi)* follicle immunostained for the PC membrane
735 marker, Fas3. (g) Single confocal slice from (f) with horizontal lines indicating the level of the
736 reslices presented in (g'-g''').

737

738 **Figure 8. Model for JAK/STAT-mediated remodeling of supernumerary PCs triggering**
739 **apoptotic elimination of these cells.** Schematic drawings based on results from analysis of
740 fixed and living ovarian follicles. Groups of PCs are shown in which the supernumerary PC to
741 be eliminated is represented in pink or by blue interrupted lines when fully surrounded by its
742 neighboring PCs, the pairs of surviving PCs are in brown and FCs in white. The subapical
743 reinforced AJ composed of E-Cad, Arm/ β -Catenin and Par3 are indicated in green. (a) 3D side
744 views (see objective 1 in Figure 1a) and (b) 2D top views (see objective 2 in Figure 1a) of a
745 group of 3 PCs undergoing the sequential sequence of events leading to elimination of the
746 supernumerary PC with the timing of the steps indicated below. Results indicate that

747 JAK/STAT signaling is necessary for a lengthy remodeling phase (several hours), which leads
748 to full envelopment of the supernumerary PC by its PC neighbors, including apically, such that
749 apical detachment of this cell occurs. Minutes after the subapical adherens junction domain of
750 the supernumerary PC seals, closely followed by the sealing of the basal domain, the apoptotic
751 phase is activated such that the supernumerary PC rounds-up, shrinks and fragments into
752 apoptotic corpses which are expelled laterally into the follicular epithelium (taking <1h).
753 Engulfment by neighboring FCs only takes about one hour but full elimination of
754 supernumerary PC material within the FCs takes several hours.

755

756 **Supplementary figure legends**

757 **Supplementary Figure 1. Accumulation of adherens junction components at PC-PC**
758 **interfaces.** All follicles presented are at stages 3-4. **(a,b,c)** 3PC **(a,c)** and 4 PC **(b)** groups from
759 confocal slice projections taken from side views (see objective 1 in Figure 1a) immunostained
760 for Fas3 (red) to mark PC membranes and for E-Cad (green) and GFP (green) to detect
761 Par3:GFP targeted in PCs (with *the upd-Gal4* driver). Remodeling states of the supernumerary
762 PCs (asterisks) are indicated. **(a'-c')** Indicates strong accumulation of these two adherens
763 junction components sub-apically. **(c'')** Orthogonal reslices of **(c')**. z1 presents the apical
764 surface of the two enveloping PCs, while z2 is a slice that is 0.3 μ m lower than z1 where the
765 presence of a lens-shaped Par3:GFP domain of the supernumerary PC indicates its apical
766 detachment. **(d-f)** Projections of sub-apical and **(d'-f')** lateral confocal slices taken from a top
767 view (see objective 2 in Figure 1a) of 3PC-containing groups at the indicated steps of the
768 remodeling phase immunostained for Fas3 and Par3:GFP (as in **a-c**). Par3:GFP accumulates at
769 high levels at the PC-PC interfaces of the supernumerary PC (asterisks) and delimits the same
770 subapical domain polygonal shapes **(d-f** - 5SP, 3SP and 2SP) as ECad (Figure 2). The i1,i2,i3
771 interfaces are the same as those defined in Figure 1. **(g-g'')** E-Cad:GFP knock-in expressing

772 3PC-containing group immunostained for Armadillo/ β -Catenin (Arm-magenta), GFP and Fas3
773 (green). (g) 3D reconstruction of confocal image stack taken from a top view (see objective 2
774 in Figure 1a). Arrows point to the interfaces between the enveloped supernumerary PC and the
775 two enveloping PCs. (g') Sub-apical confocal slice from (g) with an asterisk marking the sub-
776 apical domain accumulating Arm in a 2SP or lens shape as E-Cad in Figure 2). Scale bars: 5
777 μm , except e,e',g',g'': 2.5 μm . Genotypes (a,b): *upd-gal4/+*. (c-f): *upd-gal4/+; UAS-Par3:GFP*;
778 (g-g''): *upd-gal4/+; E-Cad:GFP/+*.

779

780 **Supplementary Figure 2. JAK/STAT activity is required in surrounding PCs for**
781 **envelopment of the supernumerary PCs.** (a,b) Confocal slice projections taken from a side
782 view (see objective 1 in Figure 1a) of 3PC-containing groups at late stages of oogenesis (stages
783 6 and 8) identified by Fas3 membrane immunostaining and containing *stat92E¹⁶⁸¹* and *stat92E³⁹⁷*
784 null mutant clones marked by absence of GFP immunostaining. Since none of the PCs in each
785 group show apical detachment at these late stages, then the presence of *stat92E* mutant PCs leads
786 to a block in this remodeling event. (a1-a2, b1-b2) Orthogonal sections corresponding to the
787 levels indicated by horizontal lines 1 and 2 in (a,b) indicate that in each case the supernumerary
788 PC is partially enveloped by the other two PCs (asterisks). Therefore, the presence of *stat92E*
789 mutant PCs has blocked the remodeling process of these groups of 3 PCs early, during the
790 enveloping process.

791

792 **Supplementary Figure 3. Quantification of the effects of JAK/STAT and caspase inhibition**
793 **on supernumerary PC remodeling.** (a) Schematic drawings of 2D side views (see objective 1
794 in Figure 1a) of 3PC-containing groups with the supernumerary PCs in attached, apically
795 detached or round/shrunk configurations defined by a color code to be used in graphs. Arrow
796 points to the newly-formed contact between the two surviving PCs upon apical detachment of

797 the supernumerary PC. (b,c) Percentage of supernumerary PCs shapes in early stages 3-5 and
798 late stages 6-10 of oogenesis in 3PC- (b) and 4PC- (c) containing groups of the following
799 genotypes: Control: *upd-gal4/+*. upd-RNAi: *upd-gal4/+; UAS-upd-RNAi/+*. p35: *upd-gal4/+;*
800 *UAS-p35/+*. n represents the number of groups with supernumerary PCs analyzed. The graphs
801 show that groups with supernumerary PCs are blocked in earlier remodeling phases when the
802 JAK/STAT pathway is inhibited than when apoptosis is inhibited. *** indicates the χ^2 test p
803 values for the compared distributions indicated with brackets (see Supplementary Materials and
804 Methods).

805

806

807 **Supplementary materials and methods**

808 **Armadillo immunostaining**

809 Ovary dissections were performed as described in Materials and Methods. Immunostaining was
810 performed as described in Materials and Methods with the following modifications: Ovaries
811 were incubated overnight at 4°C with agitation in primary antibodies, mouse anti-Fasciclin 3
812 (1:20-DSHB) and rabbit anti-GFP (1:500-DSHB) to detect E-Cadherin:GFP, followed by
813 staining with secondary antibodies using Alexa Fluor anti-rabbit (488) at 1:200 and anti-mouse-
814 Cy3 at 1:100 for two hours. Then another round of immunostaining including a new blocking
815 step, primary antibody incubation with mouse anti-Armadillo (1:400, DSHB) overnight at 4°C
816 with agitation and secondary antibody incubation with Alexa Fluor anti-mouse (647) at 1:200
817 for two hours was performed.

818

819 **Mosaic analyses**

820 *Stat92E* mutant clones were generated through mitotic recombination by the FLP/FRT
821 technique (Xu and Rubin, 1993). Females of the following genotypes were analyzed: *hs-flp/+;*

822 FRT82B-GFP/FRT82B-*Stat92E*³⁹⁷ and *hs-flp/+*; FRT82B-ubiGFP/FRT82B-*Stat92E*¹⁶⁸¹.
823 Mitotic clones, marked by the absence of GFP, were induced by two 1-hour heat shocks at 38°C
824 at mid-pupae and 24 hours before dissection. Adult females were dissected 4-5 days after
825 eclosion.

826

827 **Statistical analysis**

828 Statistical significance of cell shape distributions was assessed by X^2 test between control and
829 *upd*-RNAi, control and *p35*, and *upd*-RNAi and *p35* conditions. *** correspond to $p < 0.001$.

830

831

832

833 **Supplementary Movie legends**

834 **Supplementary Movie 1. 3D reconstruction animations of PC groups during the**
835 **remodeling phase.** Entire confocal stacks of stage 3-4 wild-type follicles immunostained for
836 Fasciclin 3, accumulating at high levels at PC-PC interfaces, were used for 3D reconstruction
837 of PC groups at the poles of these follicles viewed from the top within the plane of the follicular
838 epithelium (see objective 2 in Figure 1a). A royal color code was used to highlight Fas3 protein
839 concentrations on a scale from lowest (blue) to highest (white). Four configurations suggest a
840 stereotyped sequence of remodeling events beginning with the initial state, followed by partial
841 envelopment of the supernumerary PC by the two other PCs, then full lateral envelopment and finally
842 apical detachment. Tilted animations allow highlighting of the envelopment of the supernumerary PCs
843 by the two neighboring PCs.

844

845 **Supplementary Movie 2. Animations through the entire volume of two groups of 3 PCs at the**
846 **initial and full lateral envelopment states during the remodeling phase.** Animations of confocal
847 image stacks through the apical-basal axis of groups of 3 PCs from wild-type stage 3-4 follicles

848 immunostained for E-Cad:GFP and Fas3. The group of 3 PCs shown in the left column is at the initial
849 state and that in the right column at full lateral envelopment. Top: merge of ECadh:GFP (green) and
850 Fas3 (red) immunostainings. Center: ECadh:GFP immunostaining. Bottom: Fas3 immunostaining.
851 Frames 1, 59 and 112 are at the basal-most level, frames 29 and 85 at the apical-most level. Scale bar:
852 5 μ m.

853

854 **Supplementary Movie 3. Supernumerary PC remodeling at the subapical E-Cad domain.** The
855 frames in Figure 3a-c are taken from this time-lapse acquisition. Each frame corresponds to a projection
856 of three consecutive 0.3 μ m confocal slices. Full length of acquisitions: 310 min. Interval between
857 acquisitions: 5 min. Frames per second: 7.

858

859 **Supplementary Movie 4. Cell remodeling of supernumerary PCs followed by lateral extrusion of**
860 **apoptotic corpses.** The frames in Figure 4a-h are taken from this time-lapse acquisition. Single confocal
861 slices (1 μ m) at the subapical level for ECadh:GFP and at the lateral level for PH:chFP. Full length of
862 acquisitions: 190 min 30 sec. Interval between acquisitions: 1 min 30 sec. Frames per second: 7.

863

864 **Supplementary Movie 5. Engulfment and digestion of PC apoptotic corpses by FCs.** The frames in
865 Figure 5a-f are taken from this time-lapse acquisition. Single confocal slices (1 μ m) at the lateral level
866 through PCs and FCs visualized by the fusion protein PH:chFP.

867

868 **Supplementary Movie 6. Hid protein is only detected in fully enveloped, apically detached, spherical**
869 **PCs.** Animation along the apical-basal axis (left) and pivoting of a 3D reconstruction (right) of the PC
870 group in Figure 6b' immunostained for Fas3 (red) and Hid (green).

871

872 **Supplementary Movie 7. Animation along the apical-basal axis of a group of 3 PCs from a late**
873 **stage follicle with reduced JAK/STAT signaling.** An apical-basal animation through the group of 3
874 PCs of the stage 7 follicle in Figure 7b,b'. At this late stage remodeling of the supernumerary PC is

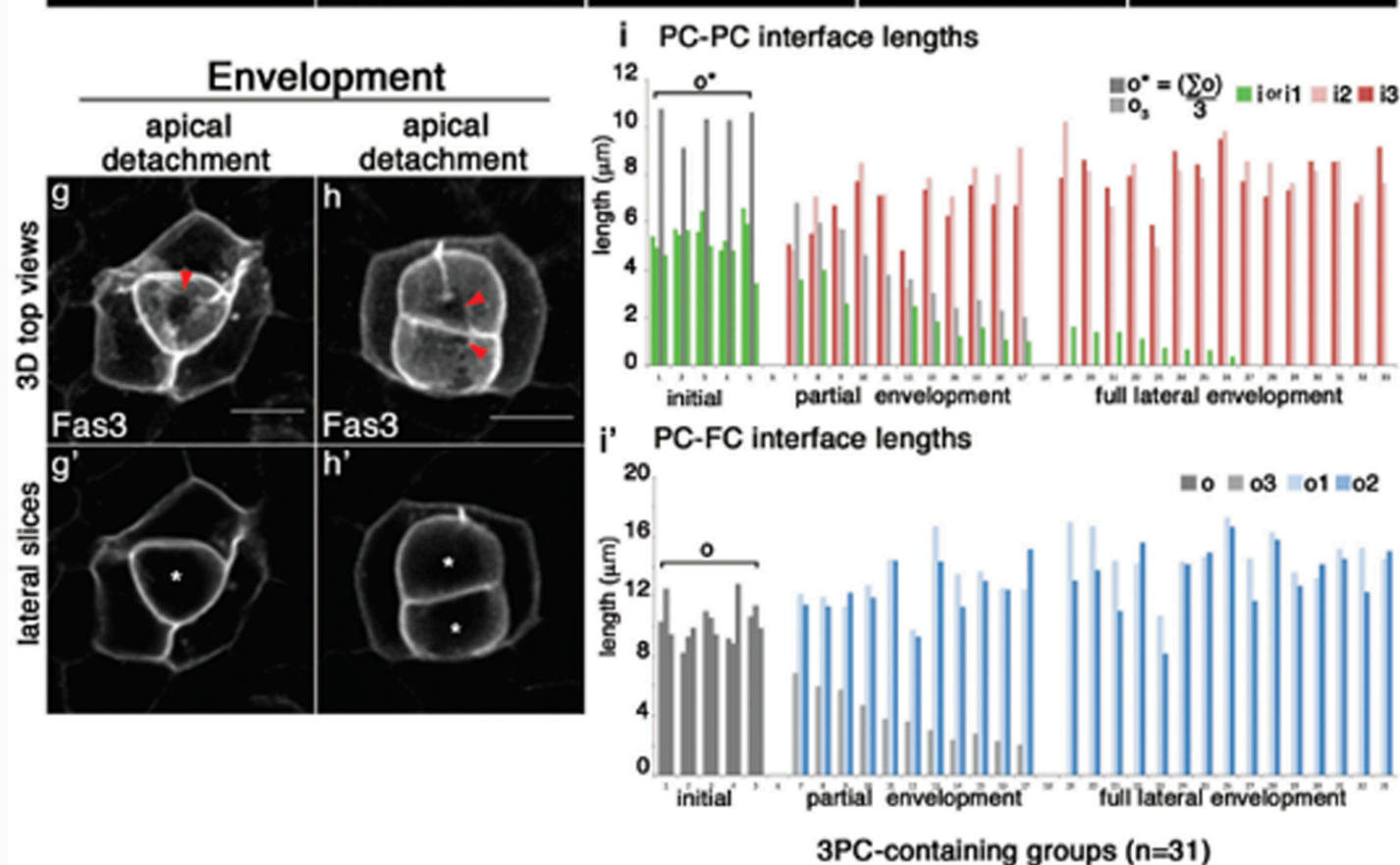
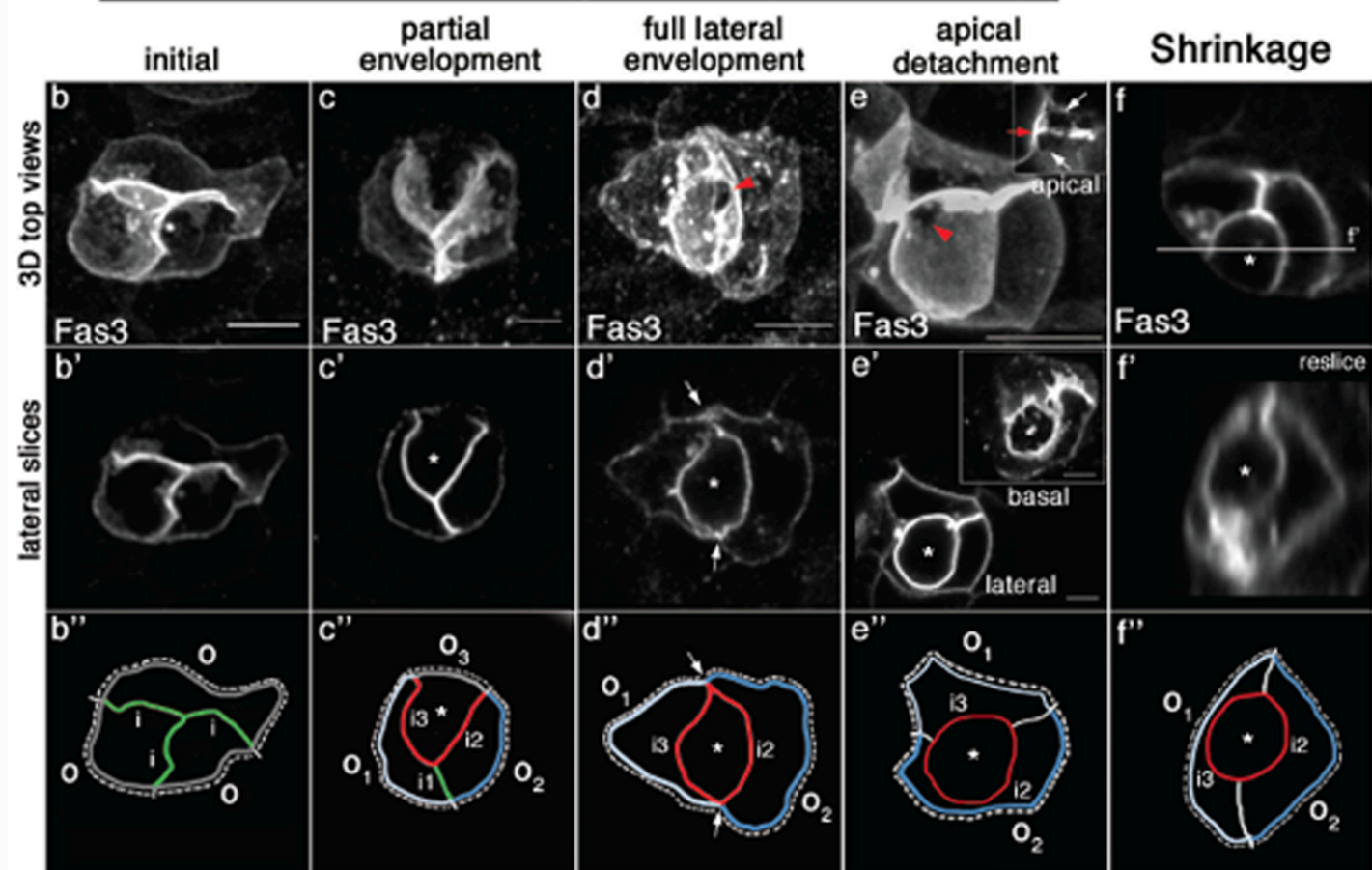
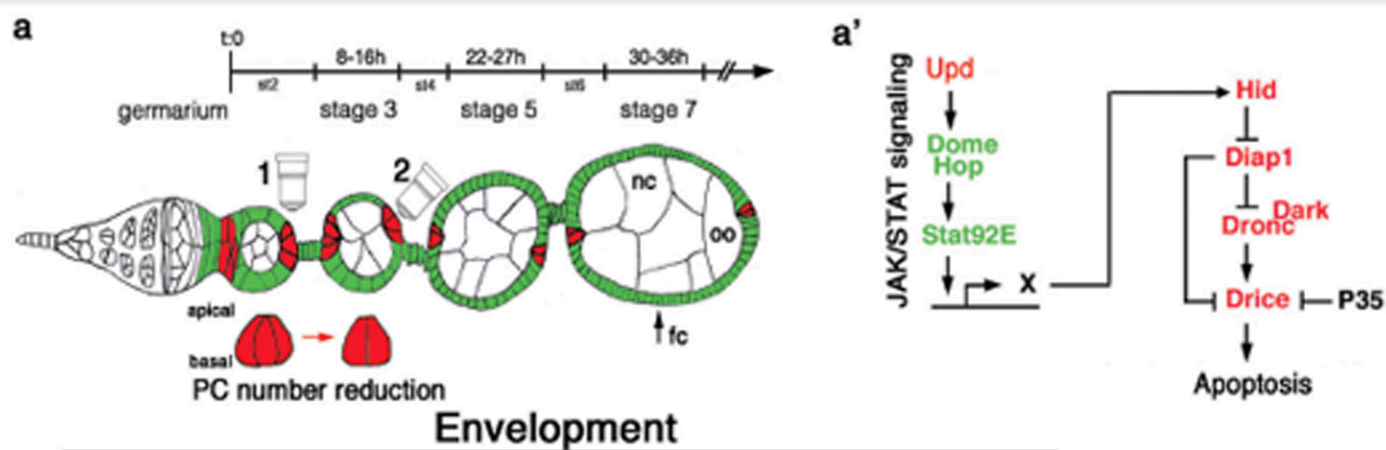
875 blocked at the initial state. Left: merge of ECadh:GFP and Fas3 immunostainings. Center: ECadh:GFP
876 immunostaining. Right: Fas3 immunostaining. Apical-most frames are 1, 51, and 100, basal-most
877 frames are 27 and 76. Scale bar: 5 μ m.

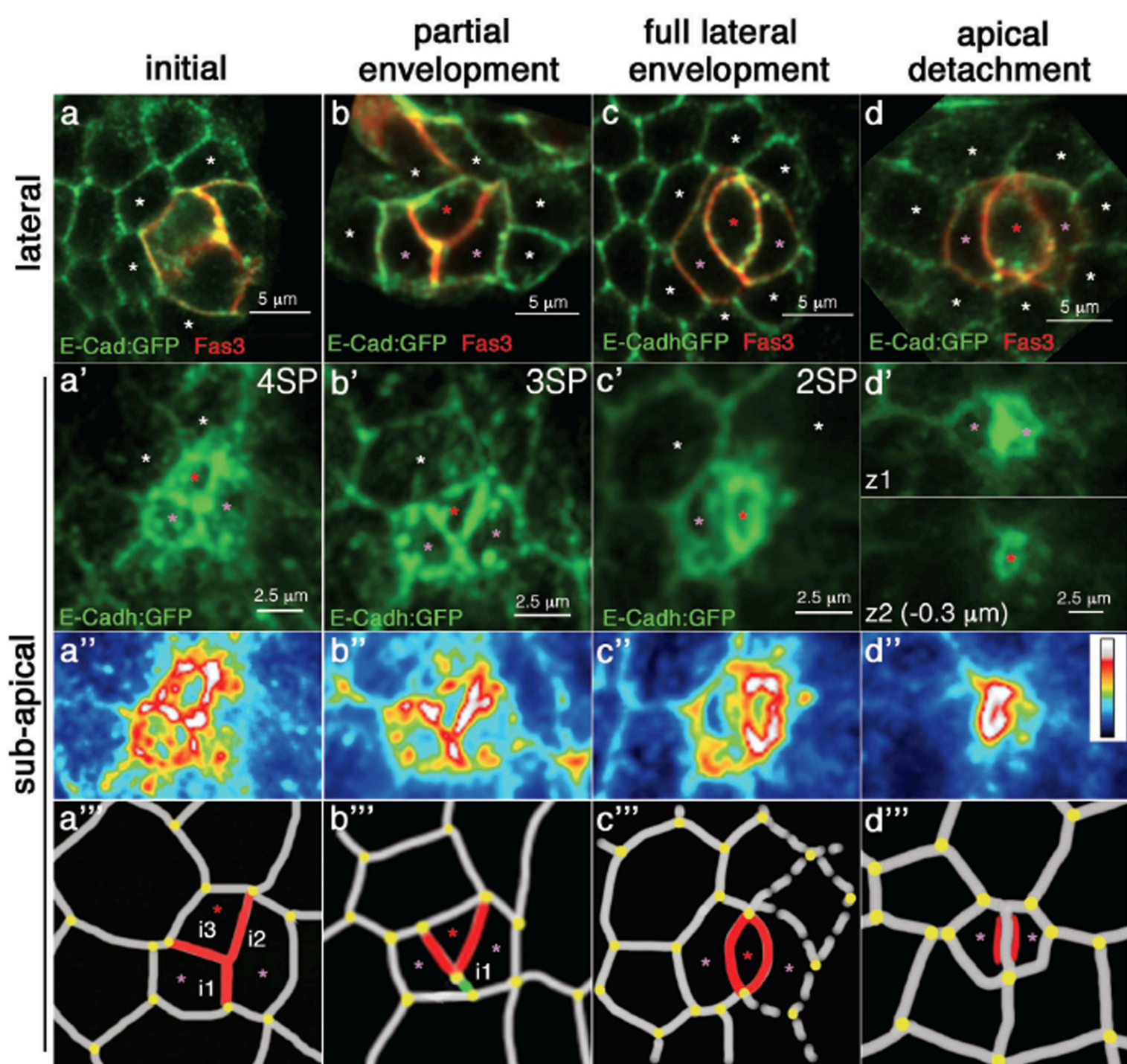
878

879 **Supplementary Movie 8. 3D reconstruction animations of 3 PC groups of a late stage JAK/STAT-**
880 **depleted follicles blocked at early remodeling states.** Pivoting animations of two groups of 3 PCs of
881 the same genotype as in Figure 7f to emphasize the block in apical detachment upon inhibition of
882 JAK/STAT signaling.

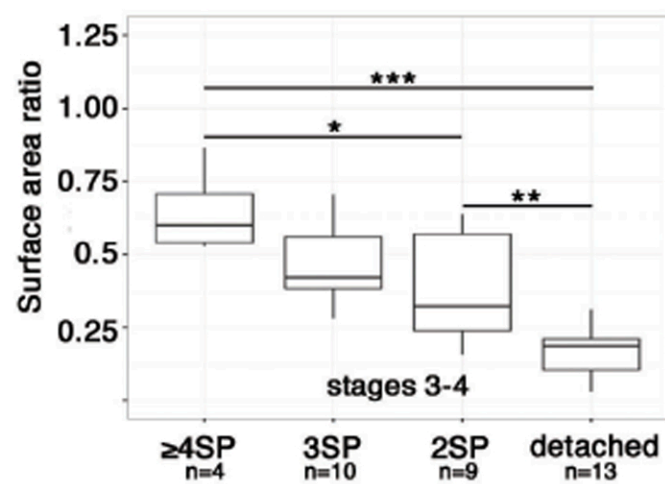
883

884

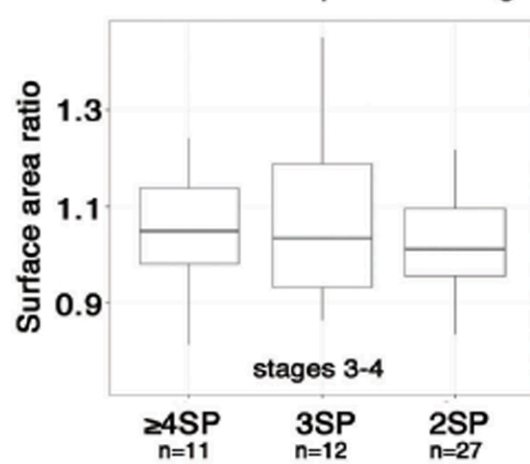


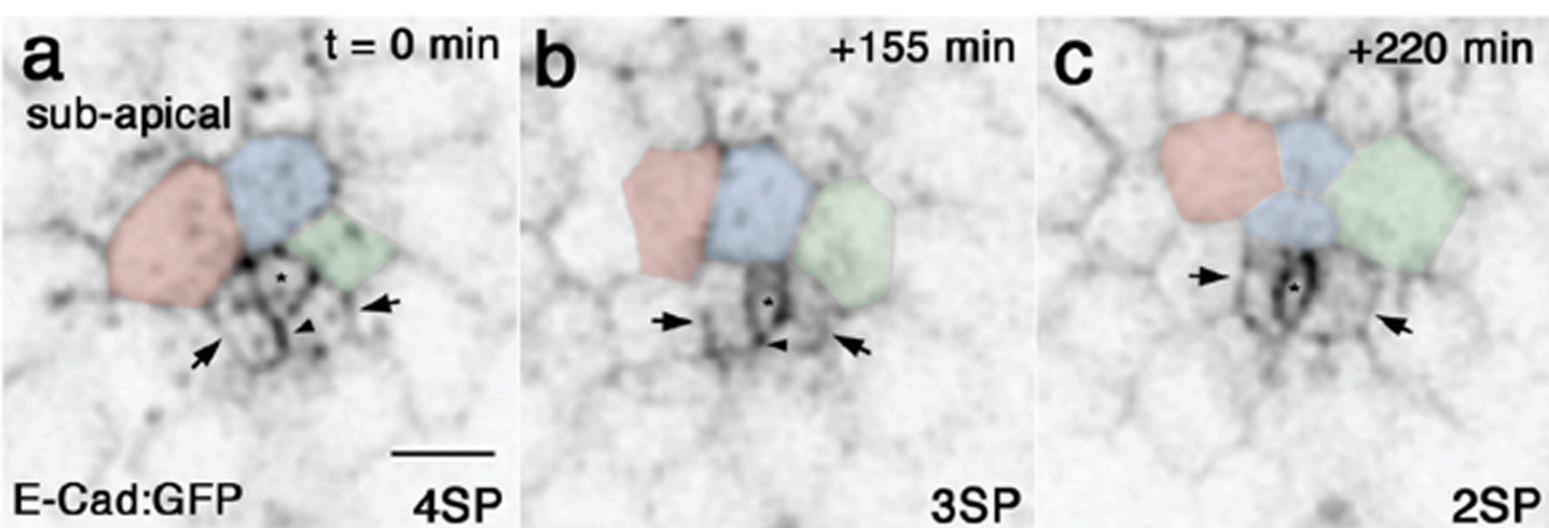


e Apical surface area ratio enveloped/surviving

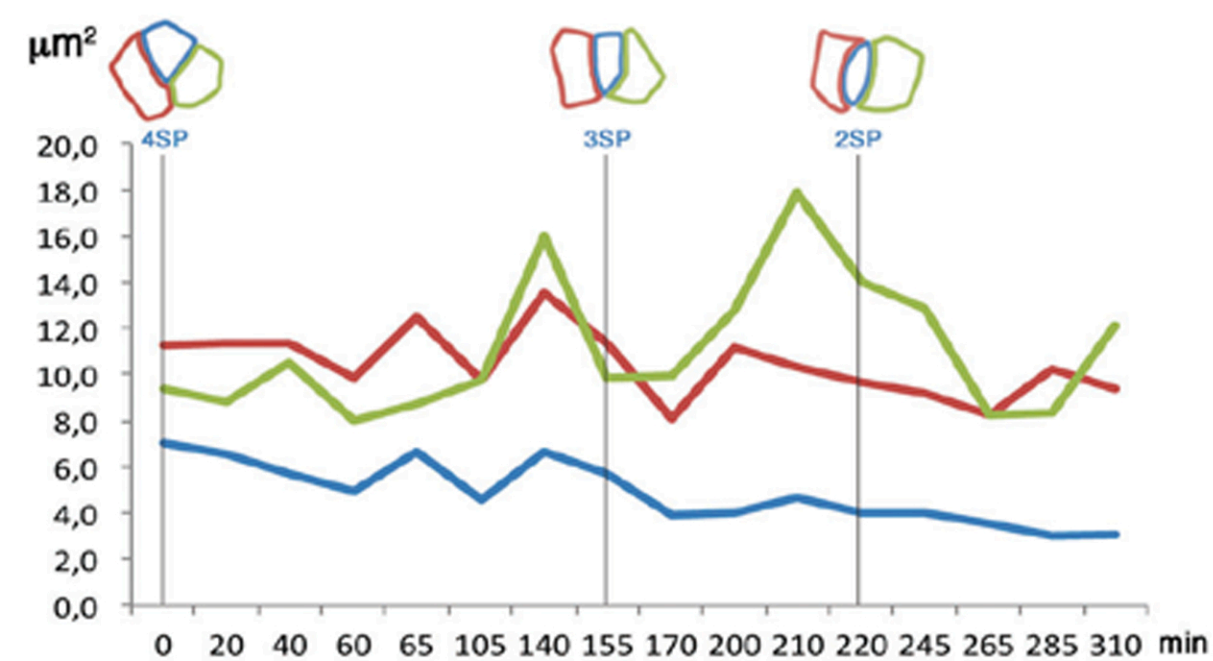


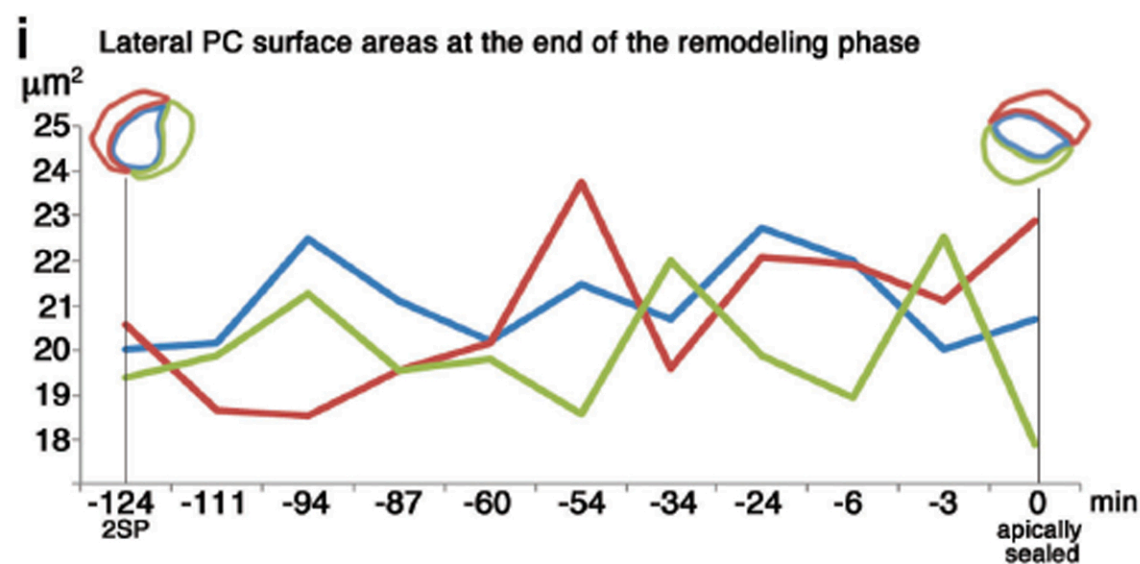
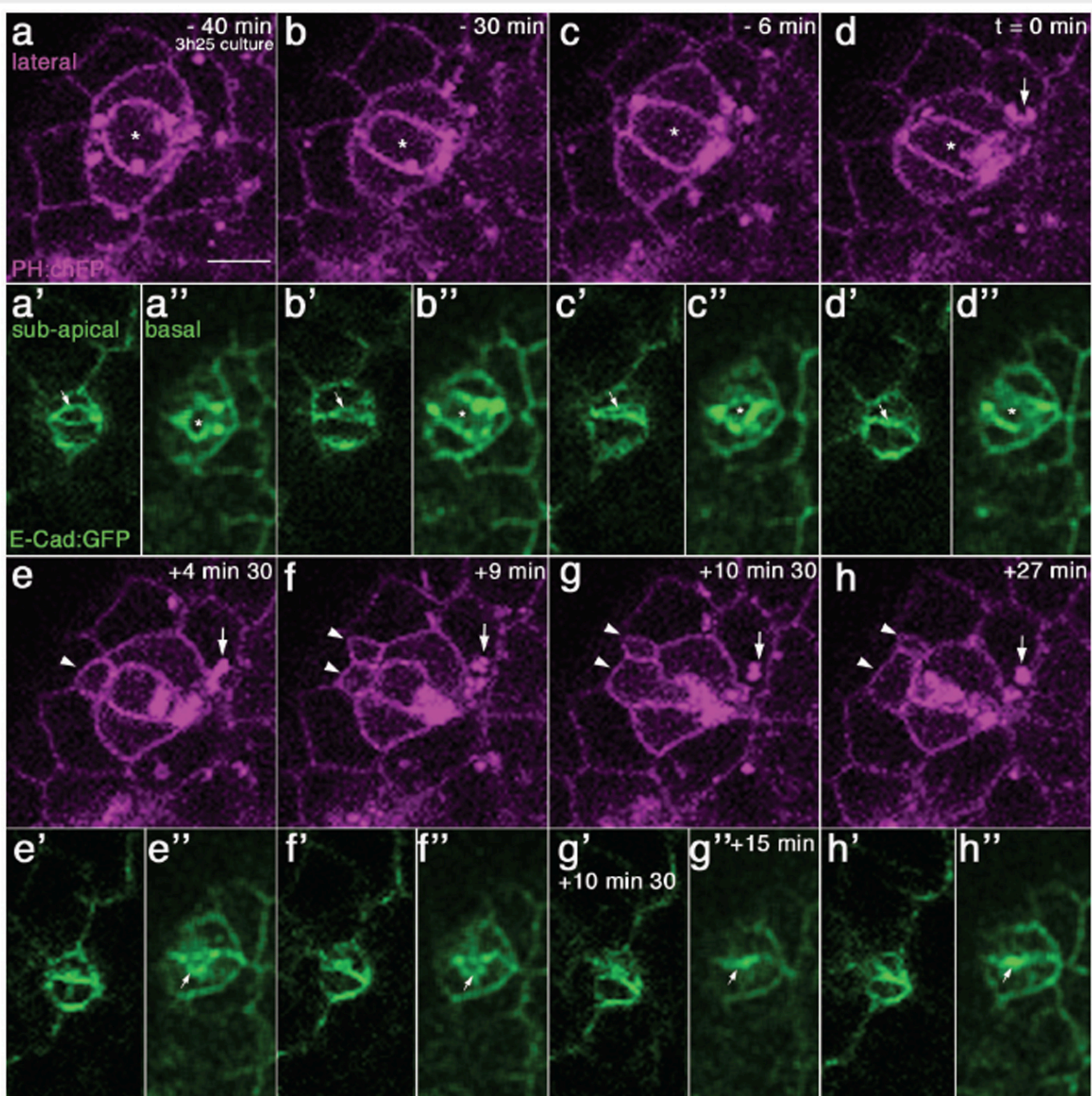
f Lateral surface area ratio enveloped/surviving

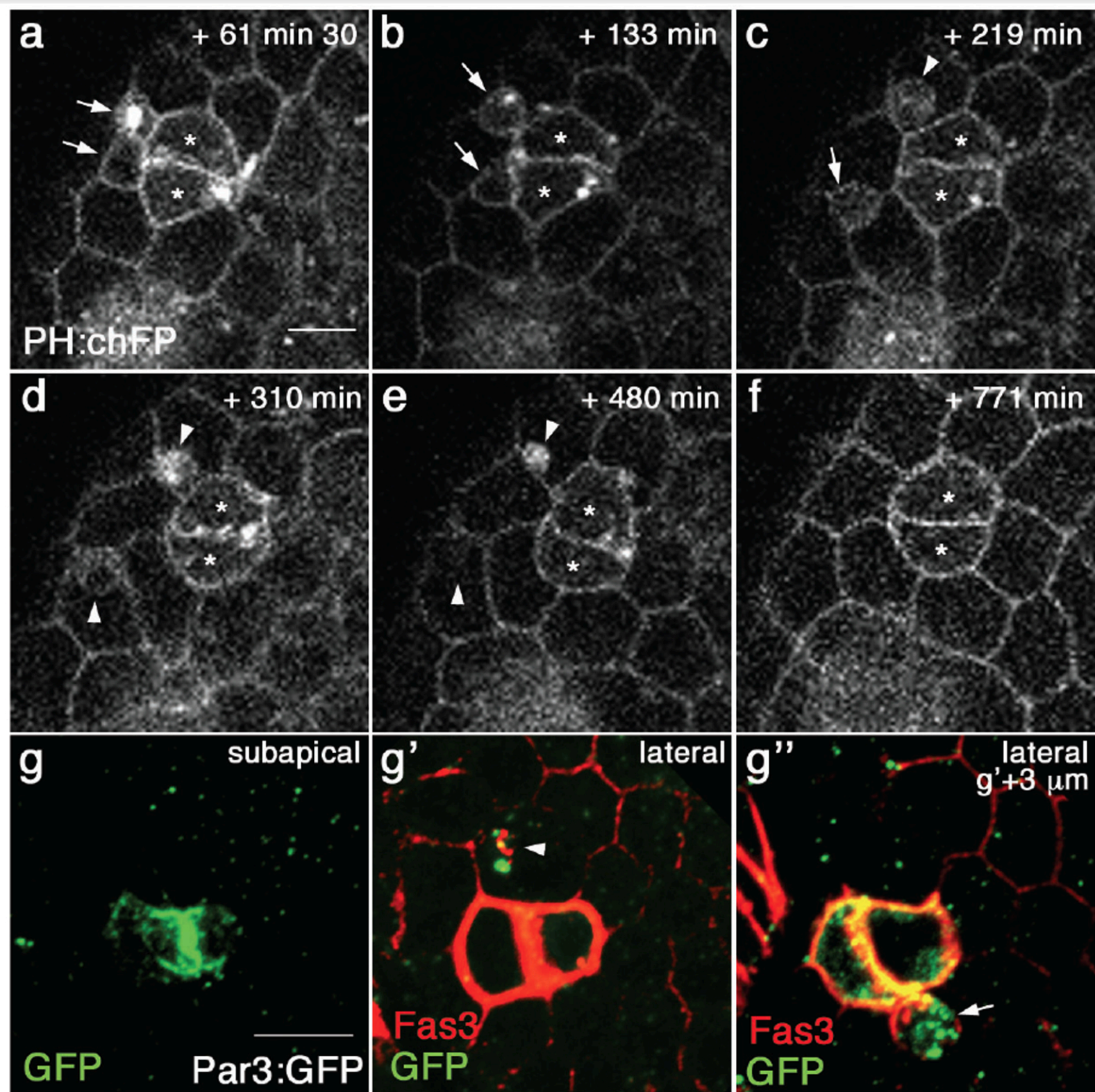


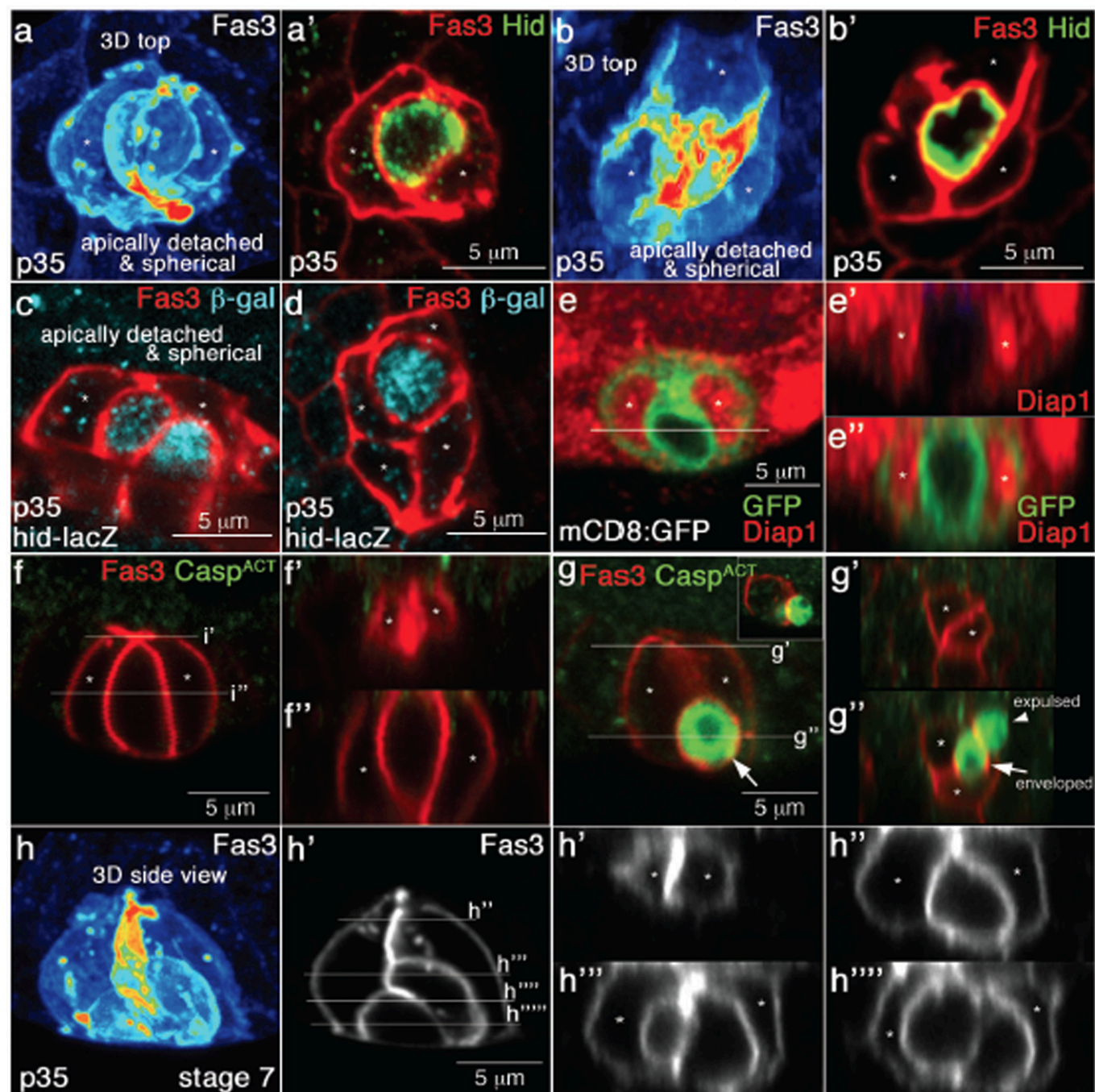


d Sub-apical PC surface areas during the 4SP-2SP transition



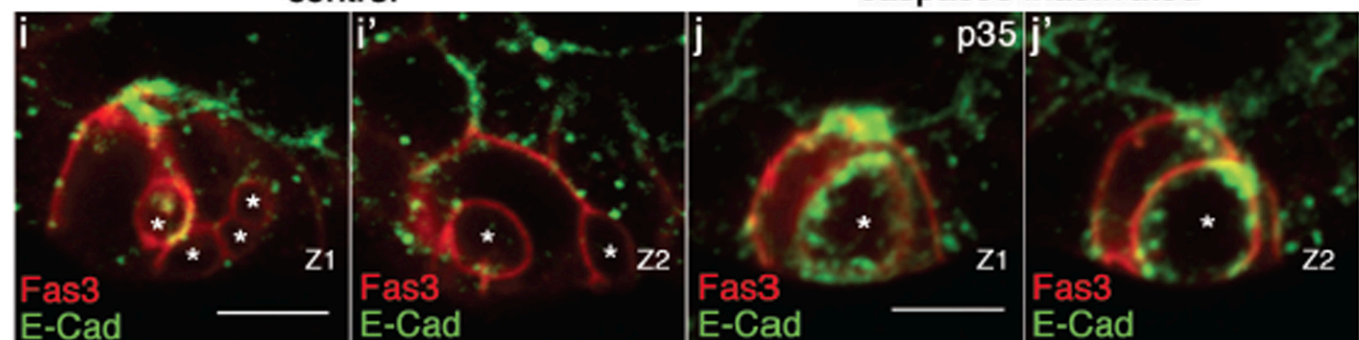




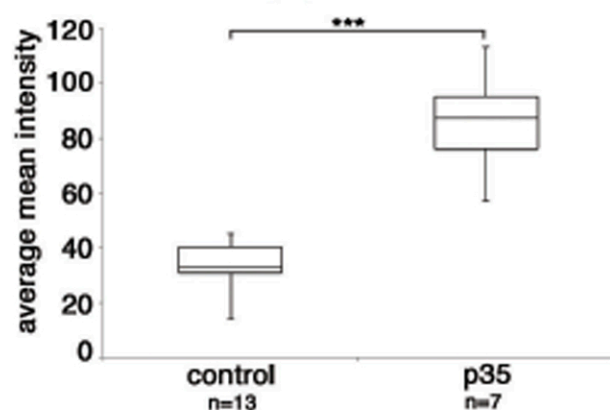


control

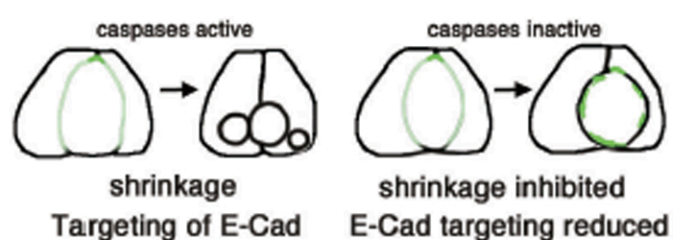
caspases inactivated

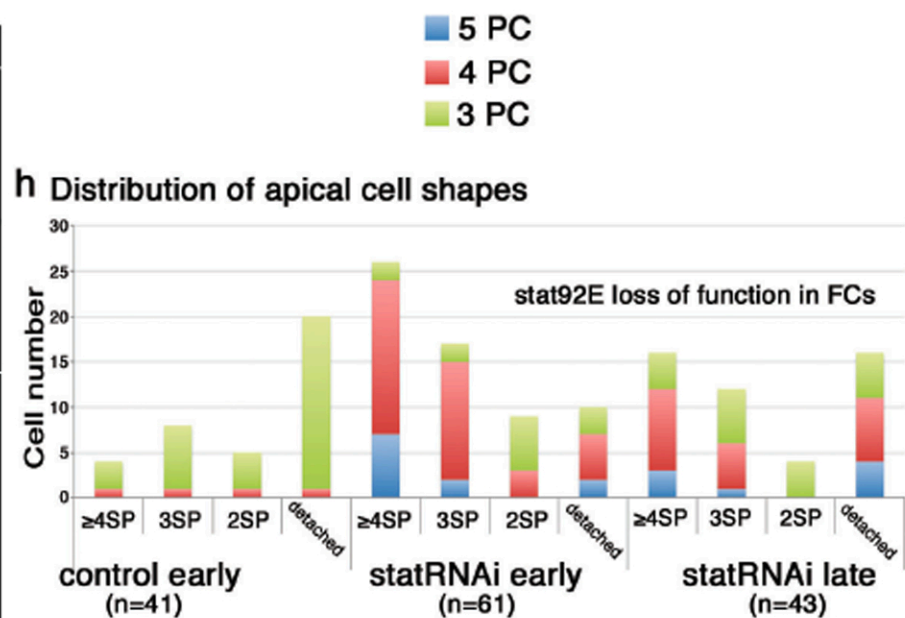
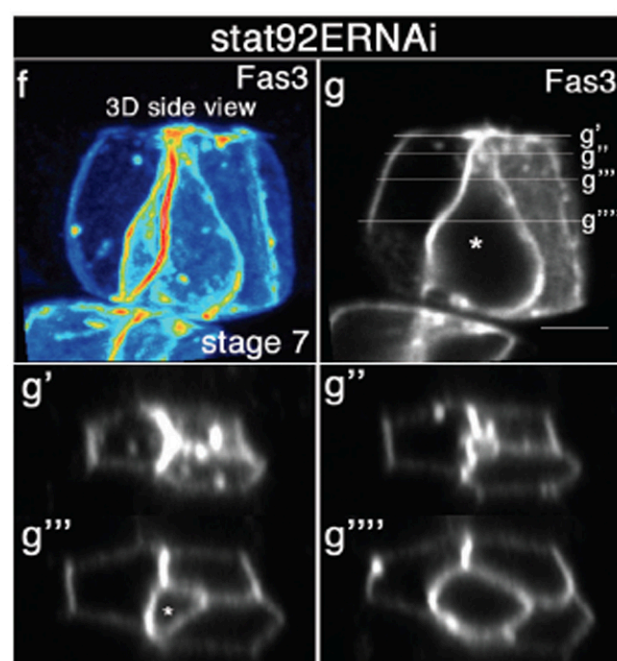
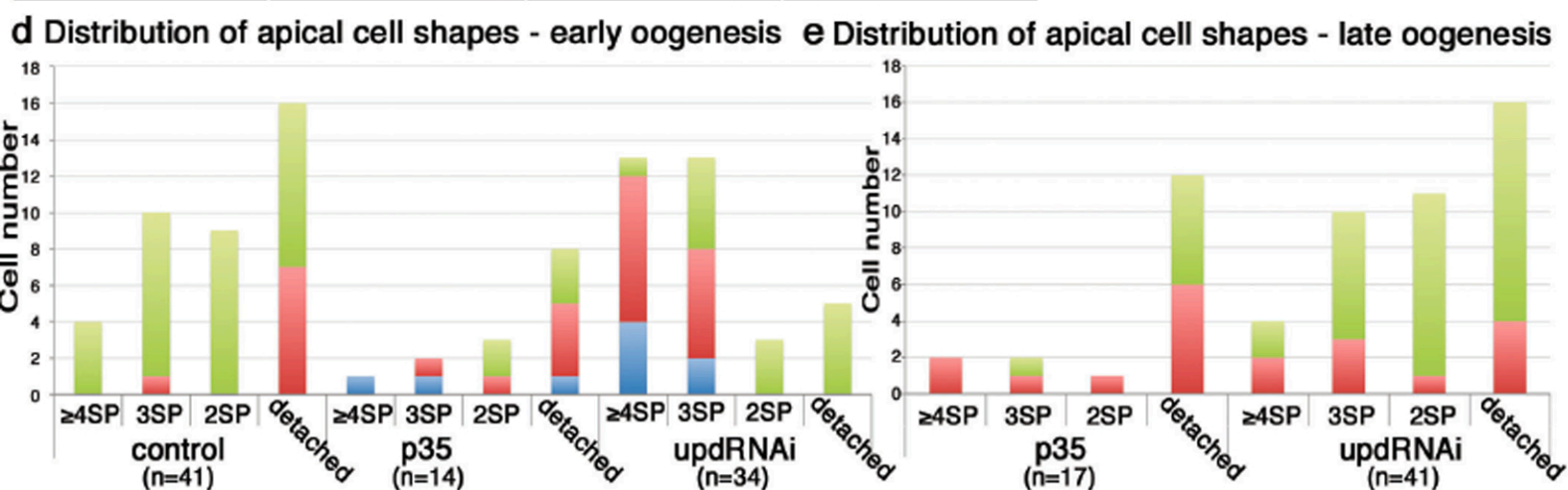
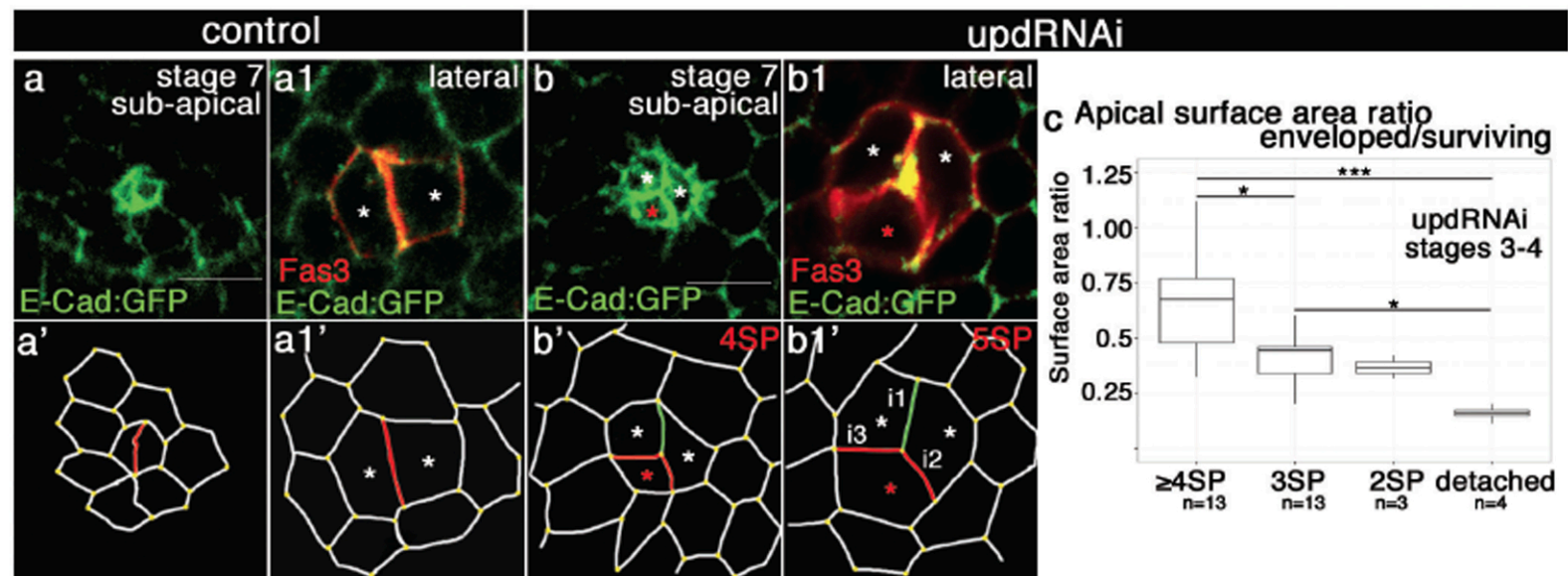


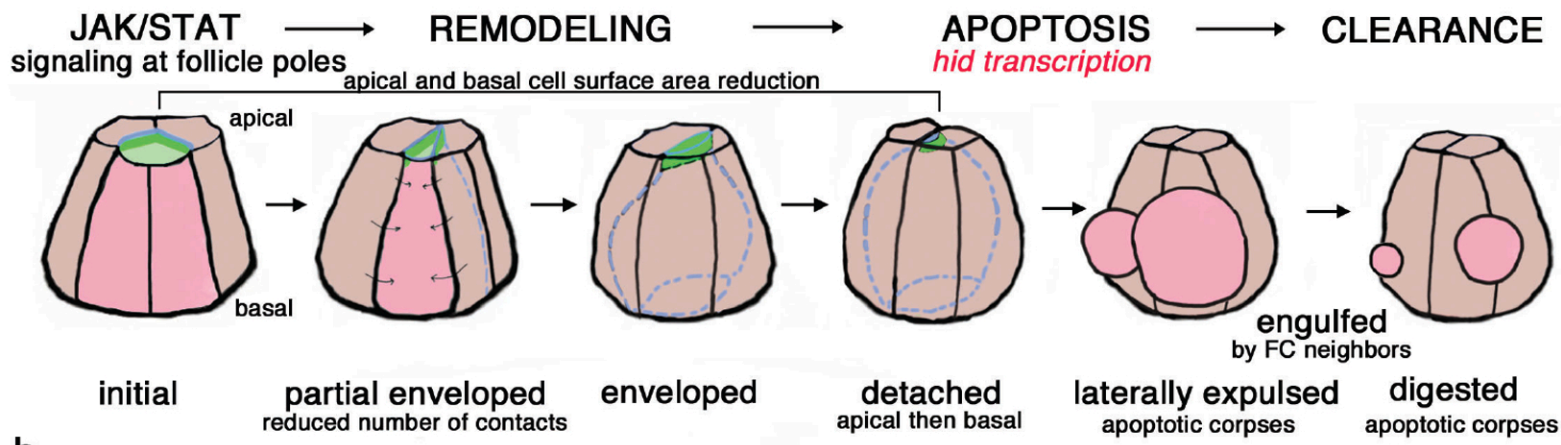
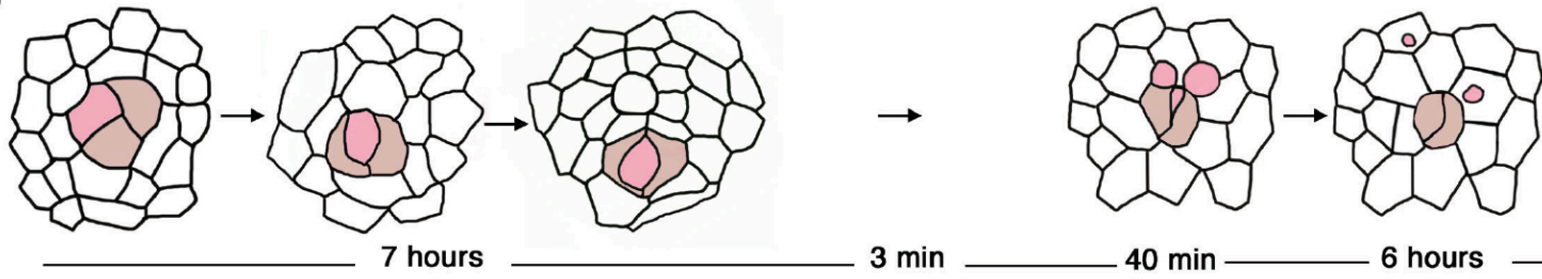
K E-Cad intensity quantification

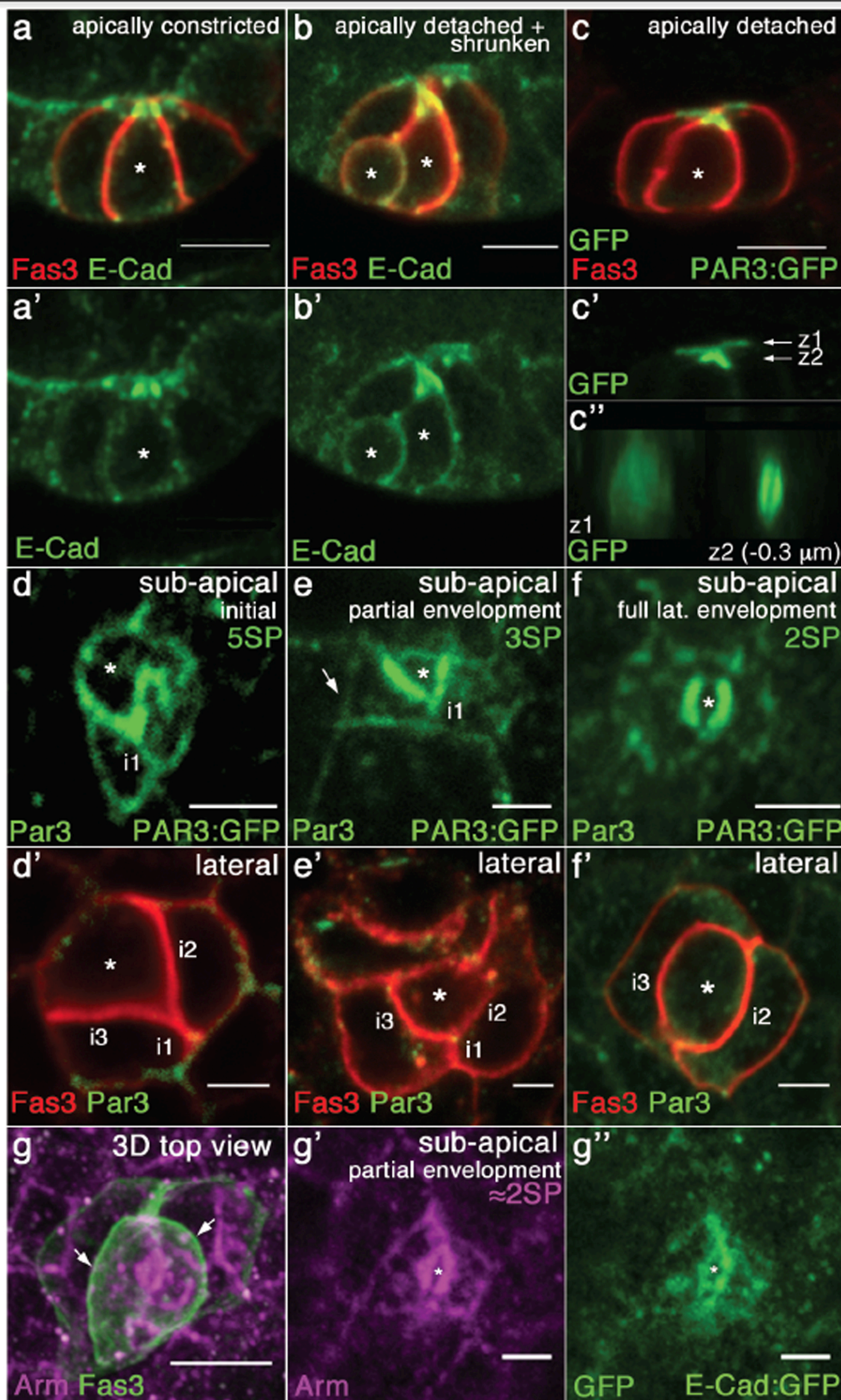


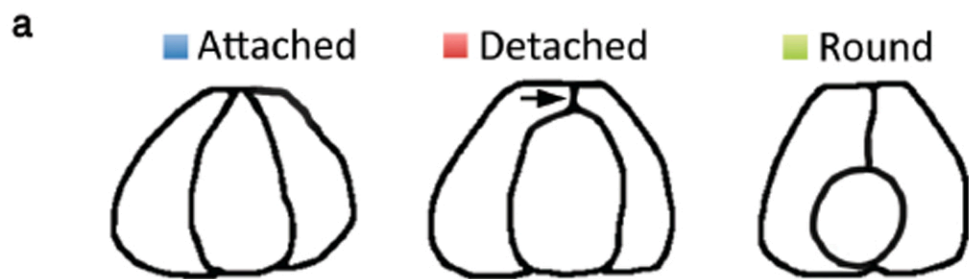
L Temporal model for PC E-Cad targeting



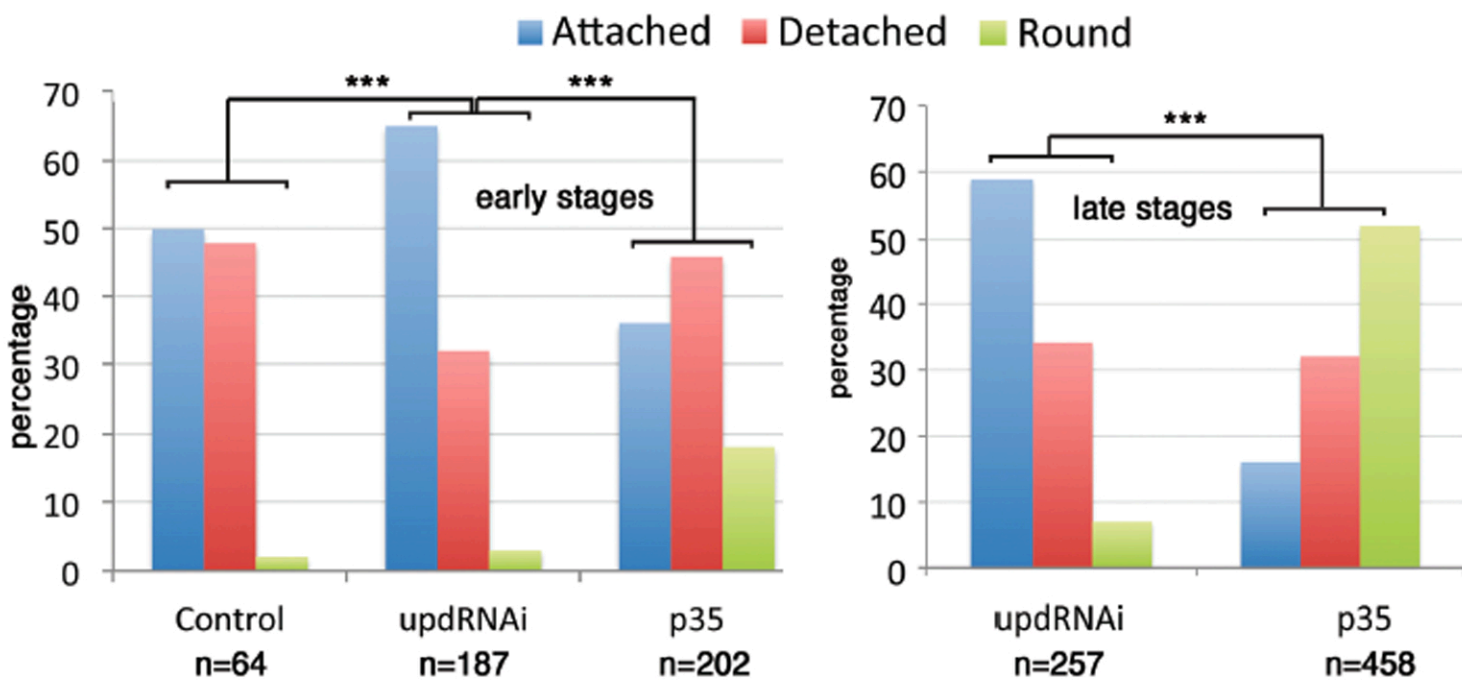


a**b**

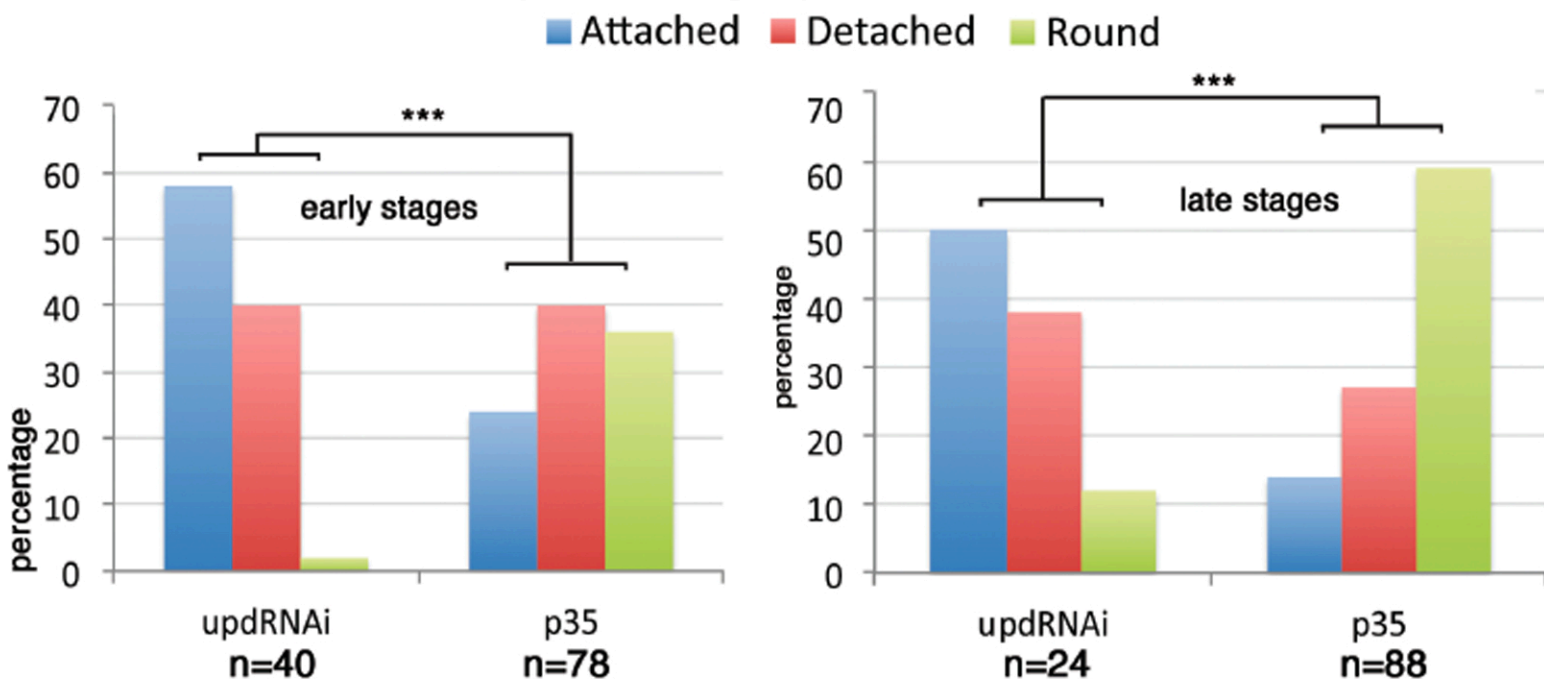




b Distribution of cell shapes in 3 PC groups



c Distribution of cell shapes in 4 PC groups



Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai entrepris de répondre aux questions suivantes : Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires qui ont lieu dans les CP et CF pour l'élimination des CP surnuméraires ? Comment la voie JAK/STAT régule-t-elle ces mécanismes ?

I. Sqh joue-t-il un rôle autonome cellulaire dans le processus d'élimination des CP surnuméraires ?

Dans les cas caractérisés d'extrusion de cellules épithéliales, la première étape de ce processus est le raccourcissement de jonctions de façon synchrone (pour les cellules apoptotiques) ou asynchrone (pour les cellules vivantes). Dans un deuxième temps, il a été montré qu'un anneau d'acto-myosine contractile se formait aux niveaux du domaine apical (ou du cortex basal, selon la direction de l'extrusion) de la cellule épithéliale vivante ou apoptotique qui sera extrudée, ainsi que dans le domaine latéral de chacune de ses cellules voisines (Rosenblatt et al, 2001). Cette deuxième étape dure entre 15 et 30 minutes et conduit à la réduction totale de l'aire du domaine impliqué. Ceci met en évidence un rôle mécanique des cellules en contact avec la cellule destinée à être expulsée apicalement ou basalement. J'ai donc cherché dans un premier temps à déterminer si des structures comparables se mettaient en place dans les CP au cours de l'extrusion des CP surnuméraires et si la fonction de la Myosine jouait un rôle dans les CP pour ce processus.

A. L'analyse de la localisation subcellulaire de Sqh:GFP dans les CP révèle deux types de distributions subapicales sans corrélation avec le remodelage des CP.

Pour étudier l'expression de Sqh dans les CP, j'ai d'abord analysé sa localisation subcellulaire dans des follicules de stades 3 à 4. J'ai utilisé un anticorps spécifique dirigé contre la forme active de Sqh (Sqh1P) (Zhang and Ward, 2011) et un anticorps dirigé contre la protéine Fasciclin III (Fas3) qui est exprimée

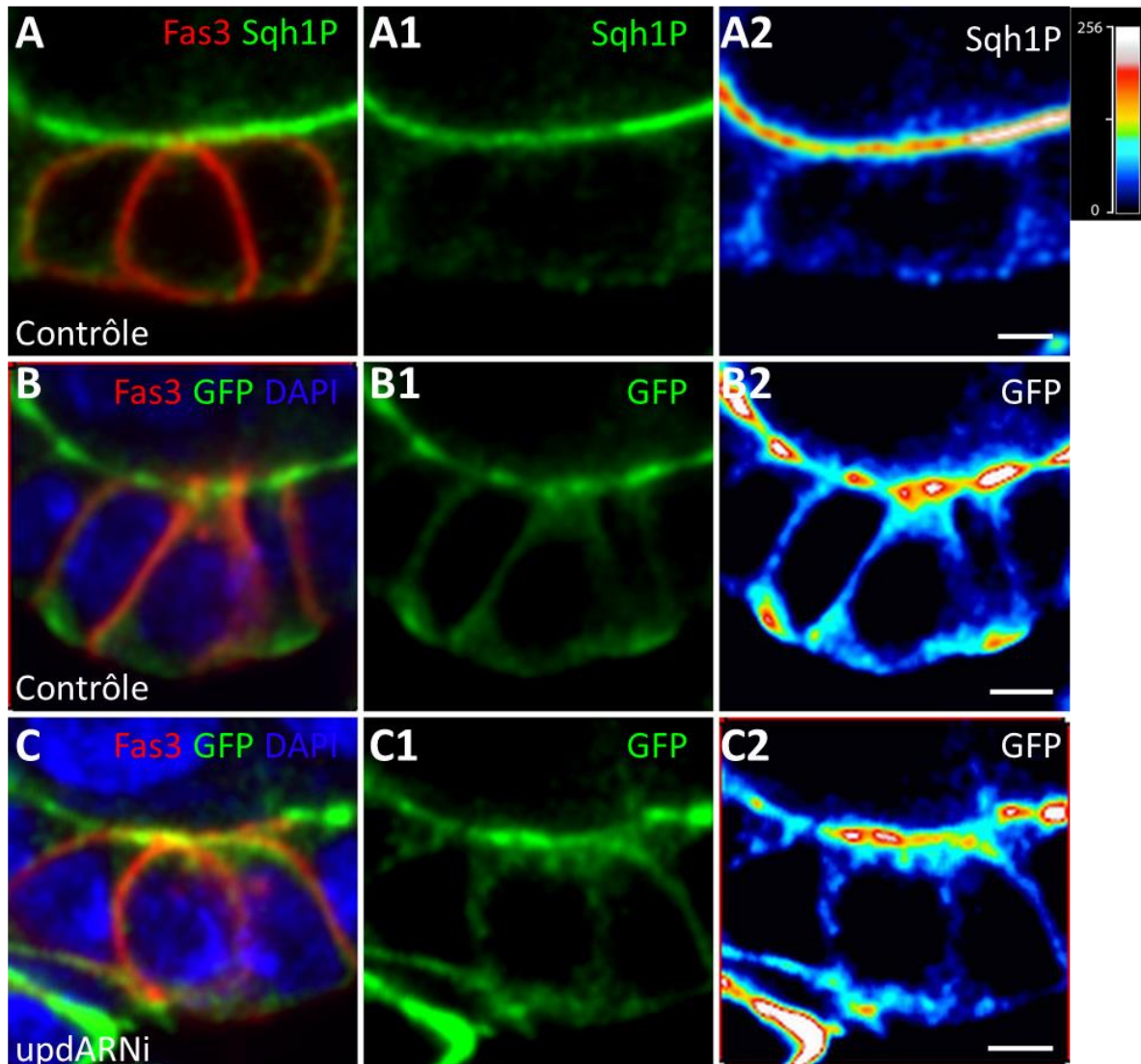


Figure 24. Localisation majoritairement apicale de la forme active de Sqh (Sqh1) et de Sqh:GFP au sein des groupes de 3CP. Images confocales des follicules entre les stades 3-4 de l'ovogenèse. Les CP sont identifiées par immunomarquage de la Fasciclin III (Fas3⁺) en rouge. **A)** Follicule contrôle de génotype : *upd-Gal4/+ ; +/CyO*. (A-A1) La forme active de Sqh (Sqh1P) est marquée en verte. (A2) Le marquage Sqh1P est montré en fausse couleur (Royal) pour indiquer l'intensité du signal. La couleur blanche indique la saturation du marquage. **B)** Follicule contrôle de génotype : *upd-Gal4/sqh^{AX3} ; sqh_{prom}-sqh :GFP/+*. **C)** Follicule avec une réduction de l'expression d'*upd* spécifiquement dans les CP en utilisant le système UAS-Gal4, génotype : *upd-Gal4/sqh^{AX3} ; sqh_{prom}-sqh :GFP/UAS-updARNi*. (B-B1, C-C1) L'expression de la GFP, en vert, met en évidence la localisation de la protéine de fusion Sqh:GFP et (B, C) le DAPI en bleu marque les noyaux des cellules. Barre d'échelle : 2µm.

fortement dans les CP. Le marquage anti-Sqh montre une faible accumulation de la protéine phosphorylée au niveau du cytoplasme des CP et une forte accumulation dans leur domaine apical (Fig. 24A-A2).

J'ai également suivi une deuxième stratégie pour visualiser le patron d'expression de Sqh dans les CP en caractérisant l'expression de Sqh:GFP dans la lignée *sqh^{AX3}/sqh^{AX3}; sqh_{prom}-Sqh:GFP/sqh_{prom}-Sqh:GFP*. Afin d'éviter une surexpression de la protéine Sqh due à l'introduction du transgène *sqh:GFP*, cette lignée contient un allèle amorphe de *sqh* (*sqh^{AX3}*) qui, à l'état homozygote, conduit à une létalité embryonnaire. Cette létalité est supprimée par la présence du transgène Sqh:GFP qui exprime une protéine de fusion Sqh:GFP sous contrôle du promoteur du gène *sqh*.

Des follicules de stades 3-4 de mouches *sqh^{AX3}/upd-Gal4; sqh_{prom}-Sqh:GFP/+* ont été marqués à l'aide de l'anticorps anti-Fas3 et d'un anticorps dirigé contre la GFP. Les CP présentent un marquage cytoplasmique faible de Sqh:GFP avec une accumulation élevée du signal au niveau du domaine apical (Fig. 24B-B2), similaire au marquage Sqh1P (Fig. 24A-A2), mais également des niveaux assez forts dans la partie basale des CP.

Je me suis ensuite concentrée sur l'analyse de l'accumulation de Sqh:GFP dans le domaine apical des CP surnuméraires puisque ce domaine change de forme drastiquement au cours du remodelage des CP, transitant d'une forme polygonale à 4-5 côtés à une forme de lentille au cours de l'enveloppement. Afin de pouvoir délimiter les JA des CP, j'ai utilisé un anticorps anti-Cadhérine. Des images confocales de haute résolution à partir de vues directes de pôles (Fig. 25A) contenant 3CP ont été produites sur des ovaires de mouches *sqh^{AX3}/upd-Gal4; sqh_{prom}-Sqh:GFP/+*. Grâce au marquage Cadhérine, j'ai pu identifier les différentes catégories du remodelage subapical de la CP sur 21 cas analysés (4SP n=4, 3SP n=7, 2SP n=10) (Fig. 25C-H, C2-H2). Deux distributions de Sqh:GFP ont été identifiées par la détection de la GFP dans le domaine subapical des CP en cours d'enveloppement (Fig. 25B, C-H, C1-H1):

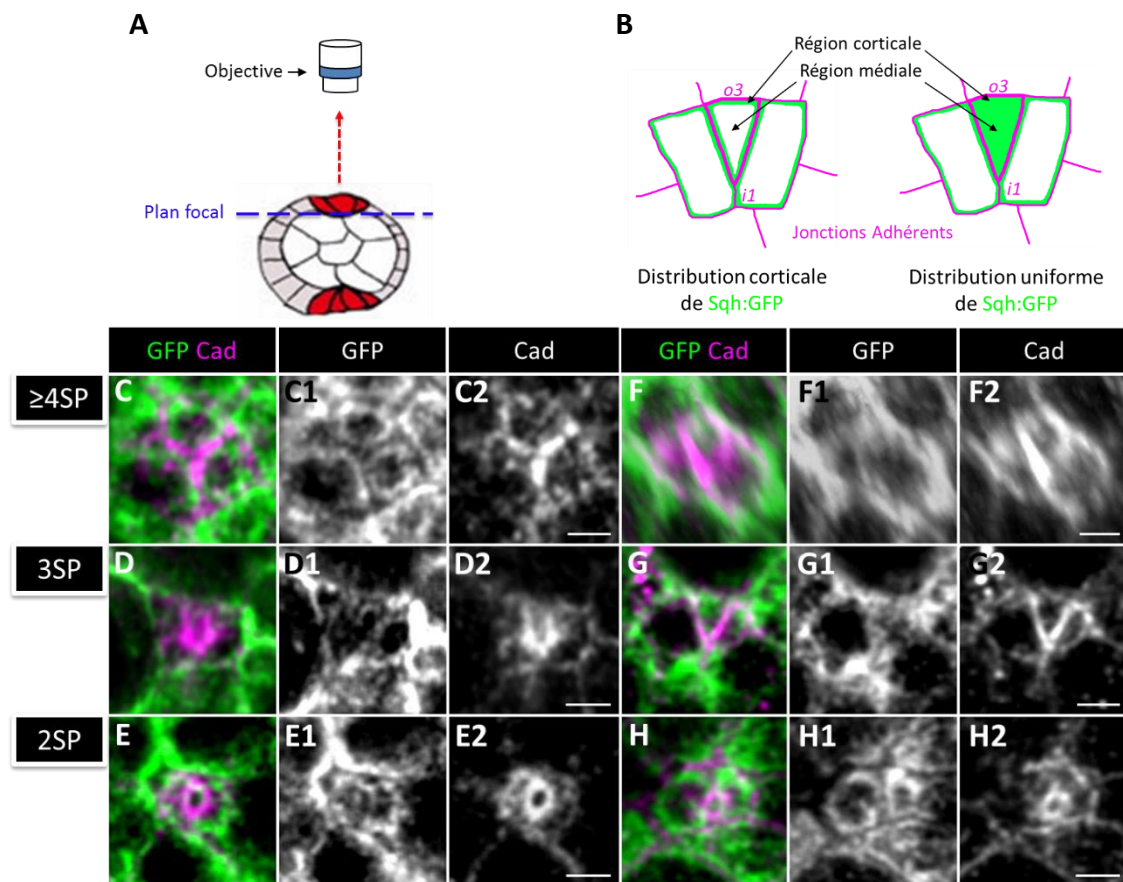


Figure 25. Distributions corticale et uniforme de Sqh:GFP au cours du remodelage subapical des groupes de 3CP. **A)** Schéma de la façon de visualisation du domaine subapical des CP dans cette expérience (sauf F). **B)** Schéma de la distribution corticale et uniforme de Sqh:GFP (vert) montrant les régions corticale et médiale du domaine subapical. Les JA sont montrées en magenta. i1 correspond au contact entre les 2CP enveloppantes. o3 correspond au contact entre la CP qui est progressivement enveloppée et les CF adjacentes. **C-H2 sauf F)** Projections de 2-3 coupes ($z=0,3\mu\text{m}$) d'images confocales d'immunomarquages Cadhérine (Cad) et GFP au niveau du domaine subapical des CP prises comme schématiser en (A). **F)** Image obtenue à partir d'une reconstruction 3D des images prises latéralement du domaine subapical des CP. (C-C2, F-F2) Le marquage Cadhérine en magenta ou gris permet d'identifier la forme de la CP progressivement internalisée en commençant par des formes >4SP (4SP et 5SP, C-C2, F-F2, respectivement), une forme 3SP (D-D2, G-G2), une forme 2SP (E-E2, H-H2). (C-C1, D-D1, E-E1) Distribution corticale de *sqh* :GFP en vert ou gris. (F-F1, G-G1, H-H1) Distribution médiale de *sqh* :GFP en vert ou gris. (C-H2) Barre d'échelle $2\mu\text{m}$.

Une **distribution corticale** dans laquelle Sqh:GFP est majoritairement présente au niveau du cortex (région corticale) et s'accumule faiblement dans la région médiale (Fig. 25B, C-E, C1-E1) et une **distribution uniforme** dans laquelle Sqh:GFP est présente dans tout le domaine subapical de façon uniforme (Fig. 25B, F-H, F1-H1).

Ces deux distributions de Sqh:GFP ont été observées indépendamment des étapes du remodelage des CP dans la partie apicale (Fig. 25C-H2) et ont également été repérées avec une distribution corticale majoritaire dans les CP qui enveloppent ($n=20/21$) (Fig. 25C-H2 et données non montrés). Ces résultats suggèrent que la distribution de Sqh varie dans le domaine subapical des CP pendant tout le processus d'enveloppement et n'est pas coordonnée entre les CP enveloppantes et la CP qui est enveloppée dans un groupe de 3CP (Fig. 25G-G2). D'autre part, je n'ai pas observé d'accumulation de Sqh:GFP au niveau des JA qui remodelent (Fig. 25B o3, G-G2). Je n'ai pas non plus observé de structure en forme d'anneau renforcé en Sqh:GFP dans les différents cas analysés. 10 cas de CP surnuméraires avec une configuration 2SP ont été analysés mais une structure apicale de Sqh :GFP en forme d'anneau n'a été observée dans aucun d'entre eux. Comme la configuration 2SP des CP surnuméraires est maintenue pendant plusieurs heures (>2h, voir manuscrit), il est possible qu'il faille analyser plus de cas pour pouvoir repérer cette structure potentiellement furtive.

Des analyses en temps réel permettraient d'accéder à une dynamique de Sqh au cours du remodelage du domaine subapical des CP ainsi qu'au niveau de leurs JA.

Afin de déterminer si Sqh joue un rôle dans l'élimination des CP surnuméraires, des analyses de perte et de gain de fonction ont été réalisées.

B. La fonction de sqh ne semble pas requise dans les CP pour l'élimination des CP surnuméraires.

- 1. Peu de clones mutants sqh^1 ont été générés dans les CP dû à la difficulté d'induire des évènements de recombinaison dans cette population de cellules.*

Catégories	<i>sqh</i> ⁺				
	Total de clones	Nombre de clones st3-4	Nombre de clones st5-9	>2CP st3-4	>2CP st5-9
1. CP	2	1	1	0	0
2. CF	12	2	10	0	0
3. CP+CF	42	13	29	4	4
4. Tout l'épithélium folliculaire	9	4	5	1	0
5. Tout l'épithélium folliculaire + lignée germinale	11	3	8	3	1
6. Lignée germinale	P.A	P.A	P.A	P.A	P.A

Catégories	<i>sqh</i> ¹				
	Total de clones	Nombre de clones st3-4	Nombre de clones st5-9	>2CP st3-4	>2CP st5-9
1. CP	7	1	6	0	2
2. CF	5	3	2	0	1
3. CP+CF	42	14	28	12	15
4. Tout l'épithélium folliculaire	18	7	11	5	9
5. Tout l'épithélium folliculaire + lignée germinale	6	0	6	0	4
6. Lignée germinale	6	0	6	0	0

Tableau 1. Catégories de clones mitotiques homozygotes *sqh*⁺ et *sqh*¹ selon le type de cellule inclus dans le clone. Six catégories ont été établies pour les clones identifiés : 1) Clones incluant une ou plusieurs CP. 2) Clones incluant des CF terminales. 3) Clones incluant les CF terminales et les CP (au moins une CP). 4) Clones incluant tout l'épithélium folliculaire. 5) Clones incluant tout l'épithélium folliculaire d'un follicule ainsi que le cyste germinale à l'intérieur du follicule. 6) Clones incluant toutes les cellules d'un cyste germinale. Pour chacun des deux contextes génétiques et par catégorie, sont montrés : le nombre total de clones analysés, le nombre de clones dans des follicules de stades 3-4 de l'ovogenèse, ainsi que ceux des stades 5-9, et finalement le nombre de clones des follicules de stades 3-4 et 5-9 de l'ovogenèse présentant plus de 2CP.

Si *sqh* est requis dans les CF pour le processus d'élimination de CP surnuméraires, alors une perte de fonction dans ces cellules devrait affecter le nombre de CP. Au cours de mon stage de M2 (rapport M2, AY Torres Espinosa, Paris Sud 2012), j'avais cherché à tester une corrélation entre la présence de clones mitotiques homozygotes pour un allèle amorphe de *sqh* (*sqh^{AX3}*) dans les CP et le nombre de CP aux stades tardifs. L'observation de cellules clonales aplaties et étalées avec de grands noyaux, reproduisant des phénotypes décrits pour la perte de *sqh* dans cet épithélium (Wang and Riechmann, 2007), m'a permis de confirmer la perte de fonction de *sqh* dans ces cellules clonales. De plus, des follicules avec de grands trous dans l'épithélium et en état de dégénération associés à de grands clones *sqh^{AX3}* ont également été repérés. Cependant, parmi plus d'une centaine de pôles folliculaires analysés, je n'ai trouvé que trois follicules après le stade 6 avec des CP homozygotes mutantes pour *sqh^{AX3}*. Dans ces trois cas, les pôles contenaient 2CP mais ces cellules étaient très aplaties et présentaient de longues projections membranaires (Fig. Supplémentaire 1B-B''). Etant donné la morphologie des chambres à œufs et le faible nombre de CP homozygotes mutantes *sqh^{AX3}* générées, je n'ai pas pu conclure si la perte de *sqh* dans les CP était associée avec une survie prolongée des CP surnuméraires.

Pour compléter mon analyse et espérer pouvoir conclure, nous avons décidé d'utiliser un allèle hypomorphe de *sqh*, *sqh¹*, avec la même approche de génération de clones mitotiques. Des clones mitotiques homozygotes *sqh⁺* et *sqh¹* ont été induits avec le système FLP/FRT (voir Matériels et Méthodes). Les cellules clonales *sqh⁺* et *sqh¹* ont été identifiées par l'absence de la GFP et l'immunodétection de Fas3 a permis de compter le nombre de CP aux différents stades.

De nombreux clones homozygotes *sqh⁺* et *sqh¹* dans les CF ont été obtenus à tous les stades (Tableau 1). De façon surprenante, très peu de clones ont été générés spécifiquement dans les CP pour l'allèle sauvage *sqh⁺* (2 clones) et l'allèle mutant *sqh¹* (7 clones) (Tableau 1, Catégorie CP). Pour *sqh⁺*, un pôle d'un follicule précoce et d'un follicule tardif (Fig. 26A) ont été obtenus avec 2CP chacun. Pour *sqh¹*, 6 pôles de follicules entre les stades 5 et 9 contenant 1 ou 2 CP clonales ont été obtenus. Parmi ces 6

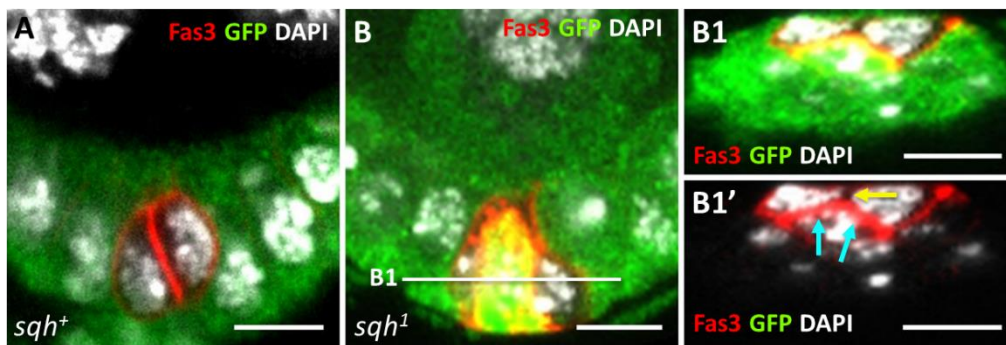


Figure 26. Clones mitotiques homozygotes *sqh*⁺ et *sqh*¹ dans les CP. Images confocales de follicules au stade 6 de l'ovogenèse. Les cellules clonales sont identifiées par l'absence d'immunomarquage GFP, en vert. Les CP sont identifiées par immunomarquage Fas3⁺, en rouge. Le DAPI marque les noyaux des cellules. **A)** Pôle d'un follicule avec un clone *sqh*⁺ incluant 2CP. **B)** Pôle d'un follicule avec un clone *sqh*¹ incluant 2CP et 1CP pas inclus dans le clone. **B1-B1')** Image d'une vue apicale du groupe de CP en B, 3CP ont été identifiées parmi lesquelles 2CP sont clonales pour *sqh*¹. Les flèches en cyan indiquent le marquage Fas3⁺ entre une CP clonale et une CP non clonale. Ce marquage est absent entre la membrane partagée par les 2CP clonales (flèche blanche). Barre d'échelle : 5µm.

cas, 2 présentaient 1CP surnuméraire (Fig. 26B-B1') mais correspondaient à des follicules de stade 5 et 6. Les 4 autres cas ne présentant pas de CP surnuméraires correspondaient à des follicules au-delà du stade 6, comme dans le sauvage.

Le fait d'observer peu de clones dans les CP pour l'allèle sauvage aussi bien que pour l'allèle mutant *sqh*¹, mais de nombreux clones dans les CF pour ces deux contextes génétiques, indique que les CP sont une population des cellules difficiles à cibler avec cette stratégie. En effet, les CP sont produites en petit nombre et arrêtent leurs divisions précocement dans le germarium, ce qui donne une fenêtre de temps restreinte pour l'induction de l'évènement de recombinaison (Besse and Pret, 2003).

Cependant, les phénotypes d'aplatissement et d'étalement des CF clonales ainsi que les problèmes de morphologie des follicules tardifs fréquemment observés suggèrent que *sqh* a été bien diminué dans ces cellules. Néanmoins, avec si peu des clones obtenus dans les CP pour *sqh*⁺ et *sqh*¹, nous ne pouvons pas définitivement conclure si *sqh* joue un rôle dans le processus d'élimination des CP surnuméraires. Par conséquent, nous avons décidé d'utiliser une autre stratégie pour réaliser une perte de fonction de Sqh ciblée les CP.

2. L'expression de différents transgènes *sqh*-ARNi dans les CP n'altère pas le nombre de CP aux stades tardifs.

Le système UAS/Gal4 couplé à l'expression d'ARNi dirigés spécifiquement contre les ARNm de *sqh* a été utilisé pour déterminer si *sqh* jouait un rôle dans le processus d'élimination des CP surnuméraires. Le pilote *unpaired-Gal4* (*upd-Gal4*) dirige l'expression de n'importe quel transgène associé à des séquences UAS spécifiquement dans les CP à partir du stade 2 (Khammari et al., 2011). Préalablement à ces expériences, j'ai validé que deux lignées différentes *sqh*-ARNi (1 et 3) permettaient bien la diminution de Sqh (visualisée grâce à un anticorps spécifique dirigé contre Sqh) lorsqu'elles étaient utilisées pour générer des clones flip-out avec un promoteur *tubuline* fort (Fig. Supplémentaire 2A-D1).

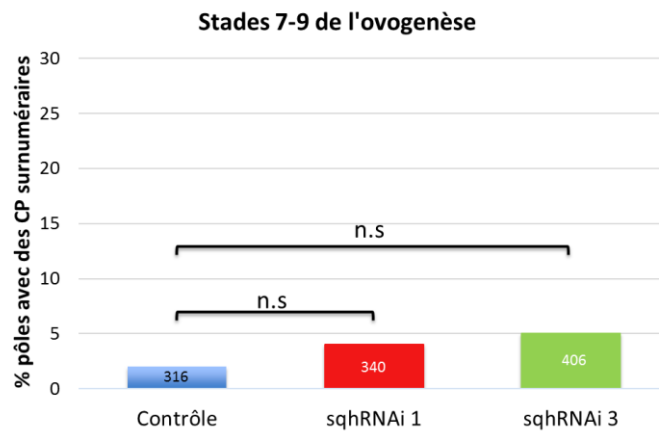


Figure 27. L'utilisation des transgènes (système UAS-Gal4) permettant d'exprimer des ARN double brin ciblant *sqh* spécifiquement dans les CP n'affecte pas le nombre de CP surnuméraires entre les stades 7-9. Graphique recensant le pourcentage de pôles de follicules entre les stades 7-9 avec des CP surnuméraires. La barre bleue correspond au contrôle (*upd-Gal4/+ ; +/CyO*), la barre rouge correspond à la lignée UAS-*sqh*ARNi 1 (*upd-Gal4/+ ; ; UAS-sqhARNi 1/+*) et la barre verte correspond à la lignée UAS-*sqh*ARNi 3 (*upd-Gal4/+ ; ; UAS-sqhARNi 3/+*). Un test de X^2 a été fait pour déterminer s'il y a une association entre le nombre des CP et les génotypes indiqués. Les comparaisons étaient non-significatives (n.s): Contrôle vs. UAS-*sqh*ARNi 1, $p=0,3476$; Contrôle vs UAS-*sqh*ARNi 3 $p=0,05379$. Le nombre de pôles comptabilisés pour chaque génotype est indiqué à l'intérieur de chaque barre. Ce nombre provient de la somme de deux expériences indépendantes qui ne montraient pas de différences significatives ($p>0,05$) dans les résultats obtenus.

Dans des follicules contrôles et des follicules diminués pour *sqh* (*sqh*-ARNi 1 et 3), les CP ont été identifiées grâce au marquage Fas3 et leur nombre a été comptabilisé dans des chambres à œufs aux stades tardifs 7 à 9 (Fig. 27). Pour le contrôle, 2% de pôles présentaient un excès de CP. Pour les CP exprimant *sqh*-ARNi 1 et 3, 4% et 5% de pôles contenaient des CP surnuméraires, respectivement (Fig. 27). Cette différence n'étant pas statistiquement significative (X^2 ; Contrôle vs *sqh*-ARNi 1, $p=0,3476$; Contrôle vs *sqh*-ARNi 3, $p=0,05379$), on peut conclure que la diminution de Sqh dans les CP n'est pas associée à une survie prolongée des CP surnuméraires aux stades 7 à 9. Néanmoins, étant donné qu'il s'agit d'un résultat négatif, nous n'avons pas la certitude que Sqh ait été suffisamment diminué dans les CP par cette technique. Toutefois le pilote *upd*-Gal4 a été utilisé plusieurs fois avec d'autres lignés ARNi et de fortes pénétrances ont été observées pour le phénotype de survie prolongée des CP (Khammari et al., 2011). Nous écartons donc l'hypothèse qu'une faible expression du Gal4 soit liée au résultat négatif obtenu. Par ailleurs, avec un autre pilote Gal4 ovarien et les mêmes deux lignées *sqh*-RNAi, nous avons obtenus des phénotypes qui seront décrits dans le prochain chapitre. Par conséquent, ces arguments nous amènent à proposer que Sqh ne joue pas un rôle prépondérant au sein des CP dans le processus d'élimination des CP surnuméraires. Afin de confirmer ces résultats, une troisième stratégie a été entreprise pour affecter l'activité de Sqh dans ces cellules.

C. *L'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CP n'affecte pas le nombre de CP aux stades tardifs.*

Afin de confirmer que *sqh* n'est pas impliqué dans l'élimination des CP surnuméraires, nous avons décidé d'exprimer une forme phosphomimétique de Sqh (Sqh^{DD}) spécifiquement dans les CP à partir du stade 2 à l'aide du système UAS/Gal4. Le transgène UAS-Sqh^{DD} contient deux acides aspartiques (D) qui remplacent la thréonine 20 et la sérine 21 de la protéine Sqh. Grâce à ces deux mutations, la

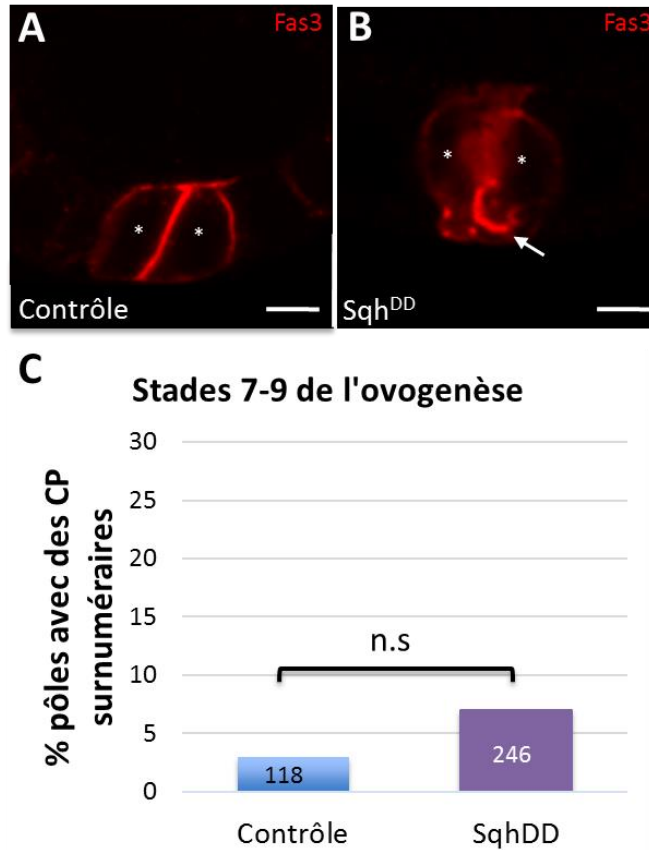


Figure 28. L'utilisation des transgènes (système UAS-Gal4) permettant l'expression d'une forme phosphomimétique de *sqh* (*Sqh^{DD}*) spécifiquement dans les CP n'affecte pas le nombre de CP aux pôles de follicules entre les stades 7-9. **A, B)** Images confocales des pôles de follicules au stade 7 de l'ovogenèse. Les CP sont identifiées par l'immunomarquage de la Fas3 en rouge et indiquées par des astérisques. **A)** Pôle d'un follicule contrôle (*upd-Gal4/+ ; +/CyO*) avec 2CP. **B)** Pôle d'un follicule de génotype *upd-Gal4/+ ; +/CyO ; UAS-sqh^{DD}/+* avec 2CP. La flèche indique la présence de protubérances de la membrane plasmique qui ressemblent aux blebs. Barre d'échelle : 2 μ m. **C)** Graphique recensant le pourcentage de pôles de follicules entre les stades 7-9 avec des CP surnuméraires pour les génotypes indiqués en (A, B). Un test de χ^2 a été fait pour déterminer s'il y a une association entre le nombre des CP et les génotypes indiqués. Les comparaisons étaient non-significatives (n.s) : $p=0,177$. Le nombre de pôles comptabilisés pour chaque génotype est indiqué à l'intérieur de chaque barre. Ce nombre provient de la somme de deux expériences indépendantes qui ne montraient pas de différences significatives ($p>0,05$) dans les résultats obtenus.

protéine Sqh^{DD} mime la phosphorylation de Sqh endogène en provoquant une activation constitutive dans le tissu où le transgène est exprimé (Mitonaka et al., 2007).

Dans des ovaires contrôles ou exprimant le transgène UAS-Sqh^{DD}, les CP ont été identifiées par le marquage Fas3 et leur nombre a été comptabilisé entre les stades 7 et 9. Des déformations de la membrane plasmique des CP, rappelant le processus de « blebbing » ayant lieu durant l'apoptose, ont été repérées lorsque Sqh^{DD} était exprimé dans les CP (Fig. 28A, B). Les blebs ont largement été associés à l'activité contractile du réseau d'acto-myosine dans plusieurs types cellulaires (Bergert et al., 2012; Charras and Paluch, 2008; Hagmann et al., 1999). Ainsi, ce phénotype sur les CP suggère qu'il est en lien avec une augmentation de l'activité de Sqh dans ces cellules.

Pour le contrôle et pour Sqh^{DD}, 2% et 7% de pôles avec de CP surnuméraires respectivement ont été identifiés entre les stades 7-9 (Fig. 28C). Cette différence n'est pas statistiquement significative (χ^2 ; Contrôle vs Sqh^{DD}, $p=0,1775$). Ce résultat suggère donc que l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CP n'affecte pas le processus d'élimination des CP surnuméraires. D'autre part, je n'ai jamais observé de pôles avec moins de CP (0 ou 1) ce qui indique que l'expression de Sqh^{DD} n'affecte pas non plus la survie des CP enveloppantes, bien qu'il modifie la forme de ces cellules.

D. L'expression de Sqh:GFP n'est pas altérée dans les CP lorsque upd est diminué dans l'épithélium folliculaire

Afin de déterminer si la voie de signalisation JAK/STAT contrôle l'expression de Sqh:GFP dans les CPs au cours de leur élimination, j'ai diminué *upd* à l'aide d'un ARNi exprimé spécifiquement dans les CP en utilisant le pilote *upd-Gal4* (la diminution d'*upd* dans ces conditions a été précédemment démontrée dans (Borensztein et al., 2013)). On sait que la diminution dans le follicule du ligand Upd secrété par les CP entraîne une dérégulation de l'activité JAK/STAT dans tout l'épithélium folliculaire.

Le transgène *sqh_{prom}⁻Sqh:GFP* a été utilisé pour analyser l'expression de Sqh:GFP dans les CP révélée par des anticorps anti-GFP et l'immunomarquage de la Fas3 pour identifier les CP.

Les génotypes *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-sqh:GFP/+* (appelé contrôle) et *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-sqh:GFP/UAS-upd-ARNi* (appelé upd-ARNi) ont été comparés qualitativement. 12 follicules par génotype contenant des groupes de 3CP aux stades 3-4 ont été analysés en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition pour le marquage Sqh:GFP. La protéine Sqh:GFP a été détectée au niveau du cytoplasme des CP avec une accumulation plus élevée du signal dans le domaine apical de ces cellules de façon similaire dans les deux contextes génétiques (Fig. 24B2 vs C2). Bien que des quantifications plus précises de l'intensité du signal Sqh:GFP permettraient d'affiner l'analyse, dans cette expérience on n'observe pas d'effet évident de la diminution d'*upd* sur l'accumulation de Sqh:GFP dans les CP.

Conclusion du chapitre

Mes résultats sur la localisation subcellulaire de Sqh:GFP montrent que cette protéine de fusion est distribuée dans le cytoplasme des CP avec une accumulation plus élevée dans leur domaine apical, similaire à celle observée pour la forme active Sqh1P. En particulier, Sqh:GFP présente deux distributions, l'une corticale et l'autre uniforme dans le domaine subapical des CP quelque soit l'étape du remodelage cellulaire des CP, c'est-à-dire indépendamment de la configuration que prennent les CP surnuméraires. Les CP enveloppantes montrent également ces deux distributions de Sqh:GFP mais la distribution corticale a été la plus fréquemment observée. Une analyse en temps réel pourrait permettre de préciser la dynamique de Sqh:GFP dans le groupe des CP.

Malgré le fait que plusieurs approches aient été utilisées, aucune donnée pour l'instant ne permet de mettre en évidence un rôle de la Myosine dans les CP pour le processus d'extrusion. Je n'ai pas observé d'accumulation de Sqh:GFP au niveau des JA qui remodelent, ni de structures en forme d'anneau dans les CP surnuméraires à un état avancé de remodelage. La diminution d'*upd* dans l'épithélium

folliculaire ne semble pas altérer le signal de Sqh:GFP dans les CP. La génération de clones homozygotes mutants *sqh*¹ (allèle hypomorphe) dans les CP ne conduit pas à des CP surnuméraires après le stade 6. De même, diminuer *sqh* dans les CP via l'expression d'ARNi n'a pas conduit à une survie prolongée entre les stades 7 et 9. Enfin, l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CP n'a pas non plus eu d'effet sur l'élimination des CP surnuméraires.

II. Sqh joue-t-il un rôle non-autonome cellulaire dans le processus d'élimination des CP surnuméraires

Nous avons montré qu'une diminution de l'expression du facteur de transcription *stat92E* dans les CF conduisait à une forte inhibition du remodelage des CP et donc de leur apoptose (Torres et al, soumis, première partie du manuscrit). Ceci met en évidence que les CF sont des acteurs essentiels dans ce processus. J'ai donc cherché à déterminer si *sqh* jouait un rôle non-autonome cellulaire dans le processus d'élimination des CP surnuméraires et si ceci était dépendant de la voie JAK/STAT.

A. Des analyses de localisation subcellulaire de Sqh révèlent deux distributions de cette protéine dans les CF et celles-ci semblent être régulées par JAK/STAT

1. Analyse de la localisation subcellulaire de Sqh dans les CF en utilisant des anticorps spécifiques contre la protéine endogène et sa forme active

Afin de déterminer la localisation subcellulaire de Sqh dans les CF, j'ai utilisé des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine Sqh et sa forme active (Sqh1P) (Zhang and Ward, 2011).

Les protéines Sqh et Sqh1P s'accumulent au niveau du domaine apical des CF de façon majoritaire (Fig. 29A-A2). Pour préciser leur localisation subcellulaire dans ce domaine, j'ai réalisé un double

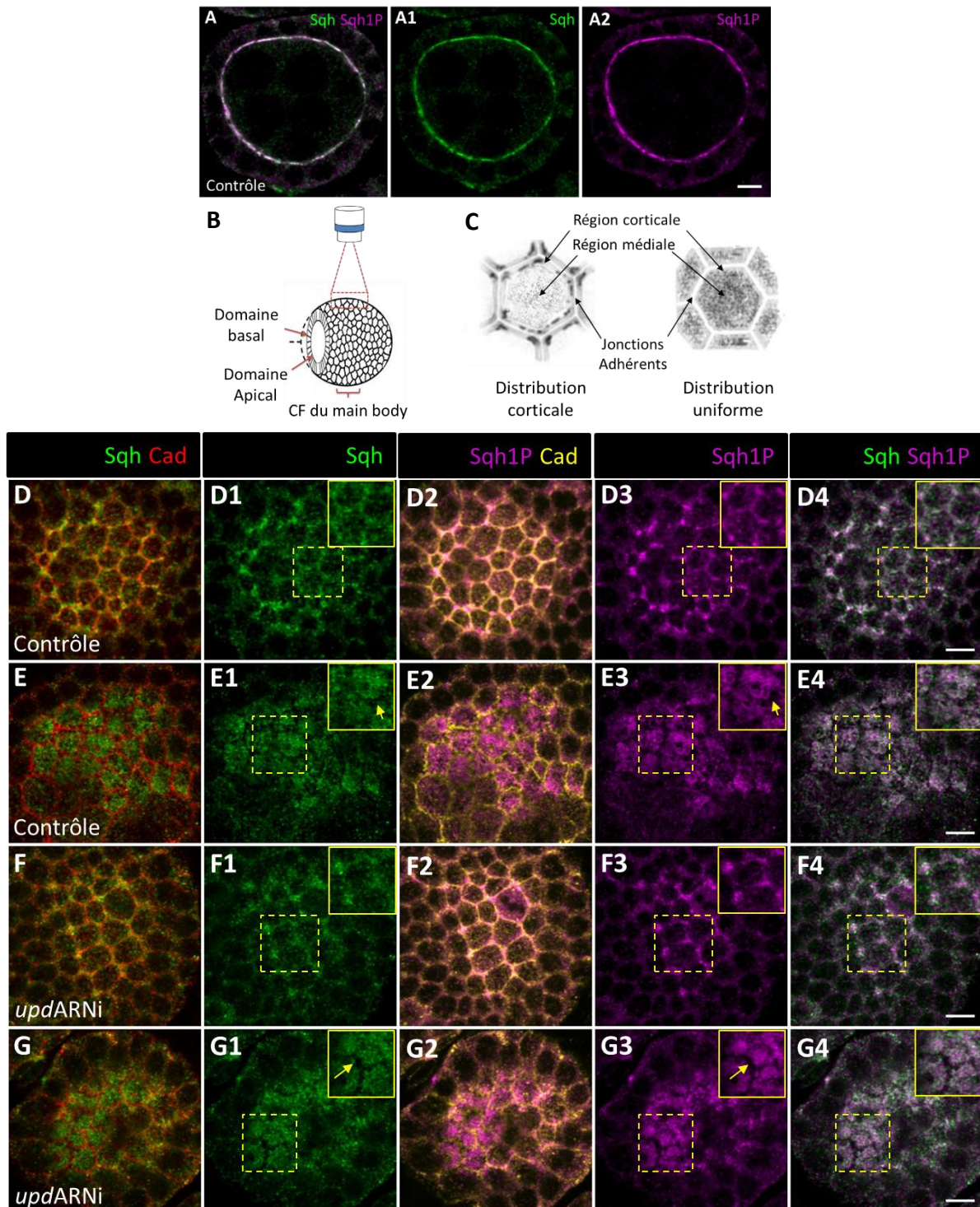


Figure 29. Distributions corticale et uniforme de la protéine endogène Sqh et sa forme active, Sqh1P, dans la région subapicale des CF. A-A2) Image confocale d'une vue sagittale d'un follicule au stade 4 de l'ovogenèse. (A) Immunomarquages superposés des protéines Sqh, marquée en vert, et Sqh1P, marquée en magenta. (A1) canal Sqh seul et (A2) canal Sqh1P seul. **B)** Schéma d'un follicule aux stades 3-4 de l'ovogenèse montrant les CF du *main body* qui ont été analysées dans cette expérience. Uniquement le domaine subapical a été étudié. **C)** Illustration des distributions corticale et uniforme de Sqh/Sqh1P dans le domaine subapical des CF. Ce domaine est divisé en trois régions : une région correspondant aux JA, une région corticale et une région médiale. Dans la distribution corticale, Sqh/Sqh1P sont enrichies dans la région corticale, bas et diffus dans la région médiale et dès fois

immunomarquage anti-Cadhérine pour révéler les JA de ces cellules. Les CF à côté des CP étant difficile d'accès avec le montage utilisé pour l'observation au microscope, j'ai focalisé mon étude sur le domaine subapical des CF localisées dans la région équatoriale des follicules (les CF du *main body*) pour les immunomarquages (Fig. 29B).

De façon similaire au marquage Sqh:GFP dans les CP, deux distributions de Sqh ont été observées chez le contrôle (*upd-Gal4/+ ; CyO/+*): une distribution corticale et une distribution uniforme (Fig. 29C, D-E4). Etant donné que les CF présentent des domaines subapicaux plus grands que ceux des CP, j'ai pu mieux caractériser ces distributions.

Dans la **distribution corticale**, Sqh a été observée en forme de *spots* majoritairement localisés au niveau du cortex (région corticale), dispersés dans la région médiale et exclue de la région jonctionnelle identifiée par la présence de la Cadhérine ainsi que parfois au niveau des sommets des CF (Fig. 29C, D, D1, D4). Dans la **distribution uniforme**, Sqh était présente dans tout le domaine subapical de façon uniforme et exclue de la région jonctionnelle (Fig. 29C, E, E1, E4).

Le marquage Sqh1P révèle également une distribution corticale (Fig. 29C, D2-D4) et une distribution uniforme (Fig. 29C, E2-E4) dans le domaine subapical des CF. Malgré le fait que les marquages Sqh et Sqh1P présentaient globalement les deux mêmes types de distributions (corticale et uniforme), ces marquages ne se chevauchent pas complètement (Fig. 29 D4, E4). Par exemple, dans la distribution corticale, le marquage de Sqh1P délimite bien les contours des CF de façon ininterrompue, contrairement à ce qui a été observé avec le marquage anti-Sqh (comparer petits carrés Fig. 29D1 vs D3). Ainsi la forme phosphorylée de Sqh semble être plus systématiquement adressée au cortex des CF que sa forme non phosphorylée. (Zhang and Ward, 2011)) ont montré sur des Western blots que l'anticorps anti-Sqh reconnaissait les formes phosphorylée et non phosphorylée de Sqh. *In situ*, dans un contexte natif où les protéines ne sont pas dénaturées comme dans un Western blot, mes résultats utilisant anti-Sqh et anti-Sqh1P montrent que dans l'épithélium folliculaire deux *pools* de Myosine II, active et non active, peuvent néanmoins être distingués.

localisée au niveau des JA, notamment aux sommets entre les CF. Dans la distribution uniforme, Sqh/Sqh1P sont localisées de façon homogène dans la région corticale ainsi que dans la région médiale et exclues des JA. **D-G)** Projections de 2-3 coupes ($z=0,3\mu\text{m}$) d'images confocales de follicules entre les stades 3-4 de l'ovogenèse immunomarkés pour Sqh en vert, Sqh1P en magenta, et Cadherine en rouge, comme indiqué en haut de chaque colonne. **D-E)** Follicules contrôles (*upd-Gal4/+ ; +/CyO*). **F-G)** Follicules rendus déficients pour JAK/STAT par le système UAS/Gal4 : *upd* a été diminué par ARNi spécifiquement dans les CP (*upd-Gal4/+ ; UAS-updARNi/CyO*). (D-D4, F-F4) Distribution corticale de Sqh/Sqh1P. (E-E4, G-G4) Distribution uniforme de Sqh/Sqh1P. (D1-G1, D3-G3, D4-G4) L'insert dans la partie supérieure droite de chaque image représente un agrandissement de la région indiquée par le carré jaune pointillé. (E1, E3, G1, G3) Les flèches jaunes indiquent les endroits où les marquages Sqh et Sqh1P sont absents correspondant aux JA. (A, D-G4) Barre d'échelle : $5\mu\text{m}$.

	Distribution corticale	Distribution uniforme	n
Contrôle	80%	20%	218 CF de 23 follicules
updARNi	82%	18%	218 CF de 22 follicules

Tableau 2. La distribution subapicale de Sqh/Sqh1P n'est pas altérée lorsqu'*upd* est diminué dans l'épithélium folliculaire. Les pourcentages des CF qui présentent la distribution corticale ou uniforme sont indiqués par génotype. Le contrôle correspond au génotype *upd-Gal4/+ ; +/CyO* et *updARNi* au génotype *upd-Gal4/+ ; UAS-updARNi/CyO*. Sqh et Sqh1P présentent les mêmes pourcentages par distribution et par génotype. Les nombres de CF et follicules analysés sont indiqués dans la colonne « n ».

En général, une dizaine des CF se trouvant dans un même plan focal présentaient soit une distribution corticale soit une distribution uniforme de Sqh/Sqh1P. Cependant, dans certains cas, dans un même follicule les deux distributions de Sqh/Sqh1P ont été observées. Lorsque ces distributions ont été quantifiées dans des follicules contrôles (*upd-Gal4/+ ; +/-CyO*), 80% des CF montraient une distribution corticale et 20% une distribution uniforme (n=218) (Tableau 2). Ces résultats suggèrent qu'il existe une dynamique de Sqh et de sa forme active dans le domaine subapical des CF, transitant entre les régions médiale et corticale des CF.

Mes résultats suggèrent également que la transition entre les distributions de Sqh ne serait pas une conséquence de son état d'activité puisque les deux distributions ont été observées quelque soit les anticorps utilisés, anti-Sqh ou anti-Sqh1P. Finalement, ils mettent aussi en évidence une dynamique de Sqh/Sqh1P puisqu'au sein d'un même follicule, les CF peuvent montrer des distributions différentes de ces protéines.

2. La diminution d'upd ne perturbe pas la distribution subcellulaire de la protéine Sqh endogène dans les CF.

Pour déterminer si les localisations subcellulaires de Sqh et de sa forme active mises en évidence dépendent de l'activité JAK/STAT dans le follicule, j'ai analysé le domaine subapical des CF des follicules déficients pour *upd* (*UAS-upd-ARNi*) aux stades 3 et 4 marqués avec les anticorps anti-Sqh et anti-Sqh1P.

De façon similaire au contrôle, lorsque l'activité JAK/STAT est diminuée dans l'épithélium folliculaire, les deux distributions de Sqh et de Sqh1P ont également été observées (Corticale : Fig. 29F-F4 ; Uniforme : Fig. 29G-G4). 82% des CF présentaient une distribution corticale et 18% une distribution uniforme (n=218) (Tableau 2), ce qui n'était pas significativement différent du contrôle (χ^2 , p=0,7185). Ceci suggère que l'activité JAK/STAT dans les CF n'est pas nécessaire pour la localisation subcellulaire de Sqh et de Sqh1P.

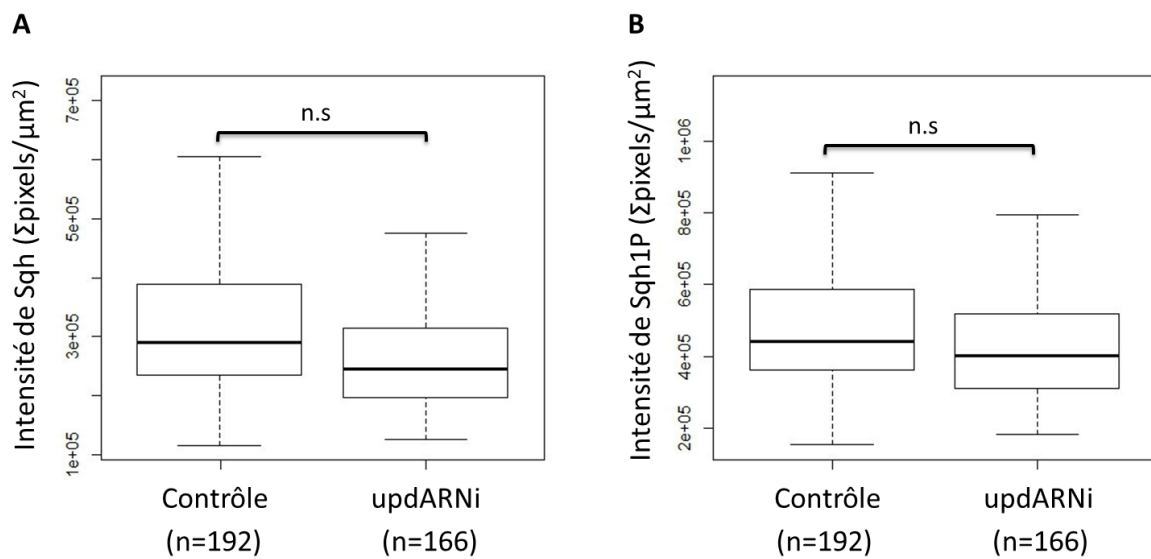


Figure 30. L'intensité de l'immunomarquage fluorescent de Sqh ou Sqh1P n'est pas affectée lorsqu'*upd* est diminué dans l'épithélium folliculaire. Des mesures d'intensité pour les immunomarquages Sqh (**A**) et Sqh1P (**B**) correspondent à la somme des pixels dans une région divisée par l'aire (μm^2) de cette région (voir Matériels et Méthodes). **A, B** Le contrôle correspond au génotype *upd-Gal4/+ ; +/CyO* et *updARNi* au génotype *upd-Gal4/+ ; UAS-updARNi/CyO*. Le nombre des CF analysé est indiqué par le « n » sous chaque génotype. Un test de wilcox a été effectué pour comparer les différences des résultats entre les génotypes. Celles-ci ont été non significatives (n.s). Contrôle vs *updARNi* : A) $p=0,2359$ et B) $p=0,6097$.

Des comparaisons d'intensité de Sqh et de Sqh1P entre des CF de follicules contrôles et *upd*-ARNi ont été entreprises pour déterminer si la voie JAK/STAT pouvait affecter les niveaux endogènes de Sqh ou de sa forme active (Fig. 30A, B). Aucune différence significative des niveaux de Sqh n'a été trouvée entre les deux contextes génétiques (wilcox.test ; Sqh : $p=0,2359$; Sqh1P : $p=0,6097$). Ces résultats indiquent que la diminution d'*upd* ne conduit ni à une altération des distributions de Sqh/Sqh1P dans les CF ni à des changements de leurs niveaux d'expression dans ces cellules. En conclusion, l'activité JAK/STAT ne semble pas contrôler la distribution globale de Sqh/Sqh1P ni les niveaux de protéine dans le domaine subapical des CF.

Pour confirmer ce résultat, une autre stratégie a été utilisée et donne un résultat surprenant.

3. *Dans un contexte sensibilisé pour les niveaux de Sqh, la diminution d'upd dans l'épithélium folliculaire affecte l'organisation de Sqh:GFP dans le domaine subapical des CF*

Pour tester si l'activité JAK/STAT dans les CF contrôle l'expression de Sqh dans ces cellules, nous avons utilisé le transgène *sqh_{prom}-Sqh:GFP* et nous avons réalisé des immunomarquages anti-GFP, anti-Sqh1P et anti-Fas3 (CP). Les ovaires de femelles des deux génotypes suivants : *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-sqh:GFP/+* (appelé contrôle) et *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-sqh:GFP/UAS-upd-ARNi* (appelé *upd-ARNi*) ont été analysés de cette manière. Les CF du *main body* des follicules entre les stades 3 et 4 ont été analysés pour la distribution subapicale de Sqh:GFP et Sqh1P (Fig. 29B).

Chez le contrôle, des distributions corticale et uniforme ont été observées pour Sqh:GFP (Fig. 31A-A1, B-B1) comme cela a été le cas pour Sqh et Sqh1 (Fig. 29D-G4). Comme dans l'expérience précédente, des patches de CF présentant la même distribution, soit corticale soit uniforme, ont été repérés. Une majorité de CF (73%) présentait une distribution corticale et une minorité (27%) une distribution uniforme de Sqh:GFP (n=408 cellules issues de 41 follicules) (Tableau 3). Ces proportions sont similaires à celles mises en évidence avec l'anticorps anti-Sqh en contexte sauvage pour Sqh sans le transgène Sqh:GFP (80% corticale, 20% uniforme) (Tableau 2). En revanche, la distribution corticale de Sqh:GFP présentait des différences par rapport à celle de Sqh endogène. En effet cette distribution

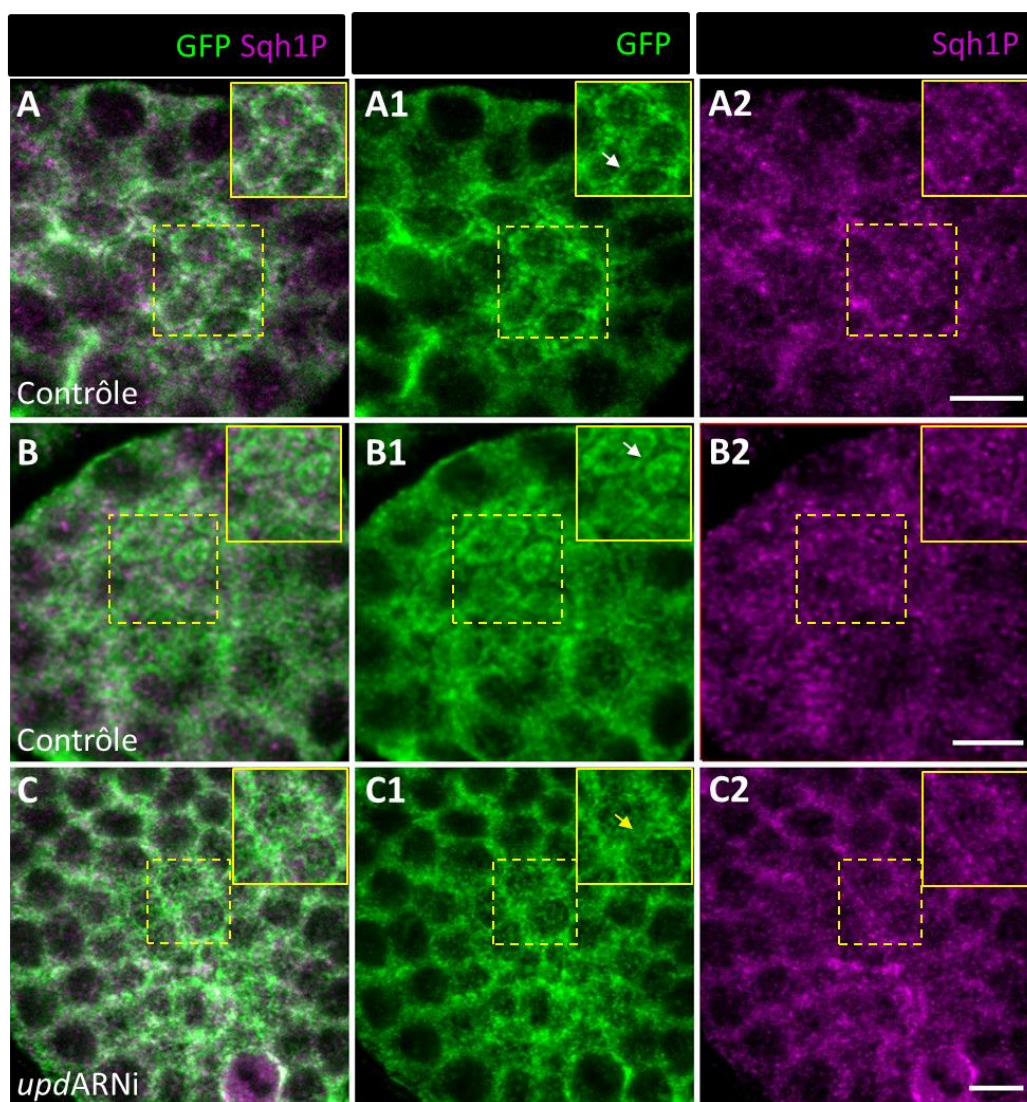


Figure 31. La diminution d'*upd* par ARNi dans l'épithélium folliculaire affecte les distributions de *sqh*:GFP dans la région subapicale des CF. Des projections de 2 coupes ($z=0,3\mu\text{m}$) d'images confocales des follicules entre les stades 3-4 de l'ovogenèse. L'immunomarquage de la GFP en vert révèle la localisation de la protéine de fusion Sqh:GFP (A-C, A1-C1). L'immunomarquage de Sqh1P est en magenta (A-C, A2-C2). **A, B** Follicules contrôles (*upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-Sqh :GFP/+*). **C** Follicules rendus déficients pour JAK/STAT par le système UAS/Gal4 : *upd* a été diminué par ARNi spécifiquement dans les CP (*upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-Sqh:GFP/UAS-updARNi*). (A-A1) Distribution corticale de Sqh:GFP. (B-B1) Distribution uniforme de Sqh:GFP. (C-C1) Distribution de Sqh:GFP qui ressemble à une distribution corticale. (A2-B2) Le marquage Sqh1P est très diffus et il est impossible de déterminer une distribution particulière. (A-C2) L'insert dans la partie supérieure droite de chaque image représente un agrandissement de la région indiquée par le carré jaune pointillé. (A1, B1) La flèche blanche indique l'emplacement de la membrane plasmique où se trouvent les JA dans ce plan subapical (libre du marquage Sqh:GFP). (C1) La flèche jaune indique que l'emplacement de la membrane plasmique où se trouvent les JA présente un marquage Sqh:GFP dans ce contexte génétique. Cette expérience a été réalisée 3 fois de façon indépendante générant des résultats similaires à chaque fois. Barre d'échelle : $5\mu\text{m}$.

était dans certains cas plus épaisse que pour Sqh endogène (comparer Fig. 31A1 et Fig. 29D1). D'autre part, l'exclusion de Sqh:GFP de la région jonctionnelle était plus évidente que pour Sqh endogène (comparer Fig. 31A1 flèche et Fig. 29D1).

Par ailleurs, dans le contexte génétique *upd-Gal4/sqh^{AX3} ; sqh_{prom}-Sqh:GFP/+*, la localisation subcellulaire de Sqh1P était modifiée en comparaison avec celle du contexte génétique *upd-Gal4/+ ; +/CyO*. En effet, les contours subapicaux des CF n'étaient pas bien délimités par le marquage anti-Sqh1P (comparer Fig. 31A2, B2 et Fig. 29D3, E3). Ce résultat a été reproduit plusieurs fois au cours d'expériences indépendantes, indiquant qu'il ne s'agissait pas d'un problème de marquage de l'anticorps anti-Sqh1P mais bien d'un effet sur la distribution/propriété de la forme active de la protéine. Par conséquent dans ce contexte génétique dans lequel la dose de *sqh* endogène est diminuée de moitié et compensée par l'expression de la protéine de fusion Sqh:GFP, l'adressage de la forme phosphorylée de Sqh à la région corticale des CF est perturbé.

Dans les follicules *upd-ARNi (upd-Gal4/sqh^{AX3} ; sqh_{prom}-Sqh:GFP/UAS-upd-ARNi)*, Sqh:GFP était localisée majoritairement au niveau du cortex des CF (97%, Tableau 3) et la distribution uniforme était très rare et n'était jamais retrouvée dans des groupes de plus de 5 CF par follicule (3%, Tableau 3). Dans ce contexte également, l'exclusion de Sqh:GFP des régions jonctionnelles n'a pas été observée de manière très évidente (Fig. 31C1 vs. A1)

De plus, des mesures d'intensités de Sqh:GFP dans des follicules contrôles et *upd-ARNi* (voir Matériels et Méthodes) ont révélé que lorsqu'*upd* était diminué dans l'épithélium folliculaire, une diminution de l'intensité du signal Sqh:GFP d'environ 50% a été observée, ce qui était statistiquement significatif (wilcox.test ; $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$), (Fig. 32). En revanche, la distribution anormale de Sqh1P observée dans le contexte génétique contrôle utilisé n'a pas été modifiée par une diminution d'*upd* (Fig. 31A2 vs. C2).

En conclusion, les résultats obtenus avec cette stratégie indiquent que le remplacement d'une dose de *sqh* par Sqh:GFP perturbe le système puisque la forme phosphorylée de Sqh n'est plus trouvée dans la région corticale des CF. Ceci montre que la protéine de fusion Sqh:GFP n'est pas complètement

	Distribution corticale	Distribution uniforme	n
Contrôle	73%	27%	408 CF de 41 follicules
<i>updARNi</i>	97%	3%	360 CF de 42 follicules

Tableau 3. La distribution subapicale de Sqh:GFP est altérée lorsque *upd* est diminué dans l'épithélium folliculaire. Les pourcentages des CF qui exhibent la distribution corticale ou uniforme sont indiqués par génotype. Le contrôle correspond au génotype *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-Sqh:GFP/+* et *updARNi* au génotype *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-Sqh:GFP/UAS-updARNi*. Pour ce dernier génotype, la distribution observée majoritairement est la distribution corticale avec très peu de CF présentant la distribution uniforme. Les nombres de CF et follicules analysés sont indiqués dans la colonne « n ». Cette quantification a été réalisée à partir de follicules provenant de 3 expériences indépendantes pour lesquelles les mêmes paramètres d'acquisition d'images ont été utilisés.

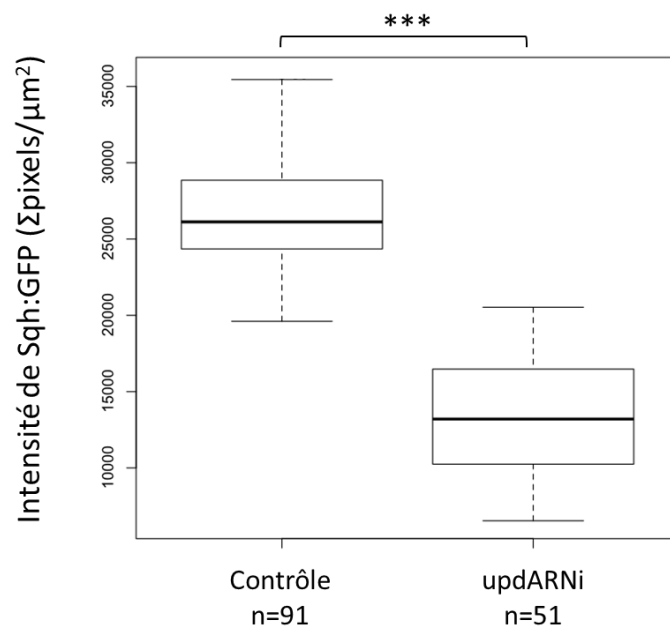


Figure 32. L'intensité de l'immunomarquage fluorescent de Sqh:GFP est plus faible lorsqu'*upd* est diminué dans l'épithélium folliculaire. Des mesures d'intensité de la GFP correspondant à la somme des pixels dans une région divisée par l'aire (μm^2) de cette région (voir Matériels et Méthodes). Le contrôle correspond au génotype *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-Sqh:GFP/+* et *updARNi* au génotype *upd-Gal4/sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-Sqh:GFP/UAS-updARNi*. Le nombre de CF analysé est indiqué par le « n » sous chaque génotype. Un test de wilcox a été effectué pour comparer les différences des résultats entre les génotypes. Celles-ci sont significatives : $p < 2,2^{-16}$.

équivalente à la protéine Sqh endogène. Dans ce contexte sensibilisé, la diminution d'*upd* conduit à une désorganisation de la localisation corticale de Sqh:GFP dans les CF ainsi qu'à la présence de cette protéine dans leur région jonctionnelle. De plus, la localisation de Sqh:GFP dans la région médiale des CF en contexte *upd*-ARNi semble empêchée.

B. La perte partielle de fonction de sqh dans les CF suggère un rôle de Sqh dans ces cellules pour le processus d'élimination des CP.

1. Des clones sqh¹ homozygotes dans l'épithélium folliculaire sont associés à un blocage précoce et tardif du processus d'élimination des CP surnuméraires.

Ayant mis en évidence différentes distributions de Sqh dans le domaine subapical des CF, j'ai voulu tester si une diminution de *sqh* dans les CF affectait l'élimination des CP surnuméraires. Pour ce faire, des clones mitotiques homozygotes *sqh⁺* et *sqh¹* (allèle hypomorphe de *sqh*) ont été générés par le système de recombinaison FLP/FRT (voir Matériels et Méthodes) (Tableau 1). Les cellules clonales *sqh⁺* et *sqh¹* ont été repérées par l'absence de l'immunomarquage de la GFP et le nombre des CP aux différents stades par l'immunodétection de la Fas3 (Fig. 33A-F).

Parmi les clones relativement grands (≥ 10 cellules) qui incluaient les CF, cinq catégories ont été établies (Tableau 1 ; catégories 2-6). La catégorie permettant d'évaluer exclusivement un rôle non-autonome cellulaire de *sqh*, c'est-à-dire des clones excluant les CP (catégorie 2) était minoritaire pour les deux allèles sauvage et mutant de *sqh* (*sqh⁺* 16%, n=12/74 ; *sqh¹* 7%, n=5/76). En revanche, celles incluant les CP et les CF (catégories 3-6) ont été observées les plus fréquemment. Les CF et CP partagent un précurseur commun. Il est donc plus fréquent d'observer les deux populations cellulaires affectées par un évènement de recombinaison plutôt que les CP uniquement (Besse and Pret, 2003).

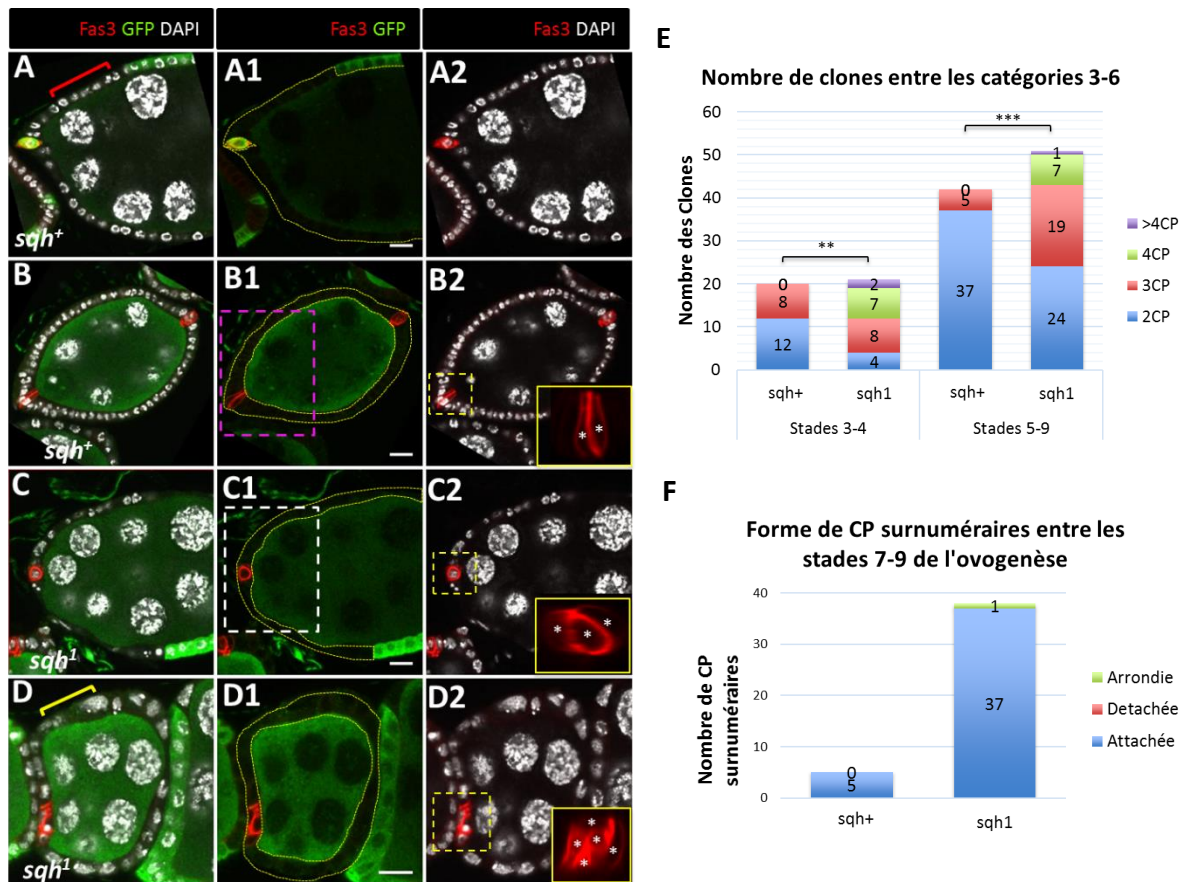


Figure 33. La réduction du nombre et le remodelage des CP surnuméraires sont affectés dans des clones des CP et CF homozygotes mutantes pour *sqh*¹. **A-D2)** Images confocales des follicules de stades 5-9 dans lesquels des clones mitotiques homozygotes *sqh*⁺ (A-B2) et *sqh*¹ (C-D2) ont été induits. L'absence d'immunomarquage de la GFP (vert) indique les clones cellulaires induits, l'immunomarquage de la Fas3(rouge) indique les CP et le DAPI colore tous les noyaux (niveau de gris). Les marquages montrés sont indiqués en haut de chaque colonne d'images. Les clones sont délimités par des pointillés jaunes en A1-D1. (A, A1) Follicule avec un grand clone dans les CF, catégorie clonale #2. Le crochet rouge en (A) indique la présence de plusieurs noyaux de taille homogène des CF homozygotes *sqh*⁺, contrairement à ceux indiqués par le crochet jaune en (D) qui sont de taille hétérogène et correspondent aux CF homozygotes *sqh*¹. (B, B1, D, D1) Follicules avec des clones comprenant tout l'épithélium folliculaire, catégorie clonale 4. (C, C1) Follicule avec clones incluant des CF et CP, catégorie clonale 3. (B1, C1) Le carré pointillé en magenta (B1) indique un pôle apical de follicule avec une morphologie pointue quand les CF sont homozygotes *sqh*⁺ contrairement à ce qui est observé pour un pôle apical de follicule aplati quand les CF sont homozygotes *sqh*¹. (B2-D2) Les carrés dans la partie inférieure droite des images correspondent à des agrandissements de la région indiqués par le carré pointillé jaune dans chaque image. Les astérisques indiquent chacune des CP dans un groupe. Il y a 2 CP par pôle dans les follicules contrôles et >2CP lorsque des CP et CF sont homozygotes *sqh*¹. Barre d'échelle : 10µm (A1-D1). **E)** Graphique recensant le nombre de clones identifiés pour les catégories 3-6 par contexte génétique (clones *sqh*⁺ vs. *sqh*¹) et également classés par stades précoces (3-4) vs. tardifs (5-9). Les barres des différentes couleurs représentent le nombre des CP dans chaque clone : bleu = 2CP, rouge = 3CP, vert = 4CP, violet = >4CP. A l'intérieur de chaque barre est indiqué le nombre de clones identifiés. Des clones avec 4 et >4CP ont été trouvés pour *sqh*¹ et pas pour *sqh*⁺. Un test χ^2 a été réalisé pour comparer les résultats par stade entre les deux génotypes afin de déterminer s'il y a des associations entre contexte génétique et nombre des CP. Ces

Dans les épithéliums folliculaires présentant des clones homozygotes *sqh¹* de catégories 4-6, plusieurs défauts cellulaires ont été observés ainsi que des problèmes de forme de la chambre à œuf. Par exemple, certaines CF dans ces clones étaient aplaties et étalées avec des noyaux de tailles hétérogènes (Crochets, Fig. 33 A vs. D). De plus, la forme normalement pointue des pôles antérieurs de follicules tardifs était aplatie en présence de clones *sqh¹* (rectangles, Fig. 33B1 vs. C1). Ces phénotypes déjà décrits par (Wang and Riechmann, 2007)) en utilisant l'allèle amorphe *sqh^{AX3}* valident donc notre approche.

De façon intéressante, la quantification des groupes de 2CP et de plus de 2CP associés aux clones *sqh⁺* et *sqh¹* dans les catégories 3-6, a montré une différence significative entre les deux génotypes aux stades 3-4 et 5-9 (Fig. 33E) (χ^2 , $p=0,00721$; $p=3,39^{-05}$, respectivement). Notamment, des pôles contenant 4 CP ou plus de 4CP ont été observés pour les follicules déficients pour *sqh* mais jamais pour les follicules contrôles (Fig. 33E catégories verte et violette), ce qui met en évidence une forte expressivité du phénotype >2PC pour les follicules mutants *sqh¹*. Le marquage Fas3 a aussi permis l'identification de la forme des CP surnuméraires entre les stades 5 et 9. A ces stades tardifs, la plupart des CP surnuméraires pour des follicules *sqh¹* présentait une configuration attachée (Fig. 33F), indiquant que ces cellules se trouvaient dans les premières phases du remodelage apical. Ces résultats montrent que la perte partielle de *sqh* dans l'épithélium folliculaire bloque le processus d'élimination des CP surnuméraires très précocement.

D'autre part, des pôles de follicules mutants pour *sqh¹* présentaient parfois des corps apoptotiques identifiés avec le marqueur Fas3, à l'intérieur ou juste à côté de groupes de CP (Fig. 34A-C2, A2 vs. B2, C2), suggérant qu'ils provenaient de la fragmentation de CP surnuméraires. La comptabilisation de ces corps apoptotiques aux différents stades dans toutes les catégories de clones (1-6) a montré qu'ils étaient plus nombreux pour les clones *sqh¹* que pour les *sqh⁺* (Fig. 34D). Ces différences sont statistiquement significatives (χ^2 , $p=0,01418$). Ces résultats montrent que la perte partielle de *sqh* dans l'épithélium folliculaire affecte aussi le processus d'élimination des CP surnuméraires dans sa

comparaisons indiquent des associations statistiquement significatives pour les différents stades : stades 3-4, $p=0,00721$; stades 5-9, $p=3.39^{-05}$. **F)** Graphique recensant la forme des CP surnuméraires aux pôles des follicules de stades 7-9 pour les clones sqh^+ et sqh^1 . La forme de ces CP est définie comme Attachée, Détachée et Arrondie (voir manuscrit). Le nombre de CP surnuméraires observé par catégorie de forme est indiqué à l'intérieur de chaque barre. La plupart des CP surnuméraires en sqh^1 sont dans une forme attachée apicalement.

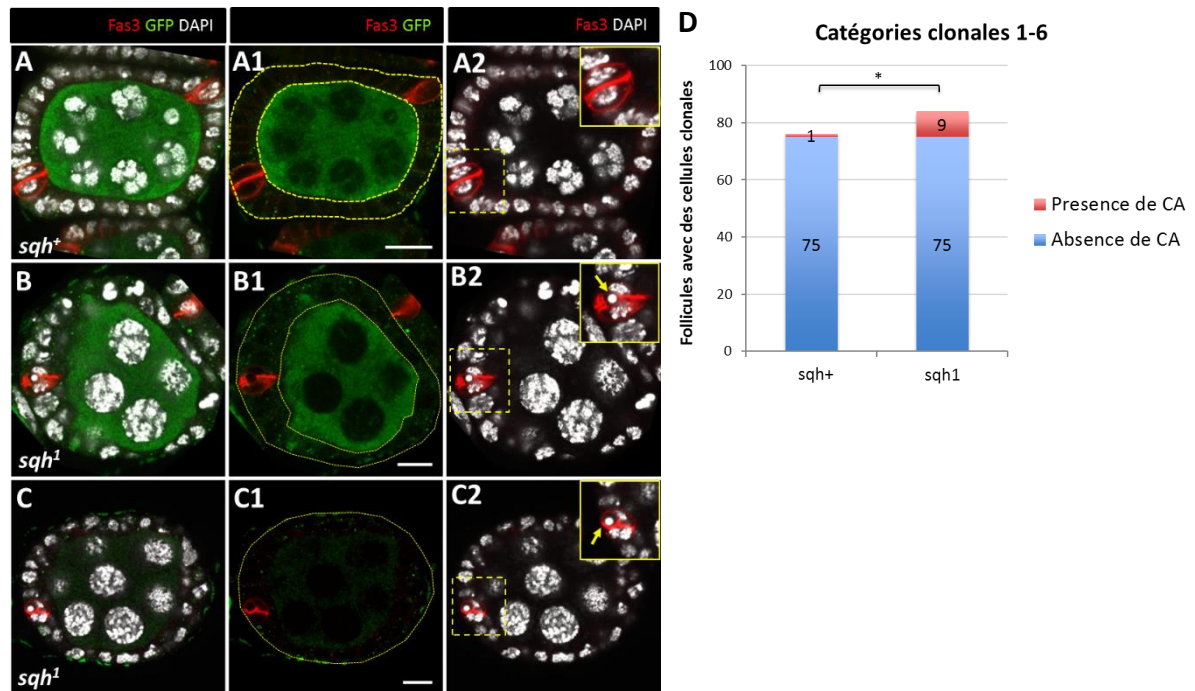


Figure 34. L'élimination des corps apoptotique des CP surnuméraires est également affectée dans de clones des CP et CF homozygotes mutantes pour sqh^1 . **A-C2)** Images confocales des follicules entre les stades 5-9 avec des clones mitotiques homozygotes sqh^+ (A-A2) ou sqh^1 (B-B2). Les clones sont identifiés par l'absence d'immunomarquage de la GFP (A-C, A1-C1) et ils sont délimités par les pointillés jaune en (A1-C1). Les CP sont identifiées par l'immunomarquage Fas3 en rouge (A-C2) et la coloration au DAPI indiquent les noyaux des cellules en niveau de gris (A-C, A2-C2). A-B2) Follicules avec des clones sqh^+ (A-A2) ou sqh^1 (B-B2) comprenant tout l'épithélium folliculaire, catégorie 4. C-C2) Follicule avec des clones sqh^1 comprenant tout l'épithélium folliculaire et la lignée germinale, catégorie 5. (A2-C2) Les carrés dans la partie supérieure droite des images correspondent à des agrandissements de la région indiqués par le carré pointillé jaune dans chaque image. (B2, C2) Les flèches jaunes dans les carrés jaunes indiquent les corps apoptotiques des CP surnuméraires. (A-C2) Barre d'échelle : 10 μ m. **D)** Graphique recensant la présence (rouge) ou absence (bleu) des corps apoptotiques (CA) dans toutes les catégories des clones établis (follicules de stades 3-9). Le total des follicules analysé par contexte génétique est indiqué à l'intérieur de chaque barre. Un test χ^2 met en évidence une association entre la présence de CA et les clones sqh^1 , $p=0,01418$.

phase tardive, c'est-à-dire, l'expulsion latérale et/ou la migration des corps apoptotiques dans l'épithélium folliculaire.

En conclusion, les résultats obtenus à partir de cette analyse de clones mitotiques mutants *sqh*¹ générés dans l'épithélium folliculaire montrent que *sqh* est impliqué dans le processus d'élimination des CP surnuméraires. En tenant compte uniquement des résultats de cette analyse clonale, et étant donné le faible nombre de clones obtenus seulement dans les CF ou seulement dans les CP, nous ne pouvons pas distinguer un rôle autonome d'un rôle non autonome cellulaire de *sqh* pour l'élimination des CP surnuméraires.

2. L'expression de deux ARNi dirigés contre *sqh* dans les CF affecte l'apoptose des CP surnuméraires.

Afin de confirmer un rôle de *sqh* exclusivement dans les CF pour le processus d'élimination de CP surnuméraires, j'ai entrepris une stratégie complémentaire à l'approche clonale. J'ai utilisé deux lignées ARNi (UAS-*sqh*-ARNi 1 et 3) validées dans le chapitre I (Fig. supplémentaire 2A-D1), pour une expression spécifique dans les CF à l'aide du pilote *fruitless*-Gal4 (*fru*-Gal4) décrit dans (Borensztejn et al., 2013). Malheureusement, ces combinaisons de transgènes se sont avérées létales au stade pupal. Il m'a donc fallu contourner cette létalité en utilisant le système UAS/Gal4 combiné à l'expression d'un répresseur thermosensible de Gal4 (Gal80^{ts}) (voir Matériels et Méthodes et Fig. Supplémentaire 3A, B).

Dans ces conditions, des défauts dans la morphologie de la chambre à œuf ont été observés pour les deux ARNi dirigés contre *sqh*. Comme dans l'analyse de clones *sqh1* et *sqh+*, un aplatissement des pôles antérieurs des follicules a été observé (Fig. 35A, C vs B, D). Ceci était visible à la fois dans des follicules présentant une forme plus sphérique ou au contraire plus allongée que les contrôles (Fig. 35A, C vs B, D). Ces défauts pourraient être en lien avec un rôle de la Myosine dans le processus

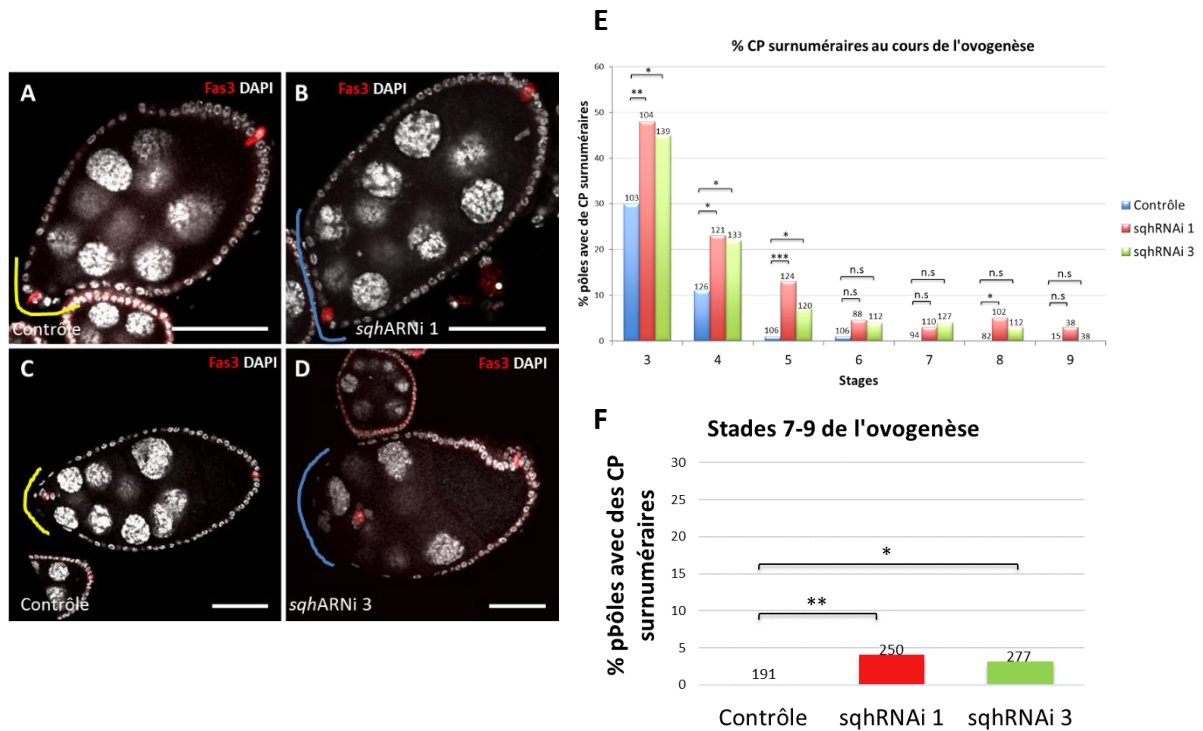


Figure 35. L'utilisation des transgènes (système UAS/Gal4/Gal80ts) permettant l'expression d'ARN double brin ciblant *sqh* spécifiquement dans les CF par ARNi affecte la morphologie de la chambre à œuf et le nombre des CP au cours de l'ovogenèse. Images confocales des follicules dans les stades 8 (A, B) et 9 (C, D) de l'ovogenèse. Les CP sont identifiées par l'immunomarquage Fas3, en rouge. Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI en gris. **A, C)** Follicules contrôles (+/+ ; *tub*-Gal80/+ ; *fru*-Gal4/+). **B, D)** Follicule exprimant *sqh*ARNi 1 dans les CF avec le pilot *fru*-Gal4 (+/+ ; *tub*-Gal80/+ ; *fru*-Gal4/UAS-*sqh*ARNi 1). **D)** Follicule exprimant *sqh*ARNi 3 dans les CF avec le pilot *fru*-Gal4 (+/+ ; *tub*-Gal80/+ ; *fru*-Gal4/ UAS-*sqh*ARNi 3). (A, C) Le trait jaune suit la forme pointue du pôle antérieur des follicules. (B, D) Le trait bleu suit une forme plate ou plus arrondie du pôle antérieur des follicules. Barre d'échelle : 50µm. **E)** Graphique recensant les pourcentages de pôles présentant des CP surnuméraires par génotype dans les différents stades de l'ovogenèse. Un test χ^2 a été fait par stade entre le contrôle et les lignées ARNi afin d'évaluer si une association existe entre le génotype et le nombre des CP. Les comparaisons entre le contrôle et *sqh*ARNi 1 étaient significatives pour les stades 3-5, 8 ($p=0,00804$; $0,01188$; $0,0005488$; $0,0428$, respectivement) et non significatives pour les stades 6, 7 ($p=0,115$; $0,1067$, respectivement). Les comparaisons entre le contrôle et *sqh*ARNi 3 étaient significatives pour les stades 3-5, ($p=0,01626$; $0,0208$; $0,02811$, respectivement) et non significatives pour les stades 6-8 ($p=0,1147$; $0,05167$; $0,1353$, respectivement). Les stades 9 n'ont pas été comparés dû au faible nombre d'effectif dans le contrôle. Le total des pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre. Ce nombre provient de la somme de deux expériences indépendantes qui ne montraient pas de différences significatives ($p>0,05$) à l'intérieur de chaque génotype. **F)** Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype entre les stades 7-9 de l'ovogenèse. Le test χ^2 a donné des différences significatives : contrôle vs *sqh*ARNi 1, $p=0,008064$; contrôle vs *sqh*ARNi 3, $p=0,01784$. Le total des pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre.

d'élongation de la chambre pendant les stades tardifs de l'ovogenèse (He et al., 2010; Valencia-Expósito et al., 2016). Ainsi, l'observation de ces phénotypes valide la dérégulation de *sqh* dans les CF par cette technique.

Dans des chambres contrôles et déficientes pour *sqh* (*sqh*-ARNi 1 et 3), les CP ont été identifiées grâce au marquage Fas3 et leur nombre a été comptabilisé aux différents stades de l'ovogenèse (Fig. 35E). Pour les deux lignées *sqh*-ARNi, j'ai observé un pourcentage significativement plus élevé de pôles avec des CP surnuméraires aux stades 3 à 5 par rapport au contrôle (Fig. 35E ; χ^2 , p-values décrites dans la légende). Pour chacun des stades 6 à 9, un faible pourcentage de survie prolongée des CP surnuméraires a été observé (Fig. 35E). Cependant, en groupant les stades 7 à 9 pour chaque génotype (Fig35F), j'ai détecté une différence significative dans le nombre de pôles des CP surnuméraires pour les deux ARNi par rapport au contrôle (contrôle vs *sqh*-ARNi 1, $p=0,008064$; contrôle vs *sqh*-ARNi 3, $p=0,01784$). Ces résultats montrent que la diminution de *sqh* dans les CF affecte l'apoptose des CP surnuméraires.

D'autre part, nous n'avons pas observé de corps apoptotiques exprimant Fas3 avec les différents ARNi utilisés, contrairement à ce qui avait été vu avec les clones *sqh*¹. Ceci pourrait être dû à une faible expressivité de ces deux ARNi dirigés contre *sqh* en combinaison avec ce pilote aux stades pendant lesquels l'élimination des CP surnuméraires a lieu.

En conclusion, les résultats de la diminution de *sqh* dans les CF par l'utilisation de deux ARNi sont similaires à ceux que nous avons trouvés lors de l'analyse de clones *sqh*¹. Dans les deux cas, la perte de fonction partielle de *sqh* affecte l'élimination des CP surnuméraires. En outre, l'analyse par ARNi de *sqh* ciblé aux CF permet de préciser un rôle non autonome cellulaire de ce gène pour ce processus.

C. L'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh spécifiquement dans les CF affecte le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires.

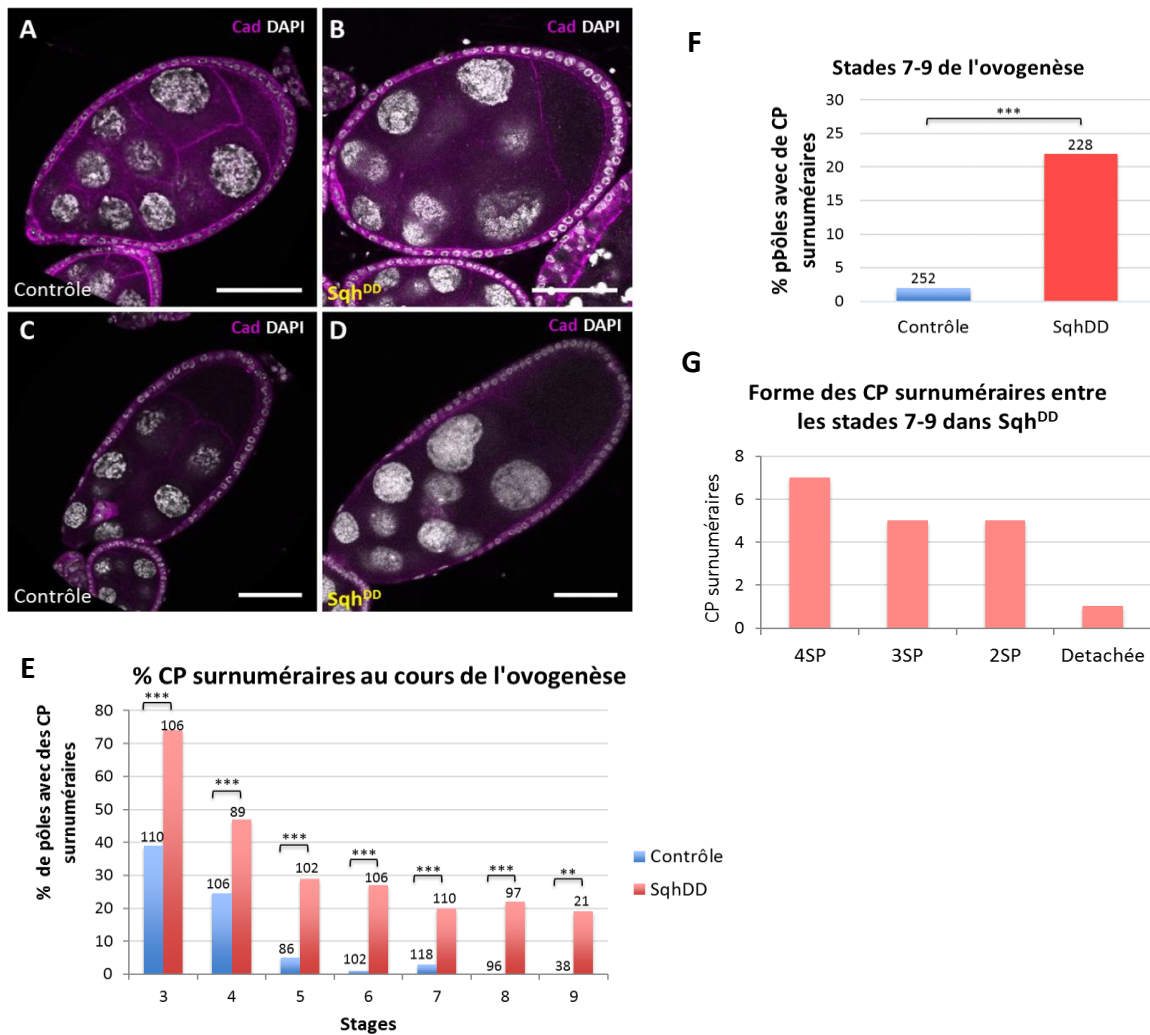


Figure 36. L'utilisation d'un transgène portant les séquences codantes pour une forme phosphomimetique de Sqh (Sqh^{DD}) dans les CF affecte la morphologie de la chambre à œuf et l'élimination des CP surnuméraires. A-D) Images confocales des follicules aux stades 8 (A, B) et 9 (C, D) de l'ovogenèse. L'immunomarquage Cadherine en magenta révèle le domaine subapical des cellules et le DAPI en gris marque leurs noyaux. **A, C)** Des follicules contrôles (*fru-Gal4/+*) présentant une forme ovoïde. **B, D)** Des follicules portant le transgène Sqh^{DD} et le transgène pilote *fru-Gal4* (*fru-Gal4/ UAS-Sqh^{DD}*) présentent une forme sphérique (B) ou allongé (D). Barre d'échelle : 50µm. **E)** Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype dans les différents stades de l'ovogenèse. Un test χ^2 a été fait par stade entre le contrôle et Sqh^{DD} afin d'évaluer si une association existe entre le génotype et le nombre de CP. Les comparaisons entre les génotypes étaient significatives pour tous les stades de l'ovogenèse : stades 3-9, $p=3,294^{-07}$; $0,0009408$; $1,111^{-05}$; $6,189^{-08}$; $8,05^{-05}$; $1,906^{-07}$; $0,005328$, respectivement. Le nombre des pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre. Ce nombre provient de la somme de deux expériences indépendantes qui ne montraient pas de différences significatives dans la distribution des phénotypes à l'intérieur de chaque génotype. **F)** Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype entre les stades 7-9 de l'ovogenèse. Le test χ^2 indique une différence significative : $p=1,874^{-12}$. Le total des pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre. **G)** Graphique recensant la forme que présentent les CP surnuméraires aux pôles des follicules entre les stades 7-9 pour Sqh^{DD}. La plupart de ces CP sont bloquées dans les premières étapes du remodelage (4SP-2SP).

Afin de compléter notre analyse visant à déterminer si *sqh* est nécessaire dans les CF pour l'élimination des CP surnuméraires, j'ai également induit l'expression de la forme phosphomimétique de Sqh (Sqh^{DD}), décrite dans le chapitre I, spécifiquement dans les CF en utilisant le pilote *fru-Gal4*. Des ovaires contrôles et exprimant le transgène UAS-Sqh^{DD} dans les CF ont été marqués avec des anticorps anti-Cadhérine et les noyaux avec du DAPI pour révéler toutes les cellules de la chambre à œuf ainsi qu'anti-Fas3 pour identifier et comptabiliser le nombre des CP à différents stades de l'ovogenèse.

Lorsque le transgène UAS-Sqh^{DD} a été exprimé dans les CF, des follicules tardifs étaient sphériques ou au contraire allongés en comparaison avec des follicules contrôles (Fig. 36A, C vs. B, D). La diminution de la phosphatase de RLC de la Myosine, Flapwing, a également été associée à la production de chambre à œuf allongées (Valencia-Expósito et al., 2016). Ceci suggère que dans nos expériences Sqh^{DD} agit de façon constitutivement active dans les CF.

Concernant les CP, j'ai comptabilisé le pourcentage de pôles avec des CP surnuméraires aux stades 3 à 9 de l'ovogenèse dans les follicules contrôles et dans les follicules exprimant Sqh^{DD} dans les CF. Quand Sqh^{DD} est exprimée dans les CF, 74% et 47% de pôles aux stades 3 et 4, respectivement, présentaient des CP surnuméraires (Fig. 36E). Cette différence qui correspond presque au double du contrôle est statistiquement significative (Fig. 36E ; χ^2 , p-values décrits dans la légende). Pour les stades 5 à 9 exprimant Sqh^{DD} dans les CF, le pourcentage de pôles avec des CP surnuméraires descend légèrement mais reste très haut comparé au contrôle (Fig. 36E, F). Ces différences sont statistiquement significatives (Fig. 36E ; χ^2 , p-values décrits dans la légende). L'ensemble des résultats montre que l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CF inhibe l'apoptose des CP surnuméraires.

Les groupes de CP surnuméraires aux stades tardifs (7-9) ont aussi été analysés avec des reconstructions 3D ou des *reslices* afin de déterminer à quelle étape le processus d'élimination des CP était bloqué. Un total de 18 groupes de CP surnuméraires a été étudié. Pour la quasi-totalité de ces groupes (17/18), les CP surnuméraires étaient arrêtées dans les premières phases du remodelage

(4SP-2SP) (Fig. 36G). Ainsi, ce résultat suggère que l'expression de Sqh^{DD} dans les CF, inhibe également le remodelage des CP surnuméraires.

En conclusion, l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CF génère une inhibition du remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires. Ce résultat met en évidence un rôle de la régulation de l'activité de Sqh dans le processus d'élimination des CP surnuméraires.

Conclusion du chapitre

Trois approches ont été utilisées pour déterminer si *sqh* jouait un rôle dans les CF pour le processus d'élimination des CP surnuméraires : 1) Déterminer la localisation subcellulaire de Sqh et sa forme active dans les CF ; 2) Déterminer si la signalisation JAK/STAT jouait un rôle sur la localisation subcellulaire de Sqh et sur sa forme active dans les CF ; et 3) Déterminer si la dérégulation de *sqh* dans les CF avait un effet sur l'élimination des CP surnuméraires.

Les résultats issus de l'analyse qualitative et quantitative de la localisation subcellulaire de trois formes de Sqh (Sqh totale, Sqh1P et Sqh:GFP) révèlent deux distributions de Sqh dans le domaine apical des CF : une localisation corticale (autour de 80%) et une localisation uniforme (corticale + médiale, autour de 20%). Ces observations suggèrent une dynamique de Sqh dans les CF impliquant une transition entre ces deux états. Dans les deux cas, Sqh semble être exclue de la région jonctionnelle des CF.

La distribution corticale de Sqh et Sqh1P n'était pas complètement chevauchante, celle de Sqh était souvent interrompue tandis que ce n'était pas le cas pour Sqh1P. Ces résultats suggèrent que la forme active de Sqh est spécifiquement localisée dans une région corticale restreinte très rapprochée de la région jonctionnelle. L'expression de Sqh:GFP perturbe la localisation de Sqh1P puisque celle-ci n'est plus trouvée systématiquement au cortex des CF. En effet, dans cette expérience Sqh:GFP est exprimée sous le contrôle de son propre promoteur et remplace une des copies sauvages endogènes.

Vraisemblablement, l'introduction de cette protéine chimère altère la localisation de la forme active de Sqh dans les CF.

La localisation subcellulaire de ces trois formes de Sqh a également été analysée dans un contexte de diminution d'*upd* par ARNi. La localisation subcellulaire de Sqh et Sqh1P n'était pas modifiée quand *upd* était diminué par rapport au contrôle. Au contraire, la quantité et la localisation subcellulaire de Sqh:GFP étaient modifiées dans un contexte de diminution d'*upd*. Notamment, la quantité de Sqh:GFP était diminué de moitié, sa localisation uniforme était rarement observée et finalement sa localisation corticale était désorganisée lorsqu'*upd* était diminué. Il est donc possible que le contexte d'expression de Sqh:GFP utilisé représente un contexte sensibilisé pour les niveaux de Sqh permettant de mettre en évidence que la signalisation de JAK/STAT joue sur la quantité et la localisation subcellulaire de Sqh:GFP. D'autres analyses seraient nécessaires pour confirmer et préciser la nature d'un lien entre la voie JAK/STAT et la régulation de Sqh.

Afin de déterminer si la dérégulation de *sqh* dans les CF a un effet sur l'élimination des CP surnuméraires trois approches ont été utilisées : deux permettant la perte de fonction partielle de *sqh* et une basée sur l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh, Sqh^{DD}. Les résultats des deux approches de perte de fonction partielle de *sqh* (clones *sqh*¹ et de *sqh-ARNi*) indiquent que la fonction de *sqh* dans les CF est impliquée dans l'élimination des CP surnuméraires. L'analyse des clones *sqh*¹ a permis de montrer que l'implication de *sqh* se fait durant les stades précoces du remodelage cellulaire. De façon inattendue, l'expression de la forme Sqh^{DD}, considérée comme une forme constitutivement active (Mitonaka et al., 2007), dans les CF perturbe l'élimination des CP surnuméraires dès les premières étapes du remodelage cellulaire comme c'est le cas pour la perte partielle de fonction de *sqh*. Pour expliquer ce résultat, il est possible que Sqh^{DD} ait un effet dominant négatif dans notre système ou que les niveaux d'activité de Sqh doivent être finement régulés et qu'une augmentation ou une diminution de cette activité donne le même phénotype. Quelque soit l'explication, ce résultat vient appuyer une implication non autonome cellulaire de Sqh pour le remodelage avant l'élimination des CP surnuméraires.

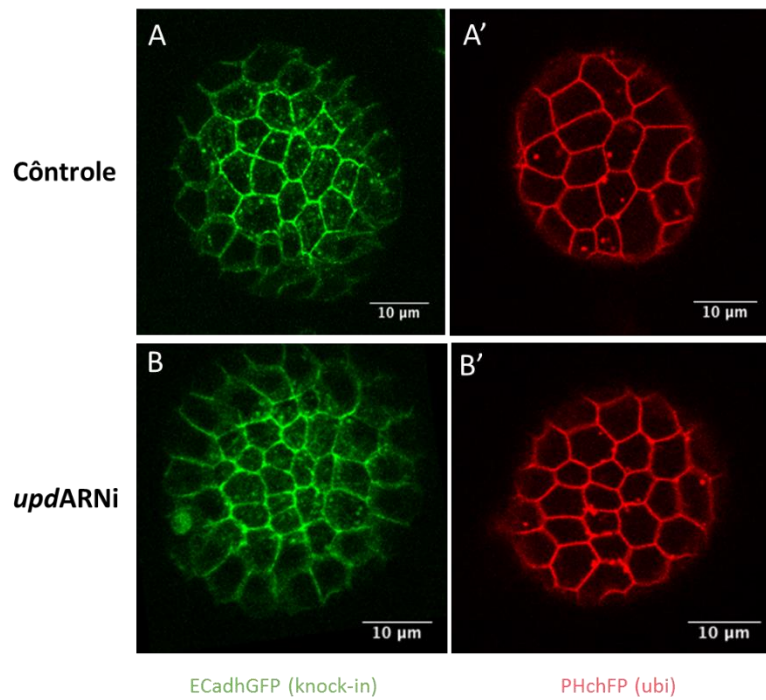


Figure 37. Les CF déficientes pour l'activité JAK/STAT ont une forme plus régulière que les contrôles.
A-B') Projections du domaine subapical (à gauche, en vert) et latéral (à droite, en rouge) de follicules contrôles (*upd-Gal4/+*; ECadh:GFP, PH:chFP/Cyo) (A, A') et *updARNi* (*upd-Gal4/+*; ECadh:GFP, PH:chFP/UAS-*updARNi*) (B, B'). Les CF présentent une forme plus régulière lorsque *upd* est diminué dans l'épithélium folliculaire.

Ainsi, la voie JAK/STAT ainsi que l'activité de Sqh dans les CF interviennent dans ce processus. Est-ce qu'il existe un lien entre les activités de la voie JAK/STAT et de Sqh dans l'épithélium folliculaire ?

Mes résultats préliminaires permettent de proposer que la voie JAK/STAT serait impliquée dans la régulation de Sqh dans les CF. Si c'est le cas, une hypothèse serait que la signalisation JAK/STAT influence la dynamique des CF et donc de l'épithélium, ce qui pourrait être important pour permettre le remodelage et l'extrusion apoptotique des CP aux pôles des follicules.

III. Etude de la dynamique des cellules folliculaires

Etant donné l'implication fonctionnelle de l'activité JAK/STAT et du réseau d'acto-myosine dans une contribution non autonome cellulaire du remodelage des CP et l'interaction génétique mis en évidence, je me suis intéressée à déterminer si l'activité JAK/STAT dans les CF affectait la dynamique de ces cellules.

A. Les CF déficientes pour l'activité JAK/STAT ont une forme plus régulière que les contrôles

Pour déterminer la dynamique des CF, j'ai filmé des follicules de stades 5 pendant 20-30 minutes en réalisant des *stacks* de la moitié des follicules toutes les 2 minutes. La figure 37 compare les projections subapicales et latérales des follicules de stade 5 de deux génotypes contrôle *upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/Cyo et *upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/UAS-*upd*ARNi à un temps donné. Le transgène ECadh:GFP est un *knock-in*, l'expression de la protéine de fusion correspond donc à l'expression endogène de ce marqueur des JA et révèle les contours cellulaires dans ce domaine. Le transgène PH:chFP pilote l'expression ubiquitaire d'une fusion du domaine PH (*Pleckstrin Homology*) et de la cherryFP. C'est un excellent marqueur du domaine latéral des CF.

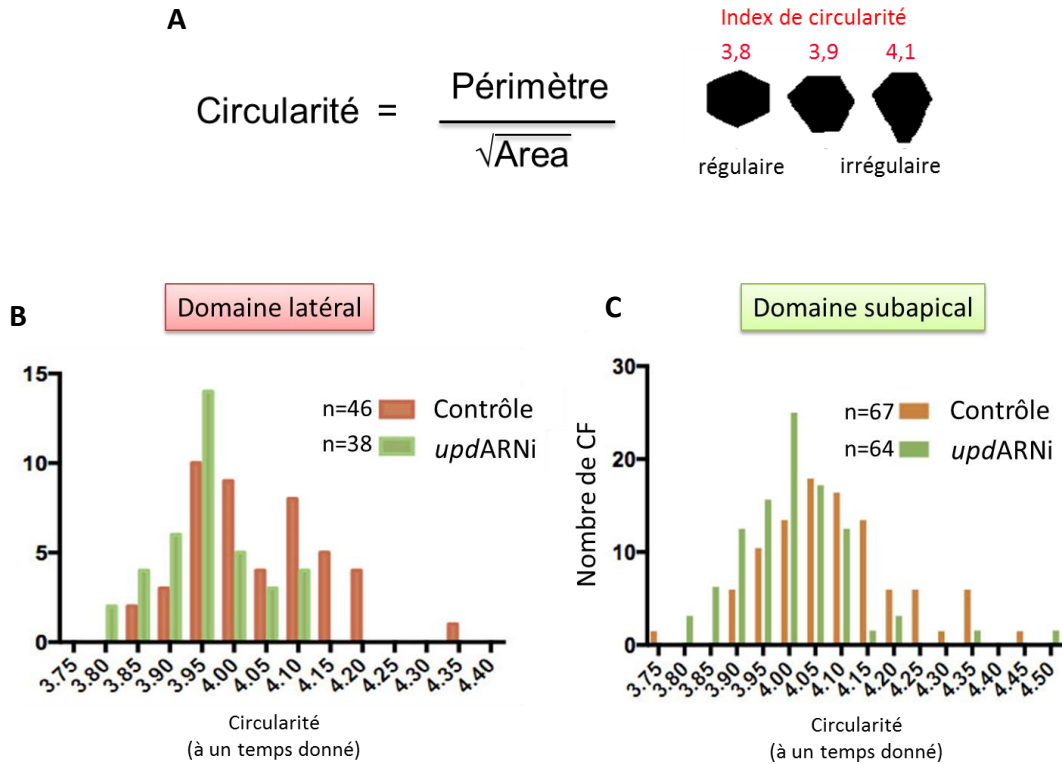


Figure 38. Dans de follicules déficients pour JAK/STAT les CF sont plus régulières que celles du contrôle. A) La circularité est définie par le rapport entre le périmètre d'un objet et la racine carrée de son aire. Plus un polygone est régulier, plus l'index de circularité est faible. **B, C)** Distributions des index de circularité du domaine latéral (B) ou du domaine subapical (C) des CF dans un temps donné entre le contrôle (*upd-Gal4/+ ; ECadh:GFP, PH:chFP/Cyo*) en couleur orange, et *updARNi* (*upd-Gal4/+ ; ECadh:GFP, PH:chFP/UAS-updARNi*) en couleur vert. La distribution correspondante à *updARNi* est décalée à gauche, donc ces cellules sont plus régulières que les contrôles. Un test de wilcox a été effectué pour comparer les différences entre les distributions de ces deux génotypes. Celles-ci ont été significatives pour le domaine latéral $p=0,0003$ (B) ainsi que pour le domaine subapical $p=0,0002$ (C).

Dans des follicules déficients pour JAK/STAT, à l'œil, le domaine latéral des CF semblent être plus régulière que dans le contrôle (Fig. 37A', B'), c'est-à-dire avoir des côtés (ligne entre deux sommets) dont la longueur est plus homogène par cellule. Ce qui n'est pas du tout évident pour la partie subapicale (Fig. 37A, B). Pour quantifier la régularité des CF, je me suis servie de la circularité (C), un des paramètres utilisés pour étudier la forme cellulaire, qui mesure le rapport entre le périmètre d'un objet (P) et la racine carrée de son aire (A), soit $C=P/\sqrt{A}$. Les CF sont des polygones. La circularité est donc un très bon indicateur de la mesure de leur régularité, sachant que plus un polygone est régulier, plus l'index de circularité est faible (Fig. 38A). J'ai mesuré l'aire et le périmètre des CF à partir de projections latérales et subapicales que j'ai segmenté à l'aide du logiciel FIJI et le *plugin Tissue Analyser* développé par Benoit Aigouy. J'ai comparé les index de circularité à un temps donné. La Figure 38 montre que la distribution des fréquences de circularité est différente pour les follicules déficients pour l'activité JAK/STAT à la fois dans la partie latérale des CF (Fig. 38B, à gauche) mais également dans la partie subapicale (Fig. 38B, à droite) et ce de façon significative ($p=0,0003$ et $0,0002$ en latéral et subapical, respectivement). Ces données montrent que les CF des follicules comparés ont une régularité significativement différente entre les deux génotypes. Différents temps ont été comparés et dans tous les cas la circularité était plus bas dans des follicules déficients pour JAK/STAT. Ces résultats préliminaires montrent que l'activité JAK/STAT dans le follicule est nécessaire pour maintenir un certain niveau d'hétérogénéité de la forme cellulaire.

B. Les CF déficientes pour JAK/STAT se déforment moins que les contrôles

Un regardant les films sur les follicules déficients pour JAK/STAT par rapport aux contrôles, un second phénotype perceptible à l'œil, est l'apparente moindre déformation des CF. Pour quantifier ce phénotype, nous avons choisi de mesurer le déplacement latéral des jonctions (Fig. 39A, B), sachant qu'une cellule qui change d'aire ou se déforme voit un ou plusieurs de ses côtés changer de position dans le plan. Pour compenser les déplacements globaux des follicules au cours de l'acquisition, nous

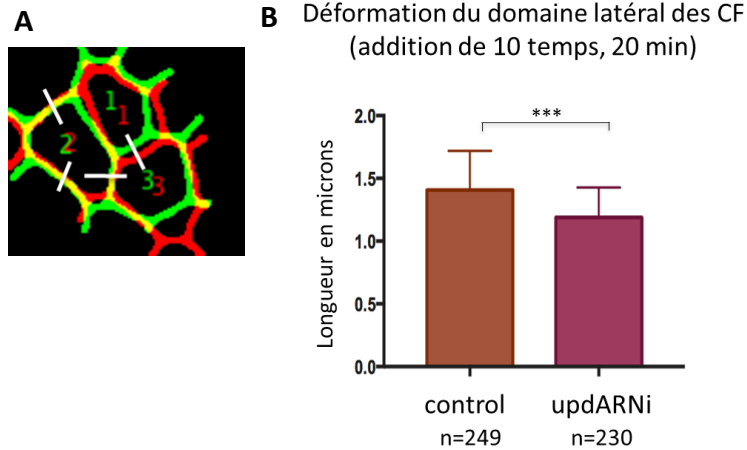


Figure 39. Le domaine latéral des CF se déforme moins au cours du temps dans des follicules déficients pour JAK/STAT par rapport à celui des CF contrôles. A) Illustration du domaine latéral de 3 CF entre deux temps. Chaque temps est représenté par la couleur vert et rouge, respectivement. Des traits perpendiculaires aux jonctions (traits blancs) ont été tracés afin de mesurer l'amplitude du déplacement distal maximum des jonctions. Si les jonctions ne se déforment pas beaucoup, une combinaison entre les différentes couleurs utilisées sera observée, et dans ce cas-là, la couleur jaune met en évidence la faible déformation. **B)** Graphique comparant la déformation du déplacement distal maximum de jonctions par génotype entre 10 temps. Le contrôle (*upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/Cyo) est représenté en marron et *updARNi* (*upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/UAS-*updARNi*) est représenté en violet. Le total d'échantillons est indiqué par le « n » sous chaque génotype. Un test de wilcox a été effectué pour comparer les différences entre les distributions de ces deux génotypes. Celles-ci ont été significatives $p < 0,0001$.

avons réalisé un traitement des films avec le plugin *StackReg* pour compenser cet effet et mesurer les distorsions cellulaires liées à leurs déformations et pas les mouvements d'ensemble. Les projections latérales sur 10 temps (soit 20 minutes de films au total) ont été sommées à l'aide du plugin « *Temporal-Color code* » (Fig. 39A) et les images obtenues binarisées. Des traits ont ensuite été tracés perpendiculairement aux jonctions (Fig. 39A) et traduits en « *plot profile* » à partir desquels la longueur du pic à mi-hauteur a permis de mesurer l'amplitude du déplacement distal maximum des jonctions. La figure 39B montre une différence significative ($p < 0,0001$) entre les deux génotypes, indiquant que l'absence d'activité JAK/STAT dans le follicule affecte l'amplitude du déplacement distal maximum des jonctions sur 10 temps (intervalle 2 min) et donc rend compte d'une déformation moindre des cellules sur cette échelle de temps. Ce résultat montre que la voie JAK/STAT semble contrôler la déformabilité cellulaire.

C. La variation absolue des aires des CF n'est pas significativement différente entre les follicules déficients pour JAK/STAT et les contrôles

Afin de comprendre la nature des défauts dans la déformation des CF déficientes pour JAK/STAT, nous avons ensuite comparé les variations des aires des CF dans les mêmes follicules (3 de chaque génotype) pour les deux régions latérale et subapicale des CF. Dans cette expérience, plus précisément, ce sont les moyennes sur 10 temps des variations absolues des aires entre deux temps consécutifs qui ont été comparées. Nous avons choisi de comparer les valeurs absolues et non les valeurs relatives pour ne pas biaiser les comparaisons. En effet, sachant que les valeurs des variations d'aires relatives sont des quotients, ils sont influencés par les tailles des cellules. Une aire de grande taille fera varier un delta de façon plus importante qu'une aire de petite taille et donc impactera de façon non linéaire sur la moyenne. En revanche, la variation d'aire absolue, ne tenant pas en compte l'aire de la cellule, n'est pas sujette à une fluctuation dépendante de la taille de l'aire.

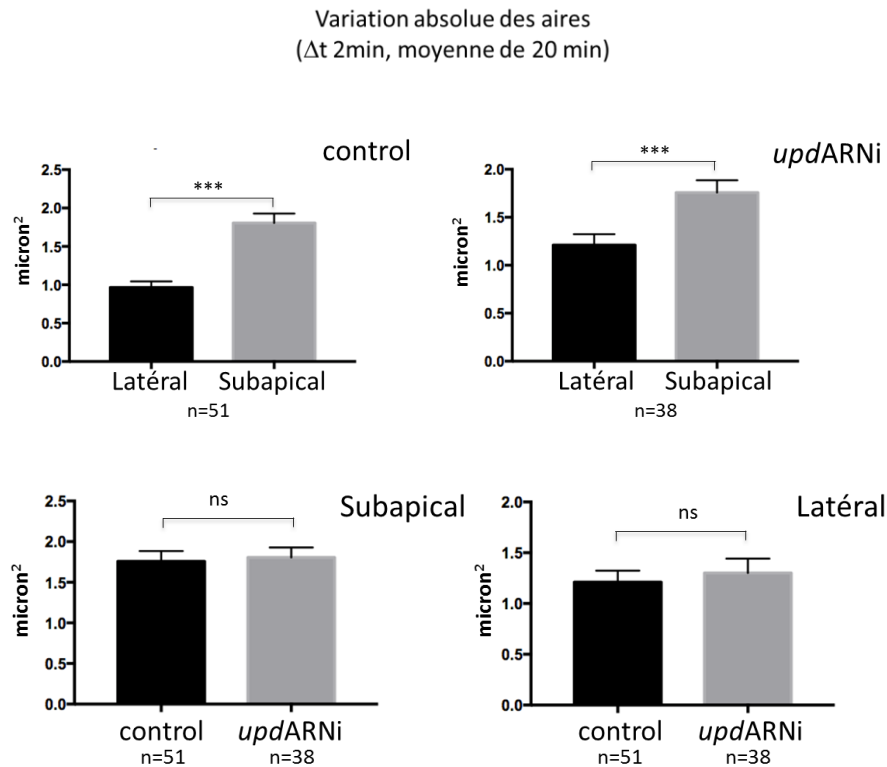


Figure 40. Il n’y a pas de différence entre la taille des aires des domaines subapicaux et latéraux des CF des follicules contrôles et déficients pour JAK/STAT. **A, B)** Quantification de la variation des aires absolues (variation entre deux temps consécutifs avec une moyenne de 10 temps, par CF) du domaine latéral (noir) et subapical (gris) dans le contrôle (*upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/Cyo) (A) et dans *updARNi* (*upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/UAS-*updARNi*). Le total d’échantillons est indiqué par le « n ». Le test de wilcox a été effectué pour comparer les différences de taille entre les domaines dans chaque génotype. Celles-ci ont été significatives $p < 0,0001$. **C, D)** Comparaisons entre les deux génotypes dans le domaine subapical (C) et le domaine latéral (D). Le test de wilcox a permis de déterminer qu’il n’y a pas de différences significatives entre le contrôle et *updARNi*.

Que donne les comparaisons entre domaine des mêmes cellules et entre génotype. La figure 40 montre que la variation absolue moyenne sur 10 temps de l'aire subapicale est significativement plus élevée que la variation absolue moyenne sur 10 temps de l'aire latérale des mêmes cellules (Fig. 40A) ($p < 0,0001$). Ce résultat n'est pas surprenant puisque ce phénotype est largement perceptible à l'œil lorsqu'on compare les fluctuations des CF à partir des films réalisés. Ceci s'explique aussi par la concentration apicale du réseau d'acto-myosine dans les CF (Fig. 29A). Nous remarquons que cette différence est aussi vraie pour les follicules déficients pour l'activité JAK/STAT dans lesquels la variation absolue moyenne sur 10 temps de l'aire est aussi plus forte dans la partie apicale que pour le domaine latéral (Fig. 40B) ($p < 0,0001$).

En revanche, il n'y a pas de différence significative lorsqu'on compare la variation absolue moyenne sur 10 temps dans le domaine latéral des CF entre les deux génotypes (Fig. 40D). Ceci implique que bien que les CF des follicules déficients pour l'activité JAK/STAT se déforment moins que dans le contrôle, pour autant leurs aires latérales ne varient pas plus en moyenne sur une échelle de 2 min. Le même résultat est obtenu lorsque nous comparons les domaines subapicaux des CF entre génotypes (Fig 40C), montrant que quel que soit le domaine considéré, latéral ou subapical, l'aire des CF fluctue de la même façon sur une échelle de 2 minutes, que l'activité JAK/STAT soit normale ou diminuée dans le follicule. Mais alors, comment expliquer que les CF dans les follicules *updARNi* se déforment moins par rapport aux contrôles s'il n'y a pas de différences significatives dans les aires des CF entre les deux génotypes ?

D. Les longueurs des jonctions des CF déficientes pour JAK/STAT fluctuent moins que celles des follicules contrôles

Etant donné que la forme des cellules pourrait être influencée par le remodelage de leurs jonctions, nous nous sommes demandé si une variation moins importante de leurs longueurs pourrait expliquer le phénotype de moindre déformation observé dans les follicules déficients pour la voie JAK/STAT.

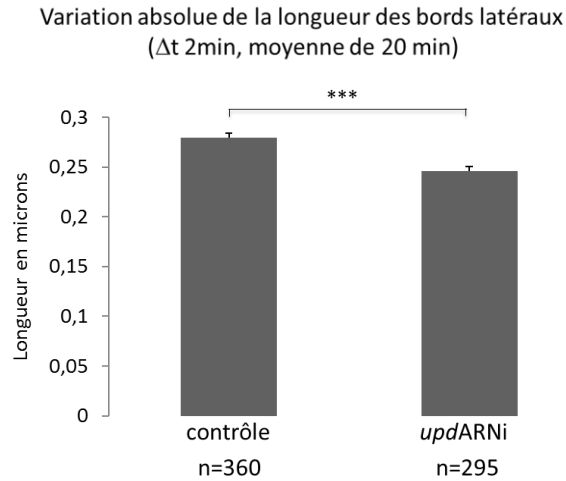


Figure 41. Dans des follicules déficients pour JAK/STAT les côtés latéraux des CF fluctuent moins que ceux du contrôle. Quantification de la variation absolue (variation entre deux temps consécutifs avec une moyenne de 10 temps, pour chaque bord des CF) des longueurs des côtés latéraux pour le contrôle (*upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/Cyo) (A) et pour *updARNi* (*upd-Gal4/+* ; ECadh:GFP, PH:chFP/UAS-*updARNi*). Le total des échantillons est indiqué par le « n ». Le test de wilcox a été effectué pour comparer les différences entre les génotypes et celles-ci sont significatives $p < 0,0001$.

Pour ce faire, Veronica Teixeira, une étudiante de L2Bio+ de l'Université Paris Sud accueillie pour deux mois par mon directeur de thèse et que j'ai encadrée pour la partie d'analyse statistique, a pris en charge la mesure manuelle et la comparaison de la variation absolue moyenne de la longueur des jonctions (10 temps, intervalles de 2 minutes) dans le domaine latéral de CF dans les mêmes follicules. Pour ce faire, un protocole de gestion d'étiquetage et de suivi des jonctions a été mis en place pour exécuter les mesures et le traitement des données dans un tableau excel. Au total, plus de 4400 jonctions ont été étiquetées et mesurées.

La figure 41 montre que la variation absolue moyenne des longueurs des jonctions latérales sur une période de 20 minutes est faible pour les CF de follicules exprimant un ARNi dirigé contre *upd* par rapport aux contrôles. Ce résultat permet d'expliquer la déformation moindre des CF lorsque l'activité JAK/STAT est réduite par une moins grande aptitude des jonctions à fluctuer/osciller. En conclusion, ce résultat montre que l'activité de la voie JAK/STAT influe sur la dynamique fluctuante des jonctions.

E. La myosine dans les CF est moins dynamique lorsque l'activité JAK/STAT est réduite

Afin de tester un effet potentiel de la voie de signalisation JAK/STAT sur la dynamique de la Myosine dans les CF, j'ai entrepris en première approche de déterminer si des différences phénotypiques pouvaient s'observer dans des follicules où l'activité JAK/STAT était réduite. J'ai commencé par réaliser des films sur des échelles de temps courtes (< 10 minutes) avec des intervalles de temps de 8 secondes, dans l'espoir d'accéder à la dynamique réelle puisque les flux de Myosine dans les cellules épithéliales sont très rapides. Pour ce faire, j'ai analysé des follicules exprimant la protéine de fusion Sqh:GFP sous contrôle de son propre promoteur et une protéine de fusion Bazooka/Par3:chFP (Baz:chFP) de façon ubiquitaire. J'ai comparé les deux génotypes suivants: *upd-Gal4/+ ; Sqh:GFP/CyO*, *Baz:chFP/+ et upd-Gal4/+ ; Sqh:GFP/UAS-upd-ARNi*, *Baz:chFP*.

Plusieurs difficultés inhérentes au système ont été rencontrées. Premièrement, les follicules précoces de stades 3-4 étant sphériques (30 - 50 µm) et ne permettant pas d'accéder à suffisamment de cellules dans un même plan, j'ai commencé mon étude sur des follicules plus tardifs ayant débuté leur

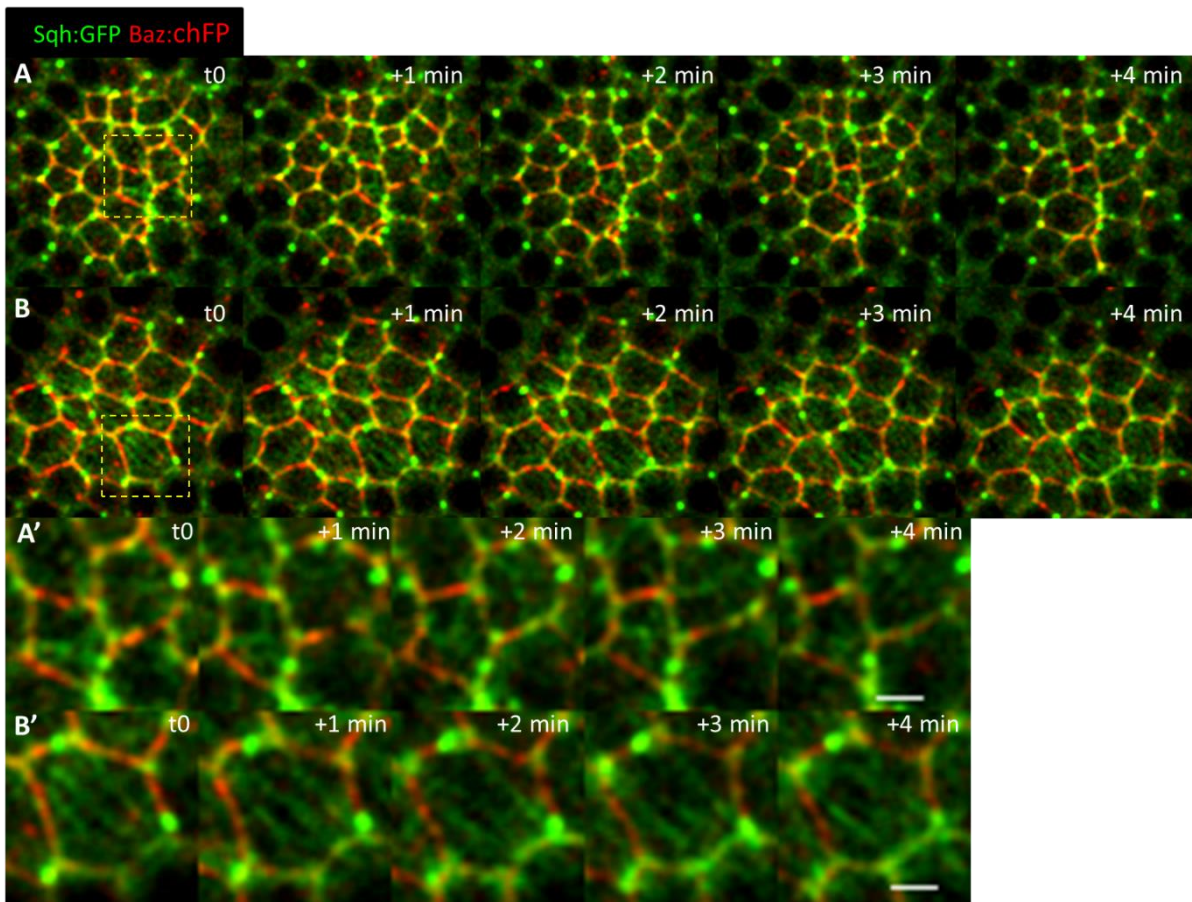


Figure 42. Sqh :GFP est moins dynamique lorsque l'activité JAK/STAT est réduite. A, B) Analyse confocale en temps réel de la dynamique de Sqh :GFP (vert) dans le domaine apical des CF. Ce domaine est identifié par l'expression d'une protéine de fusion Bazooka/Par3:chFP (Baz:chFP) en rouge. (A) Un follicule contrôle (*upd-Gal4/+ ; Sqh:GFP/CyO, Baz:chFP/+*) et (B) un follicule déficient pour JAK/STAT (*upd-Gal4/+ ; Sqh:GFP /UAS-updARNi, Baz:chFP/+*) ont été suivis pendant 4 minutes (t=0 – 4) avec une acquisition faite toutes les minutes. **A', B')** Zoom des images correspondant à la région sélectionnée par le carré jaune pointillé en t=0 de (A) et (B) respectivement et suivies de ces régions toutes les minutes pendant 4 minutes. Dans le follicule déficient pour JAK/STAT (B, B'), Sqh:GFP est moins dynamique et forme de fibres qui restent pendant plusieurs minutes (4). Les fibres sont observées dans la condition contrôle (A, A') mais elles varient au cours du temps.

allongement (stades 5-7) et donc permettant l'observation d'une dizaine de cellules dans un même champ. Les follicules en croissance sont des structures qui effectuent des révolutions autour de leur axe principal antéro/postérieur (Haigo and Bilder, 2011). J'ai donc été confronté à un second problème concernant le déplacement tissulaire. J'ai généré des films où les follicules tournaient et d'autres où ils n'effectuaient pas de rotation, mais sans pouvoir déterminer si l'absence de rotation était une altération consécutive à la dissection. J'ai pu observer les déformations cellulaires apicales et les mouvements de Myosine grâce à l'expression de Sqh:GFP dans les follicules rotatifs et non rotatifs. Pour accéder à la dynamique du réseau, j'ai réalisé des *stacks* de seulement 5 coupes espacées de 0,3 μm . Dans ces conditions le laser scannait en permanence l'échantillon, recommençant un *stack* à peine après avoir fini le précédent, atteignant donc la limite de la capacité du microscope confocal en termes de vitesse de scan. Avec ces réglages, les mouvements dans l'axe z des follicules n'ont pas permis de réaliser des acquisitions reproductibles car le signal Sqh:GFP d'intérêt était parfois perdu au cours du temps avec un si faible nombre de tranches optiques. De plus les cellules germinales s'avèrent avoir des propriétés d'oscillations très importantes qui modifient la position de la partie apicale des CF au cours du temps. Cependant, ce peu des films réalisés sur différents follicules m'ont permis d'observer la dynamique de la Myosine. Sqh:GFP effectue un mouvement aléatoire complexe dans lequel la concentration médiale varie constamment par des flux corticaux très dynamiques dans le sens des jonctions et des flux cortico-médiaux. De plus, nous avons remarqué que la Myosine semblait persister dans des CF déficientes pour la voie JAK/STAT.

J'ai donc entrepris de comparer la dynamique de la Myosine sur des échelles de temps plus longues (intervalle 1 min) pour être en mesure de scanner une portion plus importante de CF dans l'axe z (apical-basal) et projeter ensuite la zone subapicale, définie par le marqueur *baz:chFP*.

Comme on peut le voir sur la figure 42, la dynamique de Sqh:GFP change drastiquement au cours du temps avec cette échelle de temps. Entre plusieurs temps successifs le patron change de telle façon que parfois sa localisation se chevauche avec le marquage Bazooka et s'agrège et se désagrège dans la région médio-corticale (Fig. 42A, A'). Des « fibres » de Sqh:GFP connectant plusieurs côtés à

l'intérieur d'une cellule et de façon anisotrope entre les cellules voisines ont également été observées qui variaient au cours du temps. De façon très claire, lorsque l'activité JAK/STAT était diminuée dans le follicule, nous avons repéré la présence de fibres de Sqh:GFP arrangées de façon parallèle connectant des côtés opposés à l'intérieur d'une cellule et suivant une orientation qui semblait être isotrope entre les cellules (Fig. 42B, B'). Ces fibres restaient dans les CF pendant plusieurs minutes, contrairement à ce qui se produit dans les follicules contrôles. Cette expérience devra être reproduite et le phénotype de présence de fibres quantifié afin de confirmer que la voie JAK/STAT joue un rôle au niveau de la dynamique de Sqh:GFP au sein du domaine subapical des CF.

Conclusion du chapitre

Les résultats issus de l'analyse de la forme des CF et de leur capacité à se déformer au cours du temps montrent que dans des follicules déficients pour la voie JAK/STAT les CF sont plus régulières et moins aptes à se déformer. Puisque les analyses et les comparaisons de la variation de l'aire du domaine apical et latéral entre la présence et l'absence de la signalisation JAK/STAT n'ont pas donné de différences significatives, nous avons entrepris une étude de la dynamique des jonctions entre deux temps. Nous avons ainsi identifié que lorsqu'*upd* était réduit dans l'épithélium folliculaire, la longueur des côtés latéraux des CF changeait moins entre deux temps par rapport à celle du contrôle. Ce résultat indique que les défauts observés dans les CF lorsque l'activité JAK/STAT est diminuée ne sont pas une conséquence d'un effet au niveau de l'aire de domaines latéraux et apicaux des cellules mais sont plutôt dus à des moindres fluctuations des longueurs et déformations des côtés cellulaires.

D'autre part, l'analyse de Sqh:GFP en temps réel a mis en évidence une grande dynamique de cette protéine au niveau du domaine apical à l'intérieur d'une CF et entre différentes CF. Ce mouvement de Sqh :GFP semble être affecté dans des follicules déficients pour JAK/STAT. En effet, des fibres de Sqh :GFP qui connectent les côtés opposés à l'intérieur d'une cellule et qui perdurent pendant

plusieurs minutes ont été observées lorsqu'*upd* était diminué dans l'épithélium folliculaire mais pas dans le contrôle. Ce résultat, s'il est confirmé, pourrait renforcer l'hypothèse selon laquelle les bords des cellules sont moins remodelés ce qui conduit à une plus grande régularité des CF lorsque l'activité JAK/STAT est diminuée.

En conclusion, la signalisation JAK/STAT dans l'épithélium folliculaire semble contrôler le remodelage des CF. Mes résultats préliminaires suggèrent que la voie JAK/STAT joue un rôle sur la dynamique de la Myosine dans ces cellules. Puisque j'ai montré que la fonction de *sqh* dans les CF était impliquée dans l'élimination des CP surnuméraires, comme c'est le cas pour la signalisation JAK/STAT, une hypothèse serait que la voie JAK/STAT est nécessaire pour la dynamique épithéliale via une régulation de la Myosine et que cette dynamique engendrerait le remodelage nécessaire à l'élimination des CP surnuméraires.

IV. D'autres acteurs dans les CF impliqués dans le processus d'élimination des CP surnuméraires.

Il a été montré que la Myosine interagissait avec l'Actine formant un réseau connecté avec les composants des JA comme la E-Cadhérine pour générer des forces mécaniques qui influencent les changements de formes associés aux processus morphogénétiques de différents tissus épithéliaux. J'ai donc effectué des perturbations génétiques au sein des CF du gène qui contrôle l'expression de la E-Cadhérine (*shotgun* chez la drosophile) ainsi que sur de deux régulateurs du branchement de l'actine, Wasp et Arp3, afin de déterminer s'ils jouaient également un rôle sur ces cellules pour l'élimination des CP surnuméraires.

A. La perte partielle de E-Cadhérine dans les CF bloque le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires.

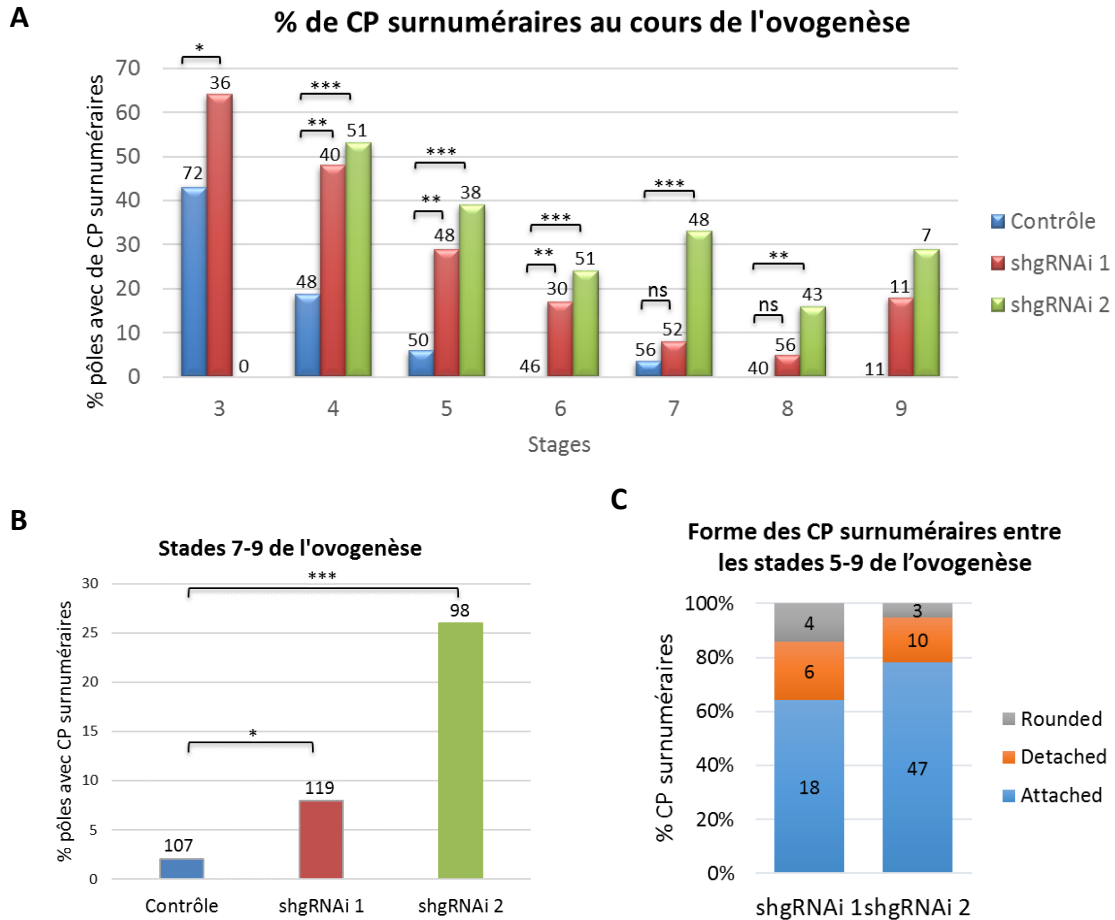


Figure 43. L'utilisation des transgènes ARNi pour shg (gène codant la E-Cadhérine) sous le contrôle d'un pilote spécifique des CF bloque le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires. **A)** Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype dans les différents stades de l'ovogenèse. Génotypes : Contrôle (*tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/+*), *shg*ARNi 1 (*UAS-shgARNi 1/+ ; tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/+*) et *shg*ARNi 2 (*UAS-shgARNi 2/+ ; tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/+*). Un test χ^2 a été réalisé par stade entre le contrôle et les chacune des deux lignées *shg*ARNi afin d'évaluer si une association existe entre le génotype et le nombre des CP. Les comparaisons entre le contrôle et *shg*ARNi 1 étaient significatives pour les stades 3-6 de l'ovogenèse ($p=0,04123$; $0,003937$; $0,002464$; $0,004174$, respectivement) et non significatives pour les stades 7-8 ($p=0,3502$; $0,1369$). Par rapport à la lignée *shg*ARNi 2, le stade 3 n'a pas pu être testé à cause du marqueur Fas3 qui n'était pas spécifique des CP à ce stade-là. Des différences significatives ont été observées pour les stades 4-8 de l'ovogenèse ($p= 0,0004087$; $0,0001153$; $0,0004406$; $6,347e-05$; $0,00766$, respectivement). Le stade 9 n'a pas été testé car il n'y avait pas assez d'effectif pour les différents génotypes. Le total des pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre. **B)** Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype entre les stades 7-9 de l'ovogenèse. Le test χ^2 a montré des différences significatives : contrôle vs *shg*ARNi 1, $p= 0,04702$; contrôle vs *shg*ARNi 2, $p=5,738^{-07}$. Le « n » est indiqué au-dessus de chaque barre. **C)** Graphique recensant la forme des CP surnuméraires entre les stades 5-9 de l'ovogenèse pour les deux lignées *shg*ARNi. La forme de ces CP est définie comme Attachée, Détachée ou Arrondie (voir manuscrit). Le nombre de CP surnuméraires analysées par catégorie est indiqué à l'intérieur de chaque barre. La plupart des CP (63% *shg*ARNi 1 et 79% *shg*ARNi 2) sont bloquées dans une forme attachée.

Puisque le réseau d'acto-myosine s'associe avec des composants des JA afin de créer et transmettre des forces entre les cellules et donc permettre les changements de leur forme, nous avons cherché à déterminer si une de molécules qui constituent les JA, la E-Cadhérine, était requise dans les CF pour le remodelage et donc l'apoptose des CP surnuméraires. Pour ce faire, deux différents ARNi dirigés contre le gène *shotgut* (*shg*) ont été exprimés spécifiquement dans les CF grâce au système UAS-Gal4, en utilisant le pilote *fruitless-Gal4* (*fru-Gal4*). Malheureusement, cette combinaison de transgènes était létale au stade embryonnaire. J'ai donc dû contourner cette létalité en combinant le système UAS/Gal4 à l'expression d'un répresseur thermosensible de Gal4 (*Gal80^{ts}*) afin de n'induire l'activité du pilote qu'au stade adulte (voir Matériels et Méthodes et Fig. Supplémentaire 4A, B). J'ai tout d'abord validé l'efficacité du ARNi des deux lignées *shg*ARNi en utilisant l'anticorps spécifique dirigé contre la Cadhérine, et j'ai ainsi pu vérifier que les niveaux de Cadhérine était bien diminué en présence de *shg*ARNi 1 et absents pour *shg*ARNi 2 (Fig. Supplémentaire 4A-C1). Ensuite, les CP ont été identifiées grâce au marquage Fas3 et leur nombre déterminé aux différents stades de l'ovogenèse dans des follicules contrôle ou dans lesquels l'expression de *shg* était diminuée (Fig. 43A). Les deux lignées *shg*ARNi (1 et 2) ont généré un excès de CP dans les stades précoces et tardifs, la lignée *shg*ARNi 2 présentant les phénotypes les plus pénétrants (Fig. 43A). De plus, d'autres phénotypes que celui des CP surnuméraires ont été observés avec cette lignée. Par exemple, le marquage de Fas3 n'était pas spécifique des CP dans les follicules au stade 3, suggérant des défauts dans la diminution de Fas3 dans les CF à ce stade-là. Par conséquent, le nombre de CP n'a pas pu être quantifié à ce stade (Fig. 43A). Des follicules présentant une forme arrondie entre les stades 7 et 9 ont également été observés avec cette lignée.

Pour les follicules contrôles, j'ai comptabilisé 43% et 19% de pôles avec des CP surnuméraires aux stades 3 et 4 respectivement. Entre les stades 5 et 7, un faible pourcentage de pôles avec plus de 2CP a été observé et finalement 0% pour les stades 8 et 9 (Fig. 43A). En revanche, lorsque *shg* a été diminué grâce à la lignée *shg*ARNi 1, 64% des pôles présentaient des CP surnuméraires au stade 3, 48% au stade 4, et pour *shg*ARNi 2, 53% au stade 4 (Fig. 43A). Aux stades tardifs, ce pourcentage

diminuait progressivement entre les stades 5 et 8 (29% à 5% respectivement) pour la lignée *shg*ARNi 1 et restait élevé pour la lignée *shg*ARNi 2 aux mêmes stades (28% en moyenne). Les différences du nombre de CP surnuméraires étaient significatives jusqu'au stade 6 pour la lignée *shg*ARNi 1 et à tous les stades de l'ovogenèse pour *shg*ARNi 2 (Fig. 43A). Cependant, lorsque les stades 7-9 ont été groupés pour les génotypes analysés (Fig. 43B), des différences significatives ont été observées pour les deux lignées *shg*ARNi (contrôle vs *shg*ARNi 1, $p=0,04702$; contrôle vs *shg*ARNi 2, $p=5,738^{-07}$). Ces résultats indiquent que l'expression de *shg* est requise dans les CF pour l'apoptose des CP surnuméraires. Est-elle également requise pour le remodelage de ces dernières ? Pour répondre à cette question, j'ai déterminé la forme dans laquelle les CP surnuméraires étaient bloquées aux stades tardifs pour les deux lignées ARNi (Fig. 43C). La plupart (63% *shg*ARNi 1 et 79% *shg*ARNi 2) des cellules analysées présentaient une forme attachée (Figure XX) indiquant qu'elles avaient été bloquées au début du processus de remodelage, ce qui montre que le remodelage des CP surnuméraires est aussi affecté lorsque *shg* est diminué dans les CF.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'une diminution de *shotgut* dans les CF a des conséquences directes sur la forme et le nombre des CP en affectant le remodelage et donc l'extrusion des CP surnuméraires, de façon similaire à ce qui a été observé en condition de diminution de la voie JAK/STAT dans l'épithélium folliculaire.

B. La perte partielle de *Wasp* et *Arp3* dans les CF bloque le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires

Il a été montré que le régulateur du branchement de l'actine *wasp* affectait la forme des cellules épithéliales en absence de signalisation JAK/STAT via la localisation médiale de la Myosine dans ces cellules (Bertet et al., 2009). Afin de déterminer si le processus d'élimination des CP surnuméraires requérait l'expression de *wasp* et d'*arp3* dans les CF, j'ai exprimé un transgène ARNi dirigé contre *wasp* ou contre *arp3* (deux ARNi différents, *arp3* 1 et 2) spécifiquement dans les CF en utilisant le pilote *fruitless*-Gal4. L'expression de l'ARNi *arp3* 1 avec ce pilote entraînait une létalité embryonnaire.

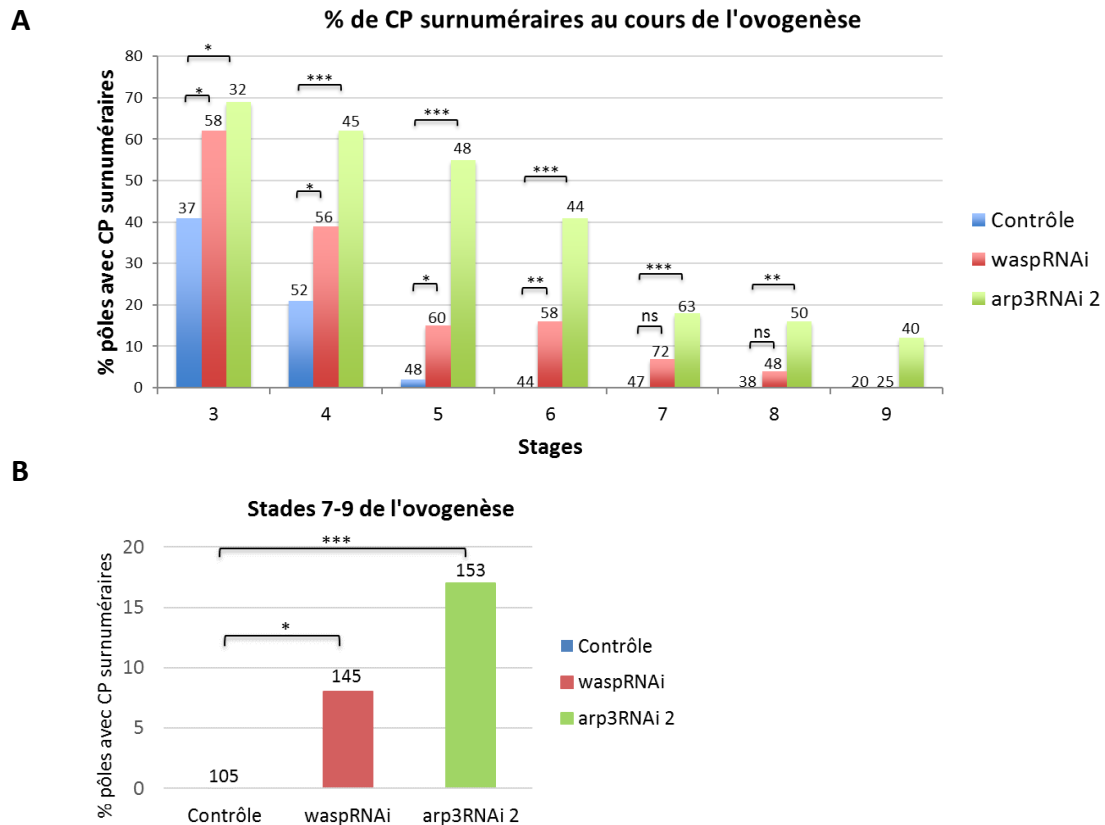


Figure 44. L'utilisation des transgènes ARNi pour cibler des régulateurs d'actine (*wasp* et *arp3*) spécifiquement dans les CF bloque l'apoptose des CP surnuméraires. A) Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype dans les différents stades de l'ovogenèse. Génotypes : Contrôle (*fru-Gal4/+*), *wasp*ARNi (+/*UAS-wasp*ARNi ; *fru-Gal4/+*), *arp3*ARNi 2 (*fru-Gal4/UAS-arp3*ARNi 2). Un test χ^2 a été réalisé par stade entre le contrôle et les ARNi ciblant les régulateurs d'actine *wasp* et *arp3* afin d'évaluer si une association existe entre le génotype et le nombre des CP. Les comparaisons des distributions phénotypiques entre le contrôle et *wasp*ARNi étaient significatives pour les stades 3-6 de l'ovogenèse ($p=0,04017$; $0,04096$; $0,02138$; $0,00621$, respectivement) et non significatives pour les stades 7-8 ($p=0,06492$; $0,2029$). Par rapport aux comparaisons entre le contrôle et *arp3*ARNi 2, des différences significatives entre les distributions phénotypiques ont été observées entre les stades 3-8 ($0,01912$; $3,89e-05$; $4,206e-09$; $1,965e-06$; $0,000912$; $0,009706$, respectivement). Le nombre de pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre. Le stade 9 n'a pas été testé car le nombre d'échantillons était faible. B) Graphique recensant le pourcentage de pôles avec des CP surnuméraires par génotype entre les stades 7-9 de l'ovogenèse. Le test χ^2 a montré de différences significatives entre les distributions phénotypiques : contrôle vs *wasp*ARNi, $p=0,02239$; contrôle vs *arp3*ARNi 2, $p=8,408^{-06}$. Le nombre total de pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre.

Comme précédemment avec l'ARNi dirigé contre *sgH* j'ai donc utilisé le système UAS/Gal4 combiné à l'expression d'un répresseur thermosensible de Gal4 (Gal80^{ts}) afin de contourner cette létalité (voir Matériels et Méthodes et Fig. Supplémentaire 2A, B).

Le nombre de CP aux différents stades de l'ovogenèse a été identifié grâce au marqueur latéral Fas3. La figure 44A montre les résultats pour le contrôle, ainsi que pour l'expression des ARNi dirigés contre *wasp* et *arp3* (ARNi 2). Pour le contrôle, 41% de pôles avec plus de 2CP ont été observés au stade 3, 21% au stade 4, 2% au stade 5 et 0% pour les stades plus tardifs. Pour les follicules exprimant les ARNi dirigés contre *wasp* et *arp3*, ils exhibaient respectivement 62% et 69% de pôles avec plus de 2CP au stade 3, 39% et 62% au stade 4, 15% et 55% au stade 5, 16% et 41% au stade 6, 7% et 18% au stade 7 et enfin 4% et 16% au stade 8. Ces différences sont statistiquement significatives entre le contrôle et *wasp*ARNi jusqu'au stade 6 et entre le contrôle et *arp3*ARNi 2 jusqu'au stade 8 (Fig. 44A). Lorsque les stades tardifs (7-9) ont été groupés pour les génotypes analysés, des différences significatives ont été trouvées pour les ARNi *wasp* et *arp3* (contrôle vs *wasp*ARNi, $p=0,02239$; contrôle vs *arp3*ARNi 2, $p=8,408^{-06}$) (Fig. 44B). La diminution de Wasp et d'Arp3 par ces ARNi dans les CF suggère donc que l'expression de ces gènes est requise pour l'apoptose des CP surnuméraires.

D'autre part, l'expression du ARNi1 dirigé contre *arp3* dans les CF à partir du stade 2 génère d'importants phénotypes dans la morphogenèse de la chambre à œuf. La figure 45A montre les pôles avec de CP surnuméraires pour une lignée qui sert de contrôle négatif (UAS-YFP), pour des follicules exprimant un ARNi dirigé contre *Stat92E* comme contrôle positif et pour des follicules exprimant l'ARNi1 dirigé contre *arp3*. Le contrôle négatif exhibe 40% de pôles avec plus de 2CP au stade 3, 20% au stade 4 et 1% aux stades 5, 7 et 8. Ces pourcentages sont en accord avec les contrôles des autres expériences. Au stade 3, pour les follicules exprimant les ARNi dirigés contre *Stat92E* et *arp3*, la Fas3 n'était pas encore spécifique des CP et pour cette raison je n'ai pas pu compter leur nombre (Fig. 45A). Pour les autres stades, les follicules exprimant l'ARNi 1 dirigé contre *arp3* présentent un excès du nombre des CP de façon similaire aux follicules déficients pour *stat92E* (Fig. 45A). De plus, la forme de ces CP surnuméraires a été analysée pour les différents génotypes aux stades précoces (Fig. 45B) et

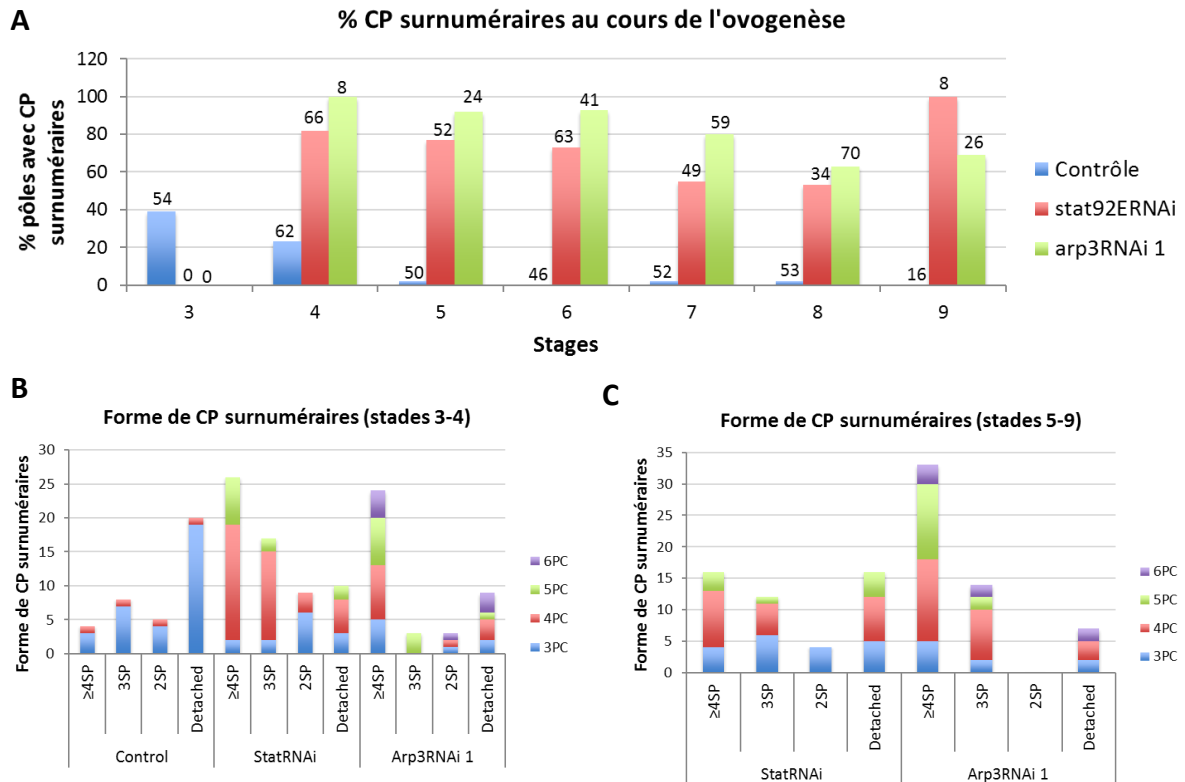


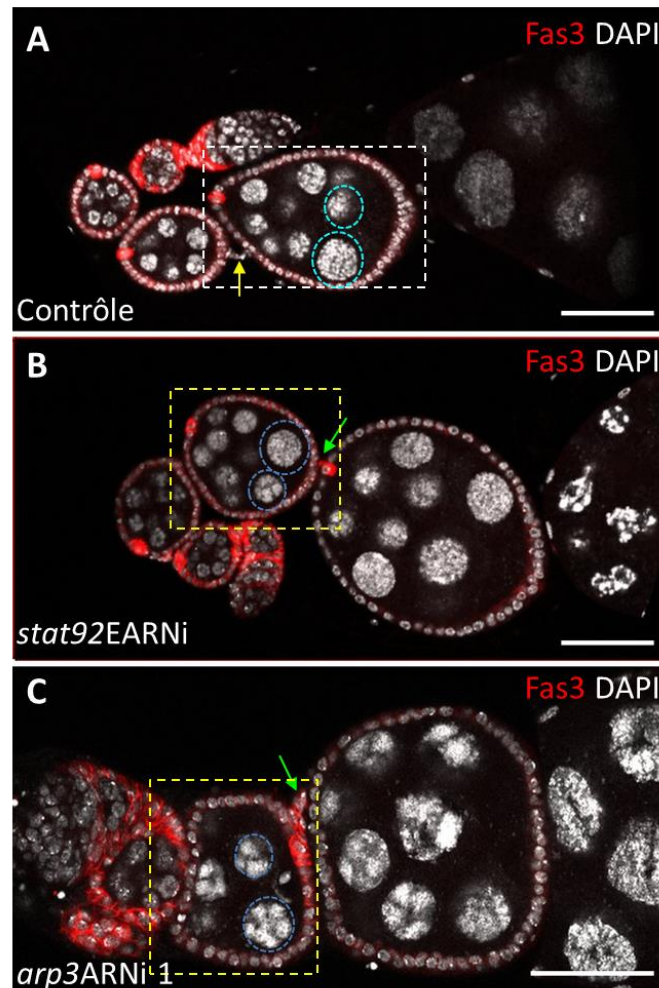
Figure 45. L'utilisation d'une deuxième lignée ARNi ciblant d'*arp3* spécifiquement dans les CF inhibe fortement le remodelage et l'apoptose des CP surnuméraires. **A)** Graphique recensant les pourcentages de pôles avec des CP surnuméraires par génotype dans les différents stades de l'ovogenèse. Génotypes : Contrôle négatif (*tub-Gal80/UAS-YFP ; fru-Gal4/+*), contrôle positif *stat92ERNAi* (*tub-Gal80/UAS-stat92ERNAi ; fru-Gal4/+*) et *arp3ARNAi 1* (*tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/UAS-arp3ARNAi 1*). Le nombre total des pôles analysés par génotype est indiqué au-dessus de chaque barre. **B-C)** Graphique recensant la forme des CP surnuméraires aux stades précoces (3-4) (B) et aux stades tardifs (5-9) (C) pour les génotypes indiqués. Les catégories 3PC-6PC correspondent au nombre de CP total dans les groupes présentant des CP surnuméraires. Pour les stades précoces aussi bien que pour les stades tardifs, la plupart des CP surnuméraires sont bloquées dans les premières étapes du remodelage pour *stat92ERNAi* et *arp3ARNAi 1*.

tardifs (Fig. 45C). Aux stades précoces, la plupart des CP surnuméraires se trouvent dans un état détaché pour le contrôle (comme ce que nous avons décrit préalablement, voir manuscrit), tandis que pour les ARNi dirigés contre *stat92E* et *arp3* à ces stades-là, la plupart des CP étaient encore dans une configuration attachée. Ceci a également été observé aux stades tardifs, le phénotype étant plus pénétrant avec l'ARNi contre *arp3*. Il est important de noter que des groupes de 6CP ont été repérés avec l'expression du ARNi contre *arp3*, ce qui n'a pas été observé avec l'ARNi contre *stat92E* (catégorie violette, Fig. 45B, C). L'ensemble de ces résultats met en évidence que la fonction d'*arp3* est nécessaire pour le remodelage ainsi que pour l'apoptose des CP surnuméraires.

Par ailleurs, la diminution d'*arp3* dans les CF génère d'autres phénotypes dans la chambre à œuf également observés avec la diminution de *stat92E* (Fig. 46A-C). Par exemple, nous avons remarqué que le nombre des cellules dans les tiges interfolliculaires étaient réduit (Fig. 46A-C, flèches), que les follicules tardifs présentaient une morphologie très arrondie (Fig. 46A-C, rectangles) et finalement que les follicules sont plus petits en *stat92E*ARNi et *arp3*ARNi 1 que dans le contrôle ce qui pourrait suggérer une asynchronie entre la croissance du cyste et de l'épithélium folliculaire (Fig. 46A-C, cercles). Etant donné la similarité des défauts phénotypiques entre la diminution par ARNi d'*arp3* et *stat92E* dans les CF, il est possible de proposer qu'il existe un lien fonctionnel entre Arp3 et la signalisation JAK/STAT pendant l'ovogenèse.

Conclusion du chapitre

L'ensemble des résultats indique que la E-Cadhérine et les régulateurs du branchement d'Actine (Wasp et Arp3) dans les CF jouent un rôle au cours de l'élimination des CP surnuméraires. Il serait intéressant de déterminer si le rôle de la signalisation JAK/STAT dans les CF dans ce même processus dépend de l'activité d'au moins un de ces acteurs de la dynamique épithéliale. De façon alternative, il serait nécessaire de tester si la signalisation JAK/STAT est contrôlée par une ou plusieurs de ces molécules.



L'utilisation des transgènes ARNi ciblant *arp3* et de *stat92E* spécifiquement dans les CF génèrent des phénotypes très similaires au cours de l'ovogenèse. A-C Images confocales des ovarioles contrôles (*tub-Gal80/UAS-YFP ; fru-Gal4/+*) (A), *stat92EARNi* (*tub-Gal80/UAS-stat92EARNi ; fru-Gal4/+*) (B) et *arp3ARNi 1* (*tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/UAS-arp3ARNi 1*) (C). La flèche jaune en A, indique une tige interfolliculaires dans le contrôle et les flèches vertes en B et C des tiges interfolliculaires avec un nombre anormalement réduit de cellules en *stat92EARNi* et *arp3ARNi 1*. Les cercles pointillés en couleur cyan (A) et bleu (B, C) entourent les noyaux plus postérieurs des cellules germinales. Ces noyaux présentent une taille similaire entre les différents génotypes (la dimension des cercles est la même entre les génotypes). Cependant, la taille globale des follicules est plus petite, et la forme plus ronde, en *stat92EARNi* et *arp3ARNi 1* que dans le contrôle. Le rectangle pointillé blanc (A) entoure un follicule tardif contrôle de forme ovoïde. Cependant en *stat92EARNi* et *arp3ARNi 1* les follicules en stades tardifs sont arrondis (rectangles pointillés en jaune en B et C, respectivement. Barre d'échelle : 50µm.

DISCUSSION

I. Le processus d'élimination des CP surnuméraires est divisé en trois phases et il est dépendant de l'activité de la voie de signalisation JAK/STAT.

Au cours de ma thèse, grâce à l'utilisation de l'imagerie confocale en temps réel ainsi que sur des tissus fixés, j'ai établi une séquence d'évènements stéréotypés qui a lieu pendant l'élimination des CP surnuméraires (Torres *et al.*, soumis). Trois phases ont été identifiées dans cette séquence: 1) une phase lente de remodelage cellulaire dépendante de la voie de signalisation JAK/STAT au cours de laquelle la CP destinée à mourir est totalement enveloppée par ses CP voisins destinés à survivre (plus de 7h) ; 2) une phase d'activation de la cascade canonique de l'apoptose, commençant lorsque la cellule est entièrement enveloppée, suivie d'un détachement puis d'une extrusion latérale des corps apoptotiques (1h) ; et 3) une phase de phagocytose des corps apoptotiques par les CF (plus de 5h).

La caractérisation du processus d'élimination des CP surnuméraires a généré de nouvelles informations concernant le remodelage et l'extrusion cellulaire. Dans cette apoptose développementale, nous décrivons pour la première fois un processus d'enveloppement et d'isolement des cellules épithéliales qui précède l'activation de la cascade apoptotique. Nous déterminons que l'activation de la voie JAK/STAT est requise de façon autonome et non autonome cellulaire pour commencer ce processus, mais les mécanismes par lesquels elle active la transcription de *hid* restent encore inconnus. Deux mécanismes non mutuellement exclusifs pourraient être à la base de cette activation transcriptionnelle. D'une part, une augmentation de la pression interne associée à l'état arrondi de la cellule enveloppée, c'est-à-dire la génération d'un stimulus mécanique, pourrait être traduit comme un signal pour la transcription de *hid*. Des morts et des extrusions cellulaires induites par des forces mécaniques ont ainsi été observées dans des tissus surpeuplés (Eisenhoffer *et al.*, 2012). D'autre part, la perte de contacts avec les cellules de la lignée germinale et les CF issues du processus d'enveloppement pourrait être traduite comme une absence de signaux trophiques conduisant à l'activation de la cascade apoptotique, comme ce qui a été reporté pour des cellules de mammifères en culture (Raff, 1992).

Nous avons également identifié une nouvelle modalité d'extrusion des cellules épithéliales : l'extrusion des corps apoptotiques par le domaine latéral des cellules. Chez les vertébrés et la drosophile, il a été montré que les cellules apoptotiques ou vivantes étaient extrudées des épithéliums par le domaine apical ou basal (Eisenhoffer et al., 2012; Marinari et al., 2012). Ainsi, nos résultats permettent de montrer pour la première fois qu'une extrusion latérale est également possible dans les cellules épithéliales. Cette extrusion ne semble pas être exclusive de l'épithélium folliculaire. Malgré le fait que dans l'étude de la morphogenèse de la patte chez la drosophile réalisée par (Monier et al., 2015), il n'y avait pas de mention du domaine par lequel les cellules apoptotiques étaient extrudées, sur les images de leur article, on peut voir que les corps apoptotiques sont générés latéralement. Ce qui suggère que ce mécanisme d'extrusion est probablement aussi utilisé dans d'autres tissus épithéliaux.

L'ensemble des résultats de la première partie de ma thèse a permis de mettre en évidence un lien entre la signalisation JAK/STAT, le remodelage et l'extrusion cellulaire dans l'épithélium folliculaire. De cette façon, j'ai cherché ensuite à comprendre comment la signalisation JAK/STAT pouvait contrôler ce remodelage et cette extrusion développementale dans le temps et l'espace. Le laboratoire avait démontré que la voie JAK/STAT était requis dans les CP mais aussi dans les CF pour l'apoptose des CP surnuméraires (Borensztejn et al., 2013) et qu'un signal de relais hypothétique provenant des CP et des CF était nécessaire pour permettre l'activation de la cascade apoptotique. Dans d'autres tissus épithéliaux, il a été observé que des forces mécaniques générées par le réseau d'acto-myosine étaient à la base des remodelages cellulaires. D'une part, lors de l'extrusion des cellules apoptotiques et vivantes dans différents tissus épithéliaux, un anneau d'acto-myosine se met en place de façon autonome et non-autonome cellulaire afin de réduire la surface apicale/basale de la cellule apoptotique/vivante et générer la force nécessaire à l'extrusion (Eisenhoffer et al., 2012; Gudipaty and Rosenblatt, 2016; Rosenblatt et al., 2001). D'autre part, il a été montré que JAK/STAT contrôlait négativement la localisation médiale de la Myosine et que les flux polarisés de cette protéine étaient nécessaires au remodelage et à l'intercalation des cellules ectodermiques au cours

de la GBE dans l'embryon de drosophile (Bertet et al., 2009; Levayer and Lecuit, 2013; Munjal et al., 2015; Rauzi et al., 2010). A partir de ces informations, j'ai donc cherché à déterminer si le réseau d'acto-myosine pouvait être à l'origine du remodelage et de l'extrusion des CP surnuméraires d'une façon autonome et/ou non-autonome cellulaire.

II. *L'élimination des CP surnuméraires ne semble pas être la conséquence d'un mécanisme autonome cellulaire dépendant de la Myosine.*

Mes résultats sur tissus fixés montrent une localisation subcellulaire de Sqh:GFP dans la région médiale et corticale du domaine subapical des CP. Ces deux localisations possibles de Myosine au sein de ces cellules suggèrent un mouvement de cette protéine entre ces deux régions. Puisque nous avons vu qu'au cours du remodelage des CP, la CP qui est progressivement enveloppée réduit sa surface apicale et perd ses contacts avec les CF adjacentes, nous pouvons penser que des flux de Myosine pourraient être à la base de cette diminution d'aire et/ou de jonctions, comme ce qui a été observé dans d'autres tissus épithéliaux (Martin et al., 2009; Rauzi et al., 2010).

Dans mes résultats, Sqh :GFP a été observée dans la région médiale ou corticale mais semblait être exclue de la région jonctionnelle de la cellule à être internalisée quelle que soit l'étape du remodelage cellulaire (4SP-2SP). Ce résultat suggère ainsi que la réduction de l'aire apicale de cette CP pourrait être due aux flux centripètes de Myosine entre les régions médiale et corticale du domaine. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que ces flux impliquent également la région jonctionnelle de la CP à être enveloppée mais que nous n'ayons pas pu l'observer en raison du faible nombre d'échantillons.

D'autre part, Sqh :GFP n'a pas été observée dans une structure en anneau autour de la cellule à être internalisée, ni au début du remodelage (configuration $\geq 4SP$) ni avant le détachement (configuration 2SP). Etant donné qu'au cours de l'enveloppement, cette cellule reste avec une forme 2SP pendant

au moins 2 heures (voir manuscrit) et étant donné le faible nombre d'échantillons ayant pu être analysés pour cette configuration (2SP n=10/21), nous ne pouvons pas exclure la mise en place d'un anneau de Myosine dans les dernières minutes du remodelage apical de cette CP, ni par conséquent, l'établissement d'un anneau de Myosine au sein des CP voisines, mécanisme qui a été impliqué avec la deuxième phase du processus d'extrusion (Gudipaty and Rosenblatt, 2016).

Une approche en temps réel permettant d'analyser la localisation subcellulaire de la Myosine au cours de l'enveloppement des CP pourrait permettre d'identifier la présence ou de confirmer l'absence de formation de ces structures transitoires de Myosine au sein des CP. Toutefois, mes résultats issus des analyses de la perte partielle de *sqh* ainsi que de l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh (UAS-Sqh^{DD}) dans les CP ne permettent pas d'impliquer la Myosine dans les CP pour l'élimination des CP surnuméraires. Pour compléter ces résultats, on pourrait également déterminer le nombre de CP dans les stades précoces de l'ovogenèse au cas où la perte partielle de *sqh* dans ces cellules puisse générer un délai de la mort des CP surnuméraires. L'analyse des effets de la surexpression des formes constitutivement actives de la Myosine kinase Rok ou de l'inhibition de la myosine phosphatase Flapwing ainsi que l'utilisation d'une autre forme constitutivement active de la Myosine (UAS-*sqh*^{EE}) dans les CP pourraient également renforcer les données obtenues lors des expériences utilisant Sqh^{DD}.

Pour finir, mes résultats sur l'analyse qualitative de la distribution de Sqh :GFP dans les CP lorsque JAK/STAT est activée ou diminuée dans l'épithélium folliculaire, suggèrent que la voie JAK/STAT ne semble pas contrôler la Myosine dans ces cellules pour l'élimination des CP surnuméraires. Cependant, il serait nécessaire d'effectuer des analyses quantitatives de l'intensité de Sqh:GFP dans ces contextes génétiques qui pourraient confirmer un modèle d'exclusion d'un rôle de JAK/STAT sur la Myosine dans ces cellules.

III. L'élimination des CP surnuméraires implique un mécanisme non autonome cellulaire dépendant du réseau d'acto-myosine et des JA.

Le fait de générer de forts blocages dans le remodelage des CP et par conséquent dans l'extrusion des CP lorsque la voie JAK/STAT est diminuée dans les CF (voir Manuscrit) indique que ces cellules participent activement à ce processus morphogénétique.

Mes résultats sur l'analyse de la forme des CF en temps réel mettent en évidence que la forme de ces cellules est irrégulière et change de façon très dynamique au cours du temps. Notamment, leur domaine subapical varie plus que leur domaine latéral. Ceci peut s'expliquer par le fait que les CF aux stades précoces de l'ovogenèse présentent une forme prismatique et sont dotées d'un noyau occupant presque la totalité du cytoplasme et par le fait que les molécules du réseau d'acto-myosine sont accumulées apicalement et basalement. Lorsque la voie JAK/STAT est diminuée dans l'épithélium folliculaire, nous avons montré que les CF étaient plus régulières et moins aptes à la déformation au cours du temps. En effet, mes analyses de la variation de la taille des aires subapicales et latérales ainsi que des longueurs des côtés latéraux des CF au cours du temps indiquent que les phénotypes observés lorsque la voie JAK/STAT est diminuée ne sont pas associés à des changements de variation de la taille des aires, mais plutôt au moindre remodelage des côtés. Il sera important dans le futur d'analyser plus de follicules au même stade de l'ovogenèse pour confirmer ces résultats. En outre, il faudrait déterminer si la taille moyenne des aires subapicales et latérales ou le nombre de côtes (nombre des cellules voisines) sont affectés ou non en absence de l'activité de la voie JAK/STAT. Ces paramètres pourraient également impacter sur la dynamique épithéliale.

Pendant le développement pupal de l'aile de la drosophile, les cellules épithéliales présentent des formes très régulières (hexagonales) et sont très homogènes. Cette régularité du tissu est perturbée lorsque le remodelage des jonctions est affecté. En effet, dans des mutants de la phosphatase PTEN, il a été montré que des accumulations permanentes de Myosine au niveau des nouvelles jonctions les rendaient instables, empêchant de cette façon leur allongement (Bardet et al., 2013). Est-ce que dans le follicule ovarien la Myosine ou le réseau acto-myosine pourrait, de la même façon, être impliqué dans le remodelage des jonctions des CF, rendant ces cellules dynamiques et déformables au cours du

temps ? Est-ce que la dynamique des CF et de l'épithélium folliculaire participe à l'élimination des CP surnuméraires ? Est-elle régulée par la voie de signalisation JAK/STAT ? Plusieurs arguments à partir des analyses sur tissus fixés nous font penser qu'un rôle mécanique dans les CF est nécessaire pour le processus d'élimination des CP surnuméraires.

A. La Myosine

Les analyses de la localisation subcellulaire de Sqh, Sqh1P et Sqh:GFP dans les CF ont révélé deux distributions de ces protéines : une distribution corticale et une distribution uniforme identiques dans plusieurs CF d'un même follicule, suggérant des mouvements synchrones de la Myosine entre plusieurs CF. Dans l'analyse de Sqh:GFP en temps réel en revanche, Sqh:GFP s'assemblait et se désassemblait de façon très dynamique dans la région médiale des CF et ce mouvement variait d'une cellule à l'autre. Ces différences au sein d'un groupe de CF entre tissu fixé et tissu vivant pourraient être expliquées par le fait que sur les tissus fixés, le mouvement des molécules de Myosine pourrait être graduellement ralenti à cause du fixateur (conduisant à un décalage et une accumulation de signaux), et également par le fait que l'utilisation de l'anticorps anti-GFP couplé à plusieurs anticorps secondaires pourrait jouer un rôle important sur l'amplification du signal correspondant à la Myosine par rapport à Sqh:GFP, ce qui permettrait d'observer plus de choses que ce qu'on visualise sur les analyses *in vivo*.

De plus, mes résultats sur tissus fixés dans un contexte sensibilisé pour *sqh* (*upd-Gal4/sqh^{AX3} ; sqh^{prom-}* Sqh:GFP/UAS-*updARNi*), suggèrent que la voie JAK/STAT pourrait réguler la localisation de la Myosine dans le domaine subapical des CF. Dans ce contexte génétique, Sqh:GFP a été observée majoritairement dans la région corticale des CF, présentant une désorganisation et au niveau des JA des CF, de façon différent à ce qui a été observé dans les CF contrôles (*upd-Gal4/sqh^{AX3} ; sqh^{prom-}* Sqh:GFP/+). Dans le même sens, mon analyse préliminaire de la localisation de Sqh:GFP dans les CF en temps réel en contexte contrôle et *updARNi* suggère que la voie JAK/STAT régule la dynamique de cette protéine. En effet, lorsque l'activité JAK/STAT était diminuée, on a observé des structures

fibrillaires de Sqh:GFP connectant des côtés opposés des CF et qui restaient sous cette forme pendant plusieurs minutes. Ce phénotype a été observé dans plusieurs CF voisines. Cette expérience nécessite d'être répétée afin de savoir si ce phénotype très intéressant est reproductible. Si ce résultat est confirmé, nous pouvons imaginer que la persistance des fibres et leurs ancrages aux côtés opposés pourraient créer une tension à l'intérieur d'une ou de plusieurs CF rendant les jonctions dans tout le tissu plus rigides et moins aptes au remodelage. Des expériences d'ablation laser sur ces fibres et l'analyse corrélative de la variation des longueurs des jonctions au cours du temps permettraient de tester cette hypothèse.

Si le résultat montrant un effet de la diminution d'*upd* sur les fibres de Myosine ne s'avère pas reproductible, d'autres analyses concernant la dynamique de la Myosine pourraient être réalisées. Par exemple, des kymographes du signal de Sqh:GFP au niveau des jonctions des CF en présence et en absence de JAK/STAT pourraient donner des pistes sur le comportement de la Myosine dans cette région. Il sera possible également de caractériser la dynamique de Sqh:GFP au sein des CF afin de déterminer si les mouvements de Myosine sont corrélés aux déformations des jonctions. En particulier, des analyses de corrélations croisées du signal Sqh:GFP entre deux régions des CF couplées à des mesures de longueurs de jonctions entre les deux génotypes pourraient également déterminer si le remodelage des jonctions est dépendant des accumulations ou des flux de Myosine. Il faudra également analyser la dynamique de Sqh:GFP aux stades précoces de l'ovogenèse puisque le comportement dynamique de cette protéine pourrait aussi dépendre du stade de l'ovogenèse en fonction des événements de morphogenèse ayant lieu à chaque stade.

D'autre part, mes résultats issus de l'analyse perte partielle de la fonction de *sqh* via l'induction de clones mitotiques *sqh*¹ et par une approche ARNi, ainsi que l'expression d'une forme phosphomimétique de la protéine Sqh dans les CF montrent que dans les trois contextes génétiques une survie prolongée des CP surnuméraires dans les stades tardifs a été observée. Ces résultats

mettent en évidence que l'expression et/ou la régulation de la Myosine dans les CF est nécessaire pour que l'élimination des CP surnuméraires ait lieu.

B. La Cadhérine et les régulateurs de l'Actine : Wasp et Arp3

Mes résultats issus de la perte de fonction partielle de *shotgun* (ECad) ainsi que des régulateurs d'actine, *wasp* et *arp3*, dans les CF génèrent également des inhibitions du remodelage et de l'apoptose des CP surnuméraires. Ceci suggère que l'expression de ces molécules dans les CF est nécessaire pour l'élimination des CP surnuméraires. La perte de fonction des molécules d'Actine et de Cadhérine a également été associée à des défauts dans les processus d'invagination du mésoderme et de GBE ainsi qu'à des défauts d'extrusion cellulaire (Gudipaty and Rosenblatt, 2016; Martin et al., 2009; Rauzi et al., 2010)

En particulier, en ce qui concerne *arp3*, mes résultats indiquent que sa fonction est nécessaire tout au long de l'ovogenèse. Il a été en effet montré que le complexe Arp2/3 était requis pour la croissance des anneaux d'actine présents dans les cellules de la lignée germinale et qui servent de canaux pour le processus de dumping cytoplasmique entre ces cellules nourricières et l'ovocyte (Hudson and Cooley, 2002). Il a également été montré que le complexe SCAR/Wave (un activateur d'Arp3) était nécessaire entre les stades 1 à 5 de l'ovogenèse pour la rotation de la chambre à œuf, un mouvement tissulaire qui est généré par la migration collective des CF autour de la membrane basale via la formation de lamellipodes (Cetera et al., 2014). Pendant les stades 1-5 de l'ovogenèse, ce complexe SCAR/Wave est requis pour maintenir l'alignement global des faisceaux d'actine basaux établis au stade germarium, afin de créer le patron en fibres de la membrane basale adjacente nécessaire à l'élongation du tissu à partir des stades 6 de l'ovogenèse. Nous pouvons donc nous demander si la rotation des follicules via la régulation d'Arp3 est nécessaire à l'extrusion des CP surnuméraires ? Lorsque nous avons filmé le processus de remodelage et d'extrusion des CP surnuméraires, parfois les follicules ne tournaient pas, ce qui pourrait être dû à la manipulation des ovaires durant l'extraction

et/ou durant le montage. Malgré cette absence de rotation, le remodelage, l'expulsion latérale et la phagocytose des CP surnuméraires ont tout de même eu lieu. Cela veut dire que la rotation de la chambre à œuf n'est pas nécessaire pour l'élimination des CP surnuméraires. Nous pensons que ce processus est contrôlé par des forces mécaniques dans tout le tissu ovarien, par conséquent l'alignement global des faisceaux d'actine basaux dans les CF via Arp2/3 pourrait contribuer mais ne pas être nécessaire pour que ce processus ait lieu. Ceci suggère que Arp3 jouerait un autre rôle (différent de la rotation) dans les domaines basal et apical dans les cellules de l'épithélium folliculaire, puisque sa perte de fonction dans l'épithélium folliculaire affecte le remodelage des CP de la même façon que la perte d'activité JAK/STAT.

L'ensemble des résultats sur le réseau d'Acto-Myosine et la Cadhérine ainsi que sur la dynamique des jonctions des CF suggèrent l'émergence d'un modèle dans lequel l'activité de la voie JAK/STAT aurait pour rôle de permettre la déformation/oscillation des jonctions en jouant sur la dynamique de la Myosine et sa propension à la fluctuation, sa capacité à s'assembler et se désassembler, propriétés qui pourraient être en lien avec la polymérisation/dépolymérisation de l'actine ou/et sa réticulation.

IV. La voie JAK/STAT pourrait réguler le réseau d'acto-myosine et la Cadhérine dans les CF pour l'élimination des CP surnuméraires

La perturbation de la Myosine, la Cadhérine et des régulateurs d'actine Wasp et Arp3 dans les CF génèrent le même phénotype que la perturbation de l'activité JAK/STAT dans l'épithélium folliculaire, soit une survie prolongée des CP surnuméraires. Ceci suggère que la voie JAK/STAT pourrait contrôler l'expression ou l'activité de ces molécules au sein des CF pour l'élimination des CP surnuméraires.

Compte tenu qu'il a été montré sur des cellules en culture que la demi-vie métabolique des Cadhérines dure plusieurs heures (plus de 5h) (McCrea and Gumbiner, 1991; Shore and Nelson, 1991) et que celles de l'Actine et la Myosine non musculaire durent plusieurs jours (Rubinstein et al., 1976), une action

de la voie JAK/STAT sur la dynamique des protéines du cytosquelette et des JA serait plus propice à expliquer ses effets sur le remodelage des jonctions qu'une régulation transcriptionnelle directe sur ces gènes. JAK/STAT pourrait par exemple contrôler des molécules impliquées dans la régulation de l'activité du réseau d'acto-myosine et/ou des JA.

La régulation de la protéine Sqh semble être nécessaire au remodelage et à l'extrusion des CP surnuméraires d'après les résultats de l'expression d'une forme phosphomimétique de Sqh dans les CF et le fait que la localisation de Sqh1P est affectée dans un contexte génétique sensibilisé pour *sqh*. Il se pourrait que la voie JAK/STAT agisse sur les régulateurs de la phosphorylation et/ou déphosphorylation de Sqh tel que *rok* et *flapwing* respectivement dans les CF. Ceci pourra être testé en déterminant leur implication dans le remodelage cellulaire et l'apoptose des CP. Ces molécules ont été impliquées dans la régulation de l'activité Myosine dans plusieurs autres processus morphogénétiques (Munjal et al., 2015; Valencia-Expósito et al., 2016; Vasquez et al., 2014)

D'autre part, afin de tester si la voie JAK/STAT contrôle l'expression de la Cadhérine dans les CF, on pourrait réaliser des quantifications sur les niveaux d'expression de cette protéine dans des follicules contrôles et diminués pour *upd*. Il est important de préciser qu'en effectuant l'analyse des images des follicules contrôles et déficients pour l'activité de la voie JAK/STAT en culture, j'ai observé qu'au cours du temps la E-Cadhérine quittait les jonctions adhérentes de façon plus fréquente en provoquant des cassures dans ces structures lorsque la voie JAK/STAT était diminuée. Bien que ces expériences nécessitent d'être reproduites et quantifiées, ces résultats préliminaires suggèrent que la voie JAK/STAT pourrait contrôler la stabilité de la E-Cadhérine au niveau des jonctions des CF.

Un contrôle exercé par la voie JAK/STAT sur la dynamique de la E-Cadhérine lié à son mécanisme de régulation (tel que la balance entre son recyclage et sa dégradation) pourrait expliquer pourquoi les jonctions ou les côtés cellulaires se remodelent moins au cours du temps en absence de l'activité de la voie JAK/STAT. Par exemple, un haut taux de « turnover » de la E-Cadhérine laisserait moins de quantité disponible de cette protéine pour former les JA donc pour se remodeler. L'internalisation de

la E-Cadhérine peut se réaliser par plusieurs voies d'endocytose mais l'endocytose dépendante de la Clathrine a été la plus étudiée (Kowalczyk and Nanes, 2012). Ceci pourrait être testé par des analyses en temps réel avec l'utilisation de protéines de fusion pour la E-Cadhérine et la Clathrine en présence ou en absence d'activité de la voie JAK/STAT. Nous pourrions également utiliser le système UAS/Gal4 pour bloquer ce type d'endocytose sur les CF et déterminer si le remodelage ou l'apoptose des CP surnuméraires est affecté. Par exemple il a été montré dans l'épithélium folliculaire que la voie de signalisation JAK/STAT était activée suite à l'union d'Upd et de son récepteur Dome au niveau de vésicules dépendantes de Clathrine (Devergne et al., 2007). Dans ce sens, il pourrait y avoir une autorégulation de la signalisation JAK/STAT via l'internalisation de complexes E-Cadhérine-Dome-Upd au niveau des JA.

Par ailleurs, Wasp, le principal régulateur d'Arp3, est contrôlé négativement par la voie JAK/STAT afin d'empêcher une localisation médiale de la Myosine et d'éviter ainsi la constriction des cellules de l'ectoderme latéral dans l'embryon de drosophile (Bertet et al., 2009). A la différence de ce système, mes résultats suggèrent que dans notre modèle, la voie JAK/STAT pourrait réguler positivement Wasp dans les CF pour l'élimination de CP surnuméraires. En utilisant le système UAS/Gal4, on pourrait tester par exemple si les niveaux d'expression de Myosine dans les CF sont affectés dans des follicules présentant une diminution de Wasp afin d'établir un lien entre ces deux protéines. On pourrait également exprimer une forme constitutivement active de Wasp dans des follicules diminués pour *upd* afin de déterminer si la régulation de la voie JAK/STAT sur l'élimination des CP surnuméraires passe par l'expression de Wasp dans les CF. Par ailleurs, une éventuelle régulation de la voie JAK/STAT sur Wasp pourrait se faire par des mécanismes post- transcriptionnels, comme ce qu'il a été établi pour les cellules de l'ectoderme latéral pendant la GBE.

En ce qui concerne Arp3, la similitude des défauts observés entre la diminution d'*arp3* et de *stat92E* dans les CF, positionne ces deux pertes partielles de fonctions dans une même classe phénotypique. Ceci suggère qu'ils pourraient agir de concert sur la morphogenèse de l'épithélium folliculaire avec

pour conséquence, entre autres, le remodelage/extrusion des CP. Mes résultats nous mènent donc à proposer deux hypothèses non mutuellement exclusives pour le remodelage et l'extrusion des CP surnuméraires : soit Arp3 est nécessaire pour la signalisation JAK/STAT, soit la signalisation JAK/STAT régule *arp3* transcriptionnellement ou post-transcriptionnellement. Nous pourrions tester rapidement la première de ces hypothèses puisque nous avons déjà au laboratoire les outils adéquats pour le faire. Il s'agit d'utiliser des rapporteurs d'activité de la voie JAK/STAT : 2XStat92E:GFP ou 10XStat92E:GFP. Ce transgène est constitué d'une séquence GFP dont l'expression est placée sous le contrôle de deux (2X) ou dix (10X) sites de liaison de la protéine Stat92E. Donc, en présence ou en absence d'*arp3* dans les CF, nous pourrions identifier et comparer les activités transcriptionnelles de Stat92E dans ces cellules via l'expression de la GFP. Nous pourrions aussi utiliser un autre transgène disponible codant une protéine de fusion Stat92E:GFP (Sotillos et al., 2013) et analyser si les niveaux de cette protéine et/ou sa localisation subcellulaires sont modifiées ou non en diminution d'*arp3*.

V. Ouvertures et Conclusion

Il a été montré sur des cellules ectodermiques chez la drosophile qu'une augmentation de la signalisation JAK/STAT pouvait être obtenue grâce à l'interaction entre Stat92E et la protéine Src kinase via leur association à la protéine de polarité apicale Bazooka (Par3 chez les vertébrés) (Sotillos et al., 2013). Dans ce modèle, la protéine Src kinase requiert Bazooka pour permettre la localisation apicale de Stat92E, ceci se faisant de façon indépendante de son activité kinase sur Stat92E. En général, l'expression de ces trois protéines a été associée au développement de plusieurs cancers épithéliaux (Dutta et al., 2014; Huang and Muthuswamy, 2010; Silva, 2004). Des associations entre Par3 et le cytosquelette d'acto-myosine ont également été établies (David et al., 2013; Hidalgo-Carcedo et al., 2011; Ishiuchi and Takeichi, 2011). Il serait donc plausible qu'il existe une interaction entre un complexe Stat92E-Baz-Src et le cytosquelette d'acto-myosine ainsi que ses régulateurs dans le domaine apical de la cellule.

Par ailleurs, il a été montré que le cyste germinale pendant sa croissance exerçait une force qui était contrecarrée par l'épithélium folliculaire via le réseau d'acto-myosine (Wang and Riechmann, 2007). J'ai pu observer des vagues de Myosine provenant des cellules germinales lors de mes analyses sur Sqh:GFP en temps réel. Ces vagues semblaient précéder le mouvement de Sqh:GFP dans le domaine apical des CF et des contractions temporaires des CF associées. Ces vagues de Myosine dans la lignée germinale pourraient donc contribuer à la dynamique des CF afin de créer ou de maintenir pendant les premiers stades de l'ovogenèse une tension du tissu propice aux déformations des CF et à la possibilité de remodelages locaux. Par exemple, elles pourraient servir à créer des pulsations de Myosine dans les CF et/ou les maintenir au cours du temps. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de faire des analyses en temps réel pour établir une corrélation entre le signal Sqh:GFP provenant de la lignée germinale et celui provenant des CF. Sur mes résultats issus de la perte partielle de *sqh* par la stratégie de clones mitotiques, j'ai trouvé 6 clones germinaux *sqh*¹ mais ils n'étaient pas associés à des CP surnuméraires. Il faudra donc augmenter la taille de l'échantillon ou utiliser le système UAS/Gal4 pour diminuer *sqh* spécifiquement dans les cellules germinales, afin de déterminer si l'expression de la Myosine est requise dans ces cellules pour l'élimination des CP surnuméraires.

Dans le sens d'une possible collaboration entre les cellules germinales et les CF, il a été montré récemment que la position des cellules germinales dans les pôles des follicules au stade 8 de l'ovogenèse participait à la distribution du ligand Upd en créant des asymétries dans l'activation de Stat92E dans les CF terminales (Manning et al., 2015). Le processus d'élimination des CP surnuméraires régulé par la voie de signalisation JAK/STAT pourrait ainsi être le résultat d'un mécanisme qui implique la contribution de différentes populations cellulaires présentes dans les chambres à œufs.

D'autre part, en considérant que : 1) durant les stades précoces de l'ovogenèse, l'épithélium folliculaire croît et se divise de façon continue (Spradling, 1993) ; 2) que l'extrusion des cellules épithéliales est plus fréquente dans des tissus surpeuplés

(Eisenhoffer et al., 2012; Marinari et al., 2012) ; 3) que la voie JAK/STAT régule la prolifération des cellules épithéliales (Mukherjee et al., 2005) ; et 4) que nous avons observé (mais pas quantifié) de petits follicules contenant de cystes germinaux plus âgés indiquant possiblement un défaut dans le nombre des CF lorsque *stat92E* était diminué dans les CF, nous n'excluons pas un rôle de JAK/STAT sur la croissance ou la mort cellulaire dans l'épithélium folliculaire pour l'élimination des CP surnuméraires. Cette hypothèse pourrait être testée en utilisant des ARNi dirigés contre des gènes impliqués dans la croissance cellulaire exprimés spécifiquement dans les CF et en comptant le nombre des CP aux stades tardifs de l'ovogenèse afin d'évaluer l'effet de ces gènes sur l'extrusion des CP surnuméraires.

D'un point de vue d'ensemble, mes résultats suggèrent que l'élimination des CP surnuméraires est un processus qui impliquerait la génération et la transmission de forces dans les CF de tout l'épithélium folliculaire. Ces forces aux stades précoces de l'ovogenèse proviendraient de la dynamique et l'association des molécules d'Actine, de Myosine et de E-Cadhérine au niveau du domaine apical (et basal) des CF. La voie de signalisation JAK/STAT pourrait contrôler ces molécules en modulant directement leur transcription, leur activité en agissant sur leurs régulateurs, ou éventuellement en jouant un rôle non-canonique sur ces molécules.

MATERIELS ET METHODES

Souches génétiques et croisements. Les lignées ARNi suivantes ont été utilisées

- Collection VDRC (Vienne, Autriche): UAS-*upd*ARNi (3282), UAS-*stat92E*ARNi (43866), UAS-*arp3*ARNi 1/Sb (35258), UAS-*arp3*ARNi 2 (35260), UAS-*sqh*ARNi 1 (103962), UAS-*sqh*ARNi 2 (27082) et UAS-*wasp*ARNi (108220).

- Collection de Bloomington : UAS-*sqh-ARNi* 1 (31542), UAS-*sqh-ARNi* 3 (33892), FRT101 (1844).

La souche UAS-*sqh^{DD}*/Sb a été fournie par Y. Nishida, ECadh:GFP, PH:chFP/CyO par Y. Bellaïche, *sqh^{AX3}* ; *sqh_{prom}-sqh* :GFP par R. Karess, FRT101GFP ; *hsp-flp138* et FRT101 *sqh¹* par V. Mirouse, *TubP-Gal80^{ts}* et UAS-YFP par J. Montagne, *hsp70* ; Tub-FRT/cd2/FRT-Gal4, UAS-GFP par Joel Silbert. Les lignées pièges à enhancer *unpaired-Gal4* (*upd-Gal4*) (Khammari et al., 2011) et *fruitless-Gal4* (*fru-Gal4*) (Borensztein et al., 2013) ont été utilisées pour cibler spécifiquement et respectivement les CP et les CF. Sauf lorsqu'indiqué, les croisements ont été maintenus à 25°C jusqu'à mi-pupaison. Puis ils ont été transférés à 29°C et les femelles adultes ont été disséquées 4-5 jours après éclosion. Pour les croisements impliquant *Gal80^{ts}*, ils ont été maintenus à 18°C jusqu'à éclosion. Puis ils ont été transférés à 29°C et les femelles adultes ont été disséquées 4-5 jours après éclosion. Pour la génération de clones FRT/FLP *sqh⁺* et *sqh¹* (Fig. 26, 33, 34 et Tableau 1), les croisements ont été maintenus toujours à 25°C. Deux chocs termiques ont été réalisés à 37°C pendant 1 heure. Le premier au début du stade pupal et le second sur les adultes 3 jours après l'éclosion et 20 heures avant la dissection. Pour la génération de clones flip-out *sqh-ARNi* (Fig. Supplémentaire 2) les mêmes conditions que pour les clones FRT/FLP ont été utilisées sauf que les chocs termiques ont été réalisés à 38°C.

Immunofluorescence. La dissection des ovaires et leur immunomarquage ont été réalisés utilisant la procédure décrite dans le manuscrit Torres et al., (soumis). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : souris anti-Fas3 (1:50, DSHB, 7G10), rat anti-ECad (1:50, DSHB, DCAD2), lapin anti-GFP (1:500, Interchim), Guinea Pig anti-Sqh1P (1 :200, R. Ward) et Souris anti-Sqh (1 :200, R. Ward). Les anticorps secondaires Alexa Fluor anti-lapin (488), anti-Guinea Pig (488), anti-Rat (647), anti- Guinea Pig (647) (Molecular Probes) ont été utilisés à 1 :200 et l'anti-souris-Cy3 (Jackson Immunoresearch) a été utilisé à 1 :100.

Culture des chambres à œufs et des analyses en temps réel. Les conditions de culture utilisées pour filmer des follicules stade 5-6 sont adaptées des conditions décrites dans (Prasad et al., 2007) pour des follicules de stades 9.

Microscopie et montage de figures. Dans cette étude, toutes les images ont été acquises avec un microscope confocal Leica TSC SP8 utilisant le software LAS X. Les piles d'images confocales ont été

exportées dans son format original et traitées en utilisant le logiciel FIJI. Les figures de cette thèse ont été générées en utilisant le *plugin* FigureJ (Mutterer and Zinck, 2013).

Traitement d'images. Pour les figures 30, 38-41 des segmentations semi-automatiques avec un filtre Watershed ont été réalisées utilisant le *plugin* Tissue Analyzer (développé par Benoit Aigouy) sur des projections d'images du signal correspondant au marquage anti-Cad (figure 30), Cad:GFP ou PH:chFP (figures 38-41). Des images binarisées montrant le contour des cellules ont ainsi été produites. Les quantifications des aires subapicale/latérale ou de la longueur des jonctions des CF ont été générées à partir de ces images binarisées. Pour la figure 30, le marquage Sqh :GFP a été superposé à l'image binarisée afin de mesurer l'intensité de ce marquage au sein des CF. Pour la figure 32, des quantifications d'intensité du marquage Sqh :GFP ont été faites à partir de follicules contrôles et *updARNi* (voir Fig. 31). L'accumulation apical du marquage Sqh :GFP et les espaces générés au niveaux des JA avec les différentes distributions ont permis de tracer à la main les contours cellulaires du domaine apical des CF. Puisque pour les follicules *updARNi* le marquage Sqh:GFP n'était pas exclu des JA, un biais au niveau de la délimitation des contours cellulaires a été introduit.

Analyse statistiques. Un test de X^2 a permis de tester les associations entre le nombre de CP et les génotypes indiqués pour les figures 27, 28, 33-36, 43 et 44. Pour les tableaux 2 et 3 l'association entre les distributions de Myosine et les génotypes indiqués a également été contrastée par un test X^2 . Pour les figures 30, 32, 38-41 la normalité des distributions a été contrastée par un test Kolmogorov-Smirnov avec la correction Lilliefors. Un test de wilcoxon bivarié a été utilisé pour tester la significativité entre les quantifications des génotypes analysés. Les tests pour les figures 30 et 32 ont été effectués avec le logiciel R version 3.2.1 et avec le logiciel Prism, pour les figures 38-41. La significativité pour les tests statistiques a été établie par les suivantes valeurs de « p » : n.s (non significatif) $p > 0.05$; * : $0.01 < p < 0.05$; ** : $0.001 < p < 0.01$; *** : $0 < p < 0.001$.

BIBLIOGRAPHIE

- Aranjuez, G., Burtcher, A., Sawant, K., Majumder, P., and McDonald, J.A. (2016). Dynamic myosin activation promotes collective morphology and migration by locally balancing oppositional forces from surrounding tissue. *Mol. Biol. Cell* *27*, 1898–1910.
- Arbouzova, N.I., and Zeidler, M.P. (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* *133*, 2605–2616.
- Arya, R., and White, K. (2015). Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* *39*, 12–19.
- 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.
- Bai, J., and Montell, D. (2002). Eyes absent, a key repressor of polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development* *129*, 5377–5388.
- 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.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* *192*, 907–917.
- Beccari, S., Teixeira, L., and Rørth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* *111*, 115–123.
- Bergert, M., Chandradoss, S.D., Desai, R.A., and Paluch, E. (2012). Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 14434–14439.
- Bertet, C., Sulak, L., and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* *429*, 667–671.
- Bertet, C., Rauzi, M., and Lecuit, T. (2009). Repression of Wasp by JAK/STAT signalling inhibits medial actomyosin network assembly and apical cell constriction in intercalating epithelial cells. *Development* *136*, 4199–4212.
- Bertet, C., Li, X., Erlik, T., Cavey, M., Wells, B., and Desplan, C. (2014). Temporal patterning of neuroblasts controls Notch-mediated cell survival through regulation of Hid or Reaper. *Cell* *158*, 1173–1186.
- Besse, F., and Pret, A.-M. (2003). Apoptosis-mediated cell death within the ovarian polar cell lineage of *Drosophila melanogaster*. *Development* *130*, 1017–1027.
- Blanchard, G.B., Murugesu, S., Adams, R.J., Martinez-Arias, A., and Gorfinkiel, N. (2010). Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cell shape fluctuations during dorsal closure. *Development* *137*, 2743–2752.
- Blankenship, J.T., Backovic, S.T., Sanny, J.S.P., Weitz, O., and Zallen, J.A. (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. *Dev. Cell* *11*, 459–470.

- Böhmer, F.-D., and Friedrich, K. (2014). Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *JAKSTAT* *3*, e28087.
- Borensztein, A., Boissoneau, E., Fernandez, G., Agnès, F., and Pret, A.-M. (2013). JAK/STAT autocontrol of ligand-producing cell number through apoptosis. *Development* *140*, 195–204.
- Bottone, M.G., Santin, G., Aredia, F., Bernocchi, G., Pellicciari, C., and Scovassi, A.I. (2013). Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview. *Cells* *2*, 294–305.
- Brachmann, C.B., and Cagan, R.L. (2003). Patterning the fly eye: the role of apoptosis. *Trends Genet.* *19*, 91–96.
- Bryant, D.M., and Mostov, K.E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 887–901.
- Cai, D., Chen, S.-C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choessel-Cadamuro, V., Sawyer, J.K., Danuser, G., and Montell, D.J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* *157*, 1146–1159.
- Calvi, B.R., and Spradling, A.C. (1999). Chorion gene amplification in *Drosophila*: A model for metazoan origins of DNA replication and S-phase control. *Methods* *18*, 407–417.
- Canel, M., Serrels, A., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2013). E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* *126*, 393–401.
- Cetera, M., Ramirez-San Juan, G.R., Oakes, P.W., Lewellyn, L., Fairchild, M.J., Tanentzapf, G., Gardel, M.L., and Horne-Badovinac, S. (2014). Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation. *Nat Commun* *5*, 5511.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 730–736.
- Chen, Q., Giedt, M., Tang, L., and Harrison, D.A. (2014). Tools and methods for studying the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Methods* *68*, 160–172.
- Collinet, C., and Lecuit, T. (2013). Stability and dynamics of cell-cell junctions. *Prog Mol Biol Transl Sci* *116*, 25–47.
- 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.
- David, D.J.V., Wang, Q., Feng, J.J., and Harris, T.J.C. (2013). Bazooka inhibits aPKC to limit antagonism of actomyosin networks during amnioserosa apical constriction. *Development* *140*, 4719–4729.
- Deng, W.M., Althausen, 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.
- Devergne, O., Ghigliione, C., and Noselli, S. (2007). The endocytic control of JAK/STAT signalling in *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* *120*, 3457–3464.
- 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.

- Dutta, P., Sabri, N., Li, J., and Li, W.X. (2014). Role of STAT3 in lung cancer. *JAKSTAT* 3, e999503.
- Eisenhoffer, G.T., Loftus, P.D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C.-B., Morcos, P.A., and Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* 484, 546–549.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of Apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4, 330–349.
- Fernández, B.G., Arias, A.M., and Jacinto, A. (2007). Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mech. Dev.* 124, 884–897.
- Flusberg, D.A., and Sorger, P.K. (2015). Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol.* 25, 446–458.
- Fregoso Lomas, M., Hails, F., Lachance, J.-F.B., and Nilson, L.A. (2013). Response to the dorsal anterior gradient of EGFR signaling in *Drosophila* oogenesis is prepatterned by earlier posterior EGFR activation. *Cell Rep* 4, 791–802.
- Fregoso Lomas, M., De Vito, S., Boisclair Lachance, J.-F., Houde, J., and Nilson, L.A. (2016). Determination of EGFR Signaling Output by Opposing Gradients of BMP and JAK/STAT Activity. *Curr. Biol.* 26, 2572–2582.
- Fuchs, Y., and Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147, 742–758.
- Gisselbrecht, S. (1999). The CIS/SOCS proteins: a family of cytokine-inducible regulators of signaling. *Eur. Cytokine Netw.* 10, 463–470.
- Glise B., and Noselli S. (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes & Development* 11, 1738–1747.
- González-Reyes, A., Elliott, H., and St Johnston, D. (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* 375, 654–658.
- Gorfinkiel, N., and Blanchard, G.B. (2011). Dynamics of actomyosin contractile activity during epithelial morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 531–539.
- Gorfinkiel, N., Blanchard, G.B., Adams, R.J., and Arias, A.M. (2009). Mechanical control of global cell behaviour during dorsal closure in *Drosophila*. *Development* 136, 1889–1898.
- 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.
- Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2011a). Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J. Cell Biol.* 193, 667–676.

- Gudipaty, S.A., and Rosenblatt, J. (2016). Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Guillot, C., and Lecuit, T. (2013). Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science* *340*, 1185–1189.
- Gutzeit, H.O., Eberhardt, W., and Gratwohl, E. (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J. Cell. Sci.* *100 (Pt 4)*, 781–788.
- Hagmann, J., Burger, M.M., and Dagan, D. (1999). Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* *73*, 488–499.
- Haigo, S.L., and Bilder, D. (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science* *331*, 1071–1074.
- Harrison, D.A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*.
- Hayashi, Y., Sexton, T.R., Dejima, K., Perry, D.W., Takemura, M., Kobayashi, S., Nakato, H., and Harrison, D.A. (2012). Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. *Development* *139*, 4162–4171.
- He, L., Wang, X., Tang, H.L., and Montell, D.J. (2010). Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat Cell Biol* *12*, 1133–1142.
- Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S.I., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B., and Sahai, E. (2011). Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* *13*, 49–58.
- Hombría, J.C.-G., and Sotillos, S. (2008). Disclosing JAK/STAT links to cell adhesion and cell polarity. *Semin. Cell Dev. Biol.* *19*, 370–378.
- Hombría, J.C.-G., and Sotillos, S. (2013). JAK-STAT pathway in *Drosophila* morphogenesis: From organ selector to cell behavior regulator. *JAKSTAT* *2*, e26089.
- Horne-Badovinac, S., and Bilder, D. (2005). Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Dyn.* *232*, 559–574.
- Hu, N., and Castelli-Gair, J. (1999). Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev. Biol.* *214*, 197–210.
- Huang, L., and Muthuswamy, S.K. (2010). Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 41–50.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* *122*, 421–434.
- Hudson, A.M., and Cooley, L. (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* *156*, 677–687.
- Huynh, J.R., 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.

- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992). Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* *6*, 1518–1530.
- 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.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., and Shi, Y.-B. (2010). Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. *Apoptosis* *15*, 350–364.
- Jarrett, O., Stow, J.L., Yap, A.S., and Key, B. (2002). Dynamin-dependent endocytosis is necessary for convergent-extension movements in *Xenopus* animal cap explants. *Int. J. Dev. Biol.* *46*, 467–473.
- Johansen, K.A., Iwaki, D.D., and Lengyel, J.A. (2003). Localized JAK/STAT signaling is required for oriented cell rearrangement in a tubular epithelium. *Development* *130*, 135–145.
- Josten, F., Fuss, B., Feix, M., Meissner, T., and Hoch, M. (2004). Cooperation of JAK/STAT and Notch signaling in the *Drosophila* foregut. *Dev. Biol.* *267*, 181–189.
- Kessler, T., and Müller, H.A.J. (2009). Cleavage of Armadillo/beta-catenin by the caspase DrICE in *Drosophila* apoptotic epithelial cells. *BMC Dev. Biol.* *9*, 15.
- Khammari, A., Agnès, F., Gandille, P., and Pret, A.-M. (2011). Physiological apoptosis of polar cells during *Drosophila* oogenesis is mediated by Hid-dependent regulation of Diap1. *Cell Death Differ.* *18*, 793–805.
- Kile, B.T., Schulman, B.A., Alexander, W.S., Nicola, N.A., Martin, H.M.E., and Hilton, D.J. (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 235–241.
- 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.
- Kowalczyk, A.P., and Nanes, B.A. (2012). Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Subcell. Biochem.* *60*, 197–222.
- Kuipers, D., Mehonic, A., Kajita, M., Peter, L., Fujita, Y., Duke, T., Charras, G., and Gale, J.E. (2014). Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J. Cell. Sci.* *127*, 1229–1241.
- Lecuit, T., Lenne, P.-F., and Munro, E. (2011). Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 157–184.
- Lee, S.H., and Dominguez, R. (2010). Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. *Mol Cells* *29*, 311–325.
- Leptin, M. (2005). Gastrulation movements: the logic and the nuts and bolts. *Dev. Cell* *8*, 305–320.
- Leulier, F., Ribeiro, P.S., Palmer, E., Tenev, T., Takahashi, K., Robertson, D., Zachariou, A., Pichaud, F., Ueda, R., and Meier, P. (2006). Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the *Drosophila* cell death machinery. *Cell Death Differ.* *13*, 1663–1674.

- Levayer, R., and Lecuit, T. (2013). Oscillation and polarity of E-cadherin asymmetries control actomyosin flow patterns during morphogenesis. *Dev. Cell* *26*, 162–175.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A., and Lecuit, T. (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* *13*, 529–540.
- Lim, C.P., and Cao, X. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* *2*, 536–550.
- Liu, Z., Tan, J.L., Cohen, D.M., Yang, M.T., Sniadecki, N.J., Ruiz, S.A., Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 9944–9949.
- López-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* *15*, 1393–1405.
- Lovegrove, B., Simões, S., Rivas, M.L., Sotillos, S., Johnson, K., Knust, E., Jacinto, A., and Hombría, J.C.-G. (2006). Coordinated control of cell adhesion, polarity, and cytoskeleton underlies Hox-induced organogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *16*, 2206–2216.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., and Spiegel, S. (2012). SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE SIGNALING AND ITS ROLE IN DISEASE. *Trends Cell Biol* *22*, 50–60.
- Maia-Brigagão, C., Morgado-Díaz, J.A., and De Souza, W. (2012). Giardia disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol. Int.* *61*, 280–287.
- Manning, L.A., Weideman, A.M., Peercy, B.E., and Starz-Gaiano, M. (2015). Tissue landscape alters adjacent cell fates during *Drosophila* egg development. *Nat Commun* *6*, 7356.
- Margolis, J., and Spradling, A. (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* *121*, 3797–3807.
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T., and Baum, B. (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature* *484*, 542–545.
- Martin, A.C. (2010). Pulsation and stabilization: contractile forces that underlie morphogenesis. *Dev. Biol.* *341*, 114–125.
- 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., and Perez-Moreno, M. (2011). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 23–38.
- Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* *12*, 23–38.

- Mason, F.M., Tworoger, M., and Martin, A.C. (2013). Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction. *Nat. Cell Biol.* *15*, 926–936.
- Mason, F.M., Xie, S., Vasquez, C.G., Tworoger, M., and Martin, A.C. (2016). RhoA GTPase inhibition organizes contraction during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* *214*, 603–617.
- McCrea, P.D., and Gumbiner, B.M. (1991). Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J. Biol. Chem.* *266*, 4514–4520.
- McGregor, J.R., Xi, R., and Harrison, D.A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development* *129*, 705–717.
- Meghana, C., Ramdas, N., Hameed, F.M., Rao, M., Shivashankar, G.V., and Narasimha, M. (2011). Integrin adhesion drives the emergent polarization of active cytoskeletal stresses to pattern cell delamination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9107–9112.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* *407*, 796–801.
- Mirouse, A. Jak-Stat pathway induces *Drosophila* follicle elongation by a gradient of apical contractility.
- Mitonaka, T., Muramatsu, Y., Sugiyama, S., Mizuno, T., and Nishida, Y. (2007). Essential roles of myosin phosphatase in the maintenance of epithelial cell integrity of *Drosophila* imaginal disc cells. *Dev. Biol.* *309*, 78–86.
- Moffitt, K.L., Martin, S.L., and Walker, B. (2010). Proteases implicated in apoptosis: old and new. *J. Pharm. Pharmacol.* *62*, 563–576.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A., and Suzanne, M. (2015). Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* *518*, 245–248.
- Montell, D.J. (2003). Border-cell migration: the race is on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 13–24.
- Montell, D.J., Yoon, W.H., and Starz-Gaiano, M. (2012). Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 631–645.
- Mukherjee, T., Hombría, J.C.-G., and Zeidler, M.P. (2005). Opposing roles for *Drosophila* JAK/STAT signalling during cellular proliferation. *Oncogene* *24*, 2503–2511.
- Muliyil, S., Krishnakumar, P., and Narasimha, M. (2011). Spatial, temporal and molecular hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Development* *138*, 3043–3054.
- Munjal, A., Philippe, J.-M., Munro, E., and Lecuit, T. (2015). A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis. *Nature* *524*, 351–355.
- Murthy, K., and Wadsworth, P. (2005). Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr. Biol.* *15*, 724–731.
- Mutterer, J., and Zinck, E. (2013). Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J Microsc* *252*, 89–91.

Nicolas, C.S., Peineau, S., Amici, M., Csaba, Z., Fafouri, A., Javalet, C., Collett, V.J., Hildebrandt, L., Seaton, G., Choi, S.-L., et al. (2012). The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* 73, 374–390.

Nicolas, C.S., Amici, M., Bortolotto, Z.A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G.L., and Peineau, S. (2013). The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT* 2.

Nystul, T., and Spradling, A. (2010). Regulation of epithelial stem cell replacement and follicle formation in the *Drosophila* ovary. *Genetics* 184, 503–515.

Padanilam, B.J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284, F608-627.

Pfeifer, A.C., Timmer, J., and Klingmüller, U. (2008). Systems biology of JAK/STAT signalling. *Essays Biochem.* 45, 109–120.

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

Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 451–477.

Polyakov, O., He, B., Swan, M., Shaevitz, J.W., Kaschube, M., and Wieschaus, E. (2014). Passive mechanical forces control cell-shape change during *Drosophila* ventral furrow formation. *Biophys. J.* 107, 998–1010.

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

Prasad, M., Jang, A.C.-C., Starz-Gaiano, M., Melani, M., and Montell, D.J. (2007). A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging. *Nat Protoc* 2, 2467–2473.

Quesnelle, K.M., Boehm, A.L., and Grandis, J.R. (2007). STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J. Cell. Biochem.* 102, 311–319.

Quintás-Cardama, A., and Verstovsek, S. (2013). Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin. Cancer Res.* 19, 1933–1940.

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397–400.

Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2008). Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 1401–1410.

Rauzi, M., Lenne, P.-F., and Lecuit, T. (2010). Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling. *Nature* 468, 1110–1114.

Ribet, D., and Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 17, 173–183.

Roh-Johnson, M., Shemer, G., Higgins, C.D., McClellan, J.H., Werts, A.D., Tulu, U.S., Gao, L., Betzig, E., Kiehart, D.P., and Goldstein, B. (2012). Triggering a cell shape change by exploiting preexisting actomyosin contractions. *Science* 335, 1232–1235.

- Rosenblatt, J., Raff, M.C., and Cramer, L.P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* *11*, 1847–1857.
- Rotty, J.D., Wu, C., and Bear, J.E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 7–12.
- Rubinstein, N., Chi, J., and Holtzer, H. (1976). Coordinated synthesis and degradation of actin and myosin in a variety of myogenic and non-myogenic cells. *Exp. Cell Res.* *97*, 387–393.
- Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* *45*, 528–537.
- Sawyer, J.K., Harris, N.J., Slep, K.C., Gaul, U., and Peifer, M. (2009). The *Drosophila* afadin homologue Canoe regulates linkage of the actin cytoskeleton to adherens junctions during apical constriction. *J. Cell Biol.* *186*, 57–73.
- Shi, S., Calhoun, H.C., Xia, F., Li, J., Le, L., and Li, W.X. (2006). JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing. *Nat. Genet.* *38*, 1071–1076.
- Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S.J., Dutta, P., Yan, S.-J., and Li, W.X. (2008). *Drosophila* STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat. Cell Biol.* *10*, 489–496.
- Shore, E.M., and Nelson, W.J. (1991). Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *266*, 19672–19680.
- Siegrist, S.E., Haque, N.S., Chen, C.-H., Hay, B.A., and Hariharan, I.K. (2010). Inactivation of both Foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *20*, 643–648.
- Silva, C.M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* *23*, 8017–8023.
- Silver, D.L., and Montell, D.J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* *107*, 831–841.
- Silver, D.L., Geisbrecht, E.R., and Montell, D.J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development* *132*, 3483–3492.
- Simões, S., Denholm, B., Azevedo, D., Sotillos, S., Martin, P., Skaer, H., Hombría, J.C.-G., and Jacinto, A. (2006a). Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis. *Development* *133*, 4257–4267.
- Simões, S., Denholm, B., Azevedo, D., Sotillos, S., Martin, P., Skaer, H., Hombría, J.C.-G., and Jacinto, A. (2006b). Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis. *Development* *133*, 4257–4267.
- 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.
- Slattum, G., McGee, K.M., and Rosenblatt, J. (2009). P115 RhoGEF and microtubules decide the direction apoptotic cells extrude from an epithelium. *J. Cell Biol.* *186*, 693–702.

- Sokolow, A., Toyama, Y., Kiehart, D.P., and Edwards, G.S. (2012). Cell ingression and apical shape oscillations during dorsal closure in *Drosophila*. *Biophys. J.* *102*, 969–979.
- Solon, J., Kaya-Copur, 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., Krahn, M., Espinosa-Vázquez, J.M., and Hombría, J.C.-G. (2013). Src kinases mediate the interaction of the apical determinant Bazooka/PAR3 with STAT92E and increase signalling efficiency in *Drosophila* ectodermal cells. *Development* *140*, 1507–1516.
- Spradling, A.C. (1993). The development of *Drosophila melanogaster*. In *Developmental Genetics of Oogenesis*, p.
- Stark, G.R., and Darnell, J.E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* *36*, 503–514.
- Suzanne, M., Petzoldt, A.G., Spéder, P., Coutelis, J.-B., Steller, H., and Noselli, S. (2010). Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping. *Curr. Biol.* *20*, 1773–1778.
- Teng, X., and Toyama, Y. (2011). Apoptotic force: active mechanical function of cell death during morphogenesis. *Dev. Growth Differ.* *53*, 269–276.
- Thomas, S.J., Snowden, J.A., Zeidler, M.P., and Danson, S.J. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br. J. Cancer* *113*, 365–371.
- Toyama, Y., Peralta, X.G., Wells, A.R., Kiehart, D.P., and Edwards, G.S. (2008). Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science* *321*, 1683–1686.
- Truong Quang, B.-A., Mani, M., Markova, O., Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2013). Principles of E-cadherin supramolecular organization in vivo. *Curr. Biol.* *23*, 2197–2207.
- 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.
- Valencia-Expósito, A., Grosheva, I., Míguez, D.G., González-Reyes, A., and Martín-Bermudo, M.D. (2016). Myosin light-chain phosphatase regulates basal actomyosin oscillations during morphogenesis. *Nat Commun* *7*, 10746.
- Vasquez, C.G., and Martin, A.C. (2016). Force transmission in epithelial tissues. *Dev. Dyn.* *245*, 361–371.
- Vasquez, C.G., Tworoger, M., and Martin, A.C. (2014). Dynamic myosin phosphorylation regulates contractile pulses and tissue integrity during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* *206*, 435–450.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 778–790.
- Vincent, P.A., Xiao, K., Buckley, K.M., and Kowalczyk, A.P. (2004). VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *286*, C987-997.
- 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.

- Wells, R.E., Barry, J.D., Warrington, S.J., Cuhlmann, S., Evans, P., Huber, W., Strutt, D., and Zeidler, M.P. (2013a). Control of tissue morphology by Fasciclin III-mediated intercellular adhesion. *Development* **140**, 3858–3868.
- Wells, R.E., Barry, J.D., Warrington, S.J., Cuhlmann, S., Evans, P., Huber, W., Strutt, D., and Zeidler, M.P. (2013b). Control of tissue morphology by Fasciclin III-mediated intercellular adhesion. *Development* **140**, 3858–3868.
- Weston, L., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2012). Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *J. Cell. Sci.* **125**, 3519–3527.
- Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., and Johnson, K.R. (2008). Cadherin switching. *J. Cell. Sci.* **121**, 727–735.
- Xi, R., McGregor, J.R., and Harrison, D.A. (2003). A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium. *Dev. Cell* **4**, 167–177.
- Xie, S., and Martin, A.C. (2015). Intracellular signalling and intercellular coupling coordinate heterogeneous contractile events to facilitate tissue folding. *Nat Commun* **6**, 7161.
- Yamaguchi, Y., and Miura, M. (2015). Programmed Cell Death and Caspase Functions During Neural Development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **114**, 159–184.
- Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yosida, H., and Miura, M. (2011). Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J. Cell Biol.* **195**, 1047–1060.
- Zhang, L., and Ward, R.E. (2011). Distinct tissue distributions and subcellular localizations of differently phosphorylated forms of the myosin regulatory light chain in *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns* **11**, 93–104.
- Zhao, T., Graham, O.S., Raposo, A., and St Johnston, D. (2012). Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. *Science* **336**, 999–1003.
- Zou, H., and Niswander, L. (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738–741.

ANNEXES

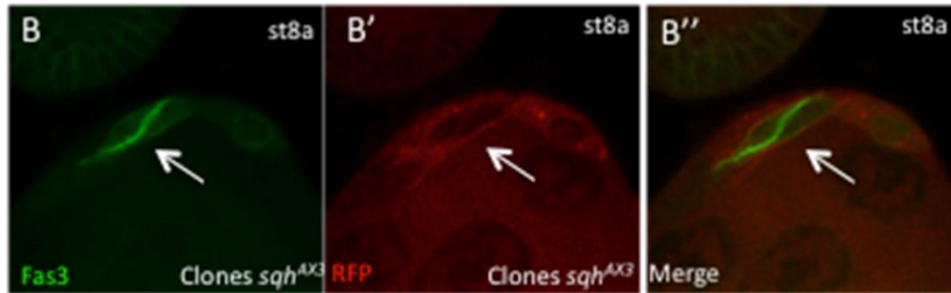


Figure Supplémentaire 1. La perte de fonction de *sqh* dans l'épithélium folliculaire altère la forme des cellules épithéliales. B-B'') Image confocale d'un follicule au stade 8 de l'ovogenèse. Des clones mitotiques homozygotes pour un allèle amorphe *sqh*^{AX3} ont été générés par la technique FLP/FRT décrite dans mon rapport M2 (AY Torres Espinosa, UnivPSud 2012). L'immunodétection de Fas3 en vert identifie les CP (B, B''). Le marquage en rouge (immunodétection de la Red Fluorescent Protein, RFP) indique les cellules homozygotes pour l'allèle amorphe *sqh*^{AX3} (B', B''). Le follicule présente 1 clones incluant 2 CP *sqh*^{AX3} avec une forme cellulaire aplatie et allongée (flèches en B-B'').

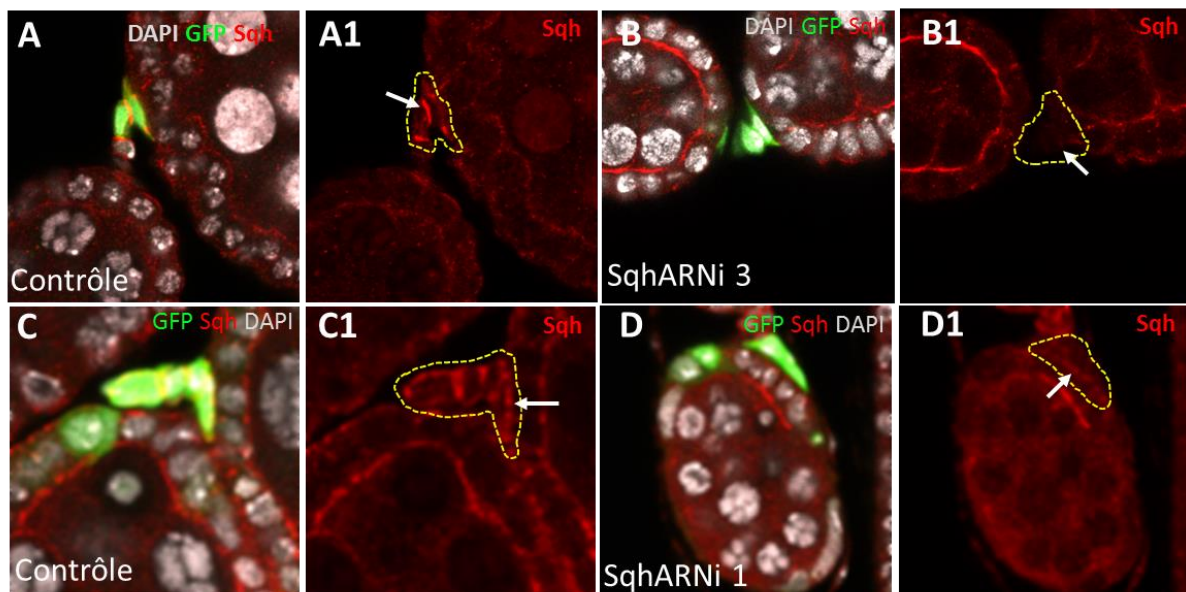


Figure Supplémentaire 2. Validation de la diminution de *sqh* lors de l'utilisation de deux lignées *sqhARNi*. A-D1) Images confocales de clones flip-out de follicules de génotype : Contrôle (hsp70 /+ ; Tub-FRT/cd2/FRT-Gal4, UAS-GFP/+ ; +/+) (A, A1, C, C1), *SqhARNi* 3 (hsp70 /+ ; Tub-FRT/cd2/FRT-Gal4, UAS-GFP/+ ; *sqhARNi3*/+) (B, B1) et *SqhARNi* 1 (hsp70 /+ ; Tub-FRT/cd2/FRT-Gal4, UAS-GFP/+ ; *sqhARNi3*/+) (D, D1). Les clones FRT/FLP sont marqués par la présence de la GFP (vert) et les noyaux des cellules est marqué par le DAPI (gris) (A-D). Des anticorps anti-*Sqh* (rouge) ont été utilisés afin de tester la diminution de l'expression de *sqh* par des lignées ARNi (A-D1). Les pointillés en A1-D1 entourent des cellules clonales observés en A-D, respectivement. Les flèches indiquent la présence (à gauche, A, A1, C, C1) ou l'absence (à droite en haut, B, B1) ou la diminution (à droite en bas, D, D1) du marquage *Sqh*. Pour conditions de génération de clones regarder Matériels et Méthodes.

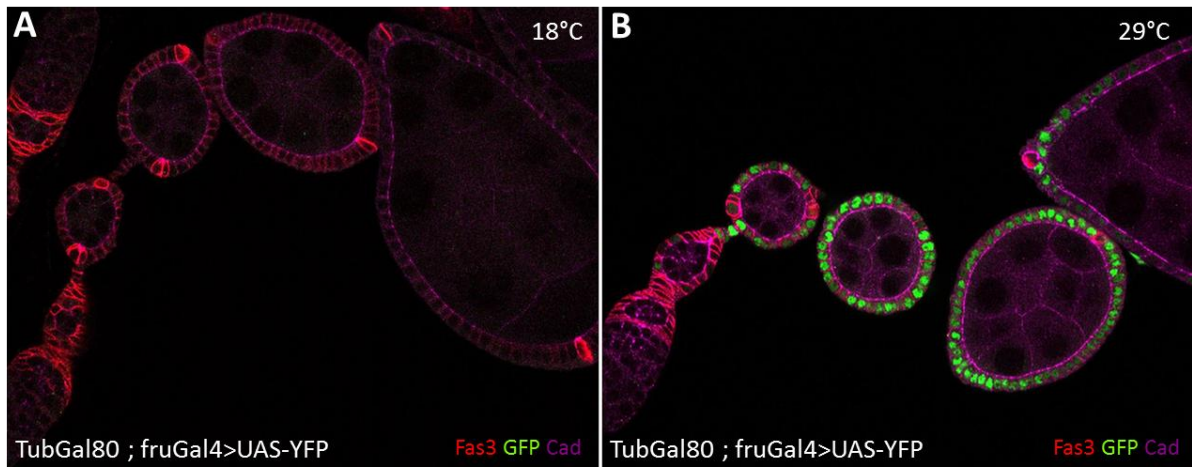


Figure Supplémentaire 3. Validation du système UAS/-Gal4/-Gal80. A, B) Images confocales des ovarioles de génotype : *tub-Gal80/UAS-YFP ; fru-Gal4/+*. A gauche (A), une ovariole extraite à partir d'une mouche maintenue à 18°C. la protéine Gal80 est active à cette température et se fixe sur la protéine Gal4 changeant la configuration de cette dernière et empêchant l'expression du transgène UAS-YFP. Par conséquent, l'expression de la YFP (détectée par l'anticorps anti-GFP) n'est observée dans aucun stade de l'ovogenèse. A droite (B), une ovariole extraite à partir d'une mouche qui a été à 29°C pendant 4-5 jours (après son éclosion et jusqu'à sa dissection). A cette température la protéine Gal80 est inactive donc elle ne peut pas se fixer sur la protéine Gal4. Ainsi, Gal4 active l'expression du transgène UAS-YFP dans un patron dépendant de l'expression du gène *fruitless*. La détection de la YFP commence à partir du stade 2 de l'ovogenèse. L'immunomarquage de la Cadherine en couleur magenta indique le domaine subapical des cellules de l'épithélium folliculaire.

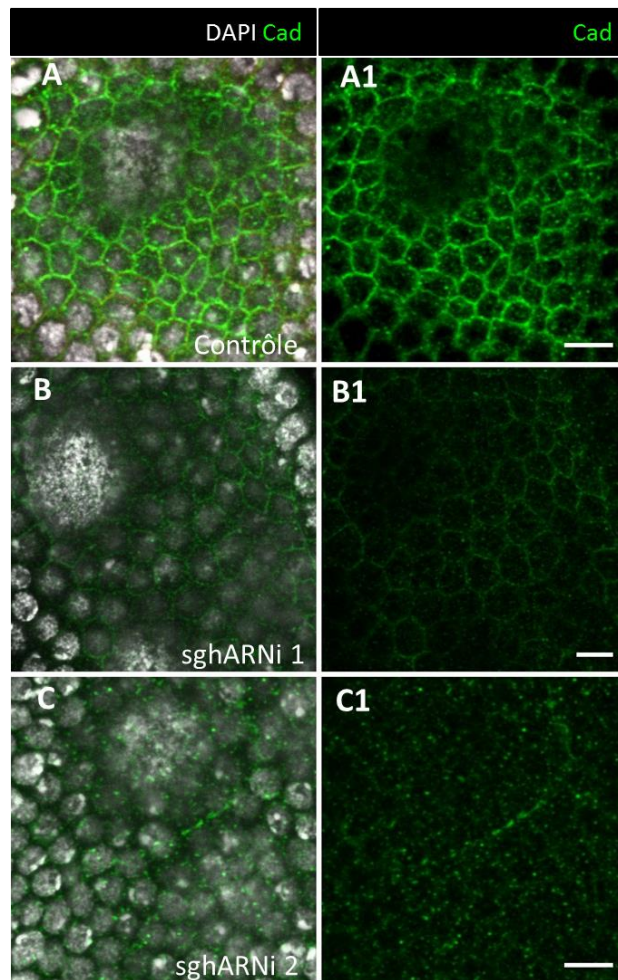


Figure Supplémentaire 4. Validation de la diminution de la Cadhérine lors de l'utilisation de deux lignées *shgARNi*. A-C1) Images confocales des follicules en stades tardifs de l'ovogenèse. A, A1) Follicule contrôle (*tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/+*). B, B1) Follicule *shgARNi 1* (*UAS-shgARNi 1/+ ; tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/+*). C, C1) Follicule *shgARNi 2* (*UAS-shgARNi 2/+ ; tub-Gal80/+ ; fru-Gal4/+*). La Cadhérine, en vert, révèle le domaine subapical des CF (A, A1). Son expression est diminuée (B1) et absente (C1) dans les CF des follicules *shgARNi 1* (B, B1) et *shgARNi 2* (C, C1). Les noyaux des cellules sont identifiés par le DAPI, en niveau de gris. Barre d'échelle : 5µm.

Titre : Lien entre signalisation JAK/STAT, remodelage cellulaire et extrusion d'un groupe de cellules épithéliales dans l'ovaire de drosophile

Mots clés : Morphogenèse, extrusion épithéliale, signalisation JAK/STAT, acto-myosine, apoptose

Résumé : Les cellules épithéliales changent en forme et en nombre au cours de divers processus morphogénétiques pendant le développement. La dynamique du réseau d'acto-myosine en interaction directe avec les jonctions adhérentes (JA) est à la base de ces mouvements cellulaires. Cependant, les mécanismes qui régulent cette dynamique cellulaire et moléculaire dans l'espace et le temps sont peu étudiés. Durant les stades précoces de l'ovogenèse chez la drosophile, le follicule ovarien est une sphère composée d'un un cyste germinale recouvert d'un épithélium folliculaire monocouche d'origine somatique. Aux pôles de cette structure, un groupe de cellules, les Cellules Polaires (CP), sont produites en excès (3-6 cellules) au début de l'ovogenèse, et ensuite subissent une mort cellulaire programmée apoptotique entre les stades 2 et 4 de l'ovogenèse. De cette façon, à partir du stade 5 tous les pôles contiendront 2CP. Les CP sont l'unique source de sécrétion du ligand de la voie de signalisation JAK/STAT, Unpaired. Notre équipe a démontré que l'activation autonome et non-autonome cellulaire de la voie JAK/STAT est nécessaire pour l'apoptose développementale des CP. Grâce à l'utilisation de l'imagerie confocale en temps réel

ainsi que sur des tissus fixés, j'ai établi une séquence d'évènements stéréotypés qui a lieu pendant l'élimination des CP surnuméraires. Trois phases ont été identifiées dans cette séquence: 1) une phase lente de remodelage cellulaire dépendante de la voie de signalisation JAK/STAT au cours de laquelle chaque CP à être éliminée est totalement enveloppée par les CP voisines (plus de 7h) ; 2) une phase d'activation de la cascade canonique de l'apoptose, commençant lorsque la PC est entièrement enveloppée, suivie d'un détachement puis d'une extrusion latérale des corps apoptotiques (1h) ; et 3) une phase de phagocytose des corps apoptotiques par les Cellules Folliculaires (CF) voisines (plus de 5h). Ensuite, en utilisant une approche gènes candidats, j'ai effectué des perturbations génétiques de la Myosine, de la Cadherine et de différents régulateurs de l'Actine dans les CF et/ou dans les CP, ainsi que des analyses de la dynamique de certaines de ces molécules. Ces expériences m'ont permis de déterminer que la fonction de ces molécules est nécessaire dans les CF pour le processus d'élimination des CP surnuméraires. Finalement un lien entre la signalisation JAK/STAT et la dynamique de la Myosine a été mis en évidence.

Title : Link Between JAK/STAT signaling, cell remodeling and extrusion from the follicular epithelium in the *Drosophila* ovary

Keywords : Morphogenesis, epithelial cell extrusion, JAK/STAT signaling, acto-myosin, apoptosis

Abstract : Epithelial cells change in shape and number over the various morphogenetic processes occurring during development. The dynamics of the acto-myosin network in direct interaction with adherens junctions is the basis of these cell movements. However, the mechanisms regulating these cellular and molecular dynamics in space and time have not been much studied. During the early stages of oogenesis in *Drosophila*, the ovarian follicle is a sphere composed of a germline cyst surrounded by a mono-layered follicular epithelium of somatic origin. At the poles of this structure, a group of cells, the Polar Cells (PCs), which are produced in excess (3-6 cells) during early oogenesis, undergo apoptotic programmed cell death between stages 2-4 of oogenesis, thus that as of stage 5 all poles contain exactly 2 PCs. PCs are the only source of the secreted ligand of the JAK/STAT signaling pathway, Unpaired. Our group has demonstrated that cell autonomous and cell non-autonomous activation of the JAK/STAT pathway is necessary for this developmental apoptosis. Through the use of confocal imaging in real time and on fixed tissues,

I established a stereotyped sequence of events that occurs during the elimination of supernumerary PCs. Three phases were identified in this sequence: 1) a slow phase of cellular remodeling dependent on JAK/STAT signaling in which the PC to be eliminated is completely enveloped by its PC neighbors (more than 7 hours); 2) activation of the canonical apoptosis cascade, occurring when the PC is fully enveloped, followed by cell detachment and lateral extrusion of apoptotic corpses (1h); and 3) phagocytosis of apoptotic corpses by the surrounding Follicular Cells (FCs) (over 5 hours). Then, using a candidate gene approach, I conducted genetic perturbation of Myosin, Cadherin and actin regulators in the FCs and/or PCs, and the analysis of the dynamics of some of these molecules. These experiences allowed me to determine that the function of these molecules is required in FCs for the process of elimination of supernumerary PCs. Finally, evidence obtained suggests a link between JAK/STAT signaling and Myosin dynamics.

