



HAL
open science

Mécanisme de génération de forces par les cellules apoptotiques lors de la morphogenèse de la drosophile

Mégane Rayer

► **To cite this version:**

Mégane Rayer. Mécanisme de génération de forces par les cellules apoptotiques lors de la morphogenèse de la drosophile. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30169 . tel-02651185

HAL Id: tel-02651185

<https://theses.hal.science/tel-02651185v1>

Submitted on 29 May 2020

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Mégane RAYER

Le 1 octobre 2019

**Mécanisme de génération de forces par les cellules apoptotiques
lors de la morphogénèse de la drosophile.**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

**LBCMCP - Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la
Prolifération**

Thèse dirigée par

Magali SUZANNE et Bruno MONIER

Jury

Mme Bénédicte SANSON, Rapporteur

M. Solon JEROME, Rapporteur

M. Yvan CANITROT, Examinateur

M. Christophe GUILLUY, Examinateur

Mme Pascale DUFOURCQ, Examinatrice

M. François ROBIN, Examinateur

Mme Alice DAVY, Examinatrice

Mme Magali SUZANNE, Directrice de thèse

Remerciements

Merci,

A l'ERC (European Research Council),

Merci à Magali Suzanne d'avoir financé mes trois premières années de thèse grâce à l'obtention de l'ERC.

A la ligue contre le cancer,

Merci aux donateurs d'avoir financé ma dernière année de thèse.

A Bénédicte Sanson, Jérôme Solon, Christophe Guilluy, François Robin et Pascale Dufourcq,

Merci de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

A tous les membres du LBCMCP et du CBI,

Merci à tous pour ces cinq années passées au 4R3, un bâtiment rustique et authentique, que personne ne peut oublier.

A Alice Davy et Fanny Storck,

Merci à toutes les deux d'avoir accepté d'être les membres de mon comité de thèse et de m'avoir soutenu au cours de ma thèse.

A l'équipe Suzanne !

Une merveilleuse équipe, n'est-ce pas ? Une équipe où il fait bon travailler, apprendre, et échanger. C'est une équipe dynamique où tout le monde est heureux ! L'ambiance de cette équipe y est vraiment exceptionnelle, si bien que l'on n'a pas envie d'en partir ! La science est bonne et les humains aussi alors pourquoi s'en aller ? Voler de mes propres ailes peut-être et découvrir d'autres horizons !

A Magali Suzanne, ma directrice de thèse.

Magali, merci de m'avoir ouvert les portes de la recherche, de m'avoir offert l'opportunité de réaliser une thèse et de m'avoir fait confiance. Je tiens particulièrement à te remercier pour la qualité de ton encadrement, je dirais même qu'il était excellent, je n'aurais pas pu rêver mieux ! Merci pour ton soutien, ta confiance, ton écoute, ta bienveillance, ta gentillesse, mais surtout ton extrême bonne humeur au quotidien, ta positive attitude et ton enthousiasme infini ! Au-delà de ta richesse scientifique, je respecte infiniment et admire ton humanité.

A Bruno Monier, mon mentor,

Bruno, je pense que c'est avec toi que j'ai le plus appris ! Merci pour le temps énorme que tu m'as consacré, durant ces cinq dernières années. On pouvait passer des heures à discuter sciences, des discussions toutes enrichissantes, qui m'ont aidé à grandir scientifiquement et humainement ! J'aurais aimé, à la fin de ma thèse, pouvoir faire le calcul du temps de nos conversations, juste pour rire. Je tiens vraiment à te remercier pour ton aide précieuse, notamment en génétique, en imagerie et dans pleins d'autres domaines finalement. Je pense que c'est avec toi que j'ai fait la connaissance du microscope. Cette machine qui nous offre des d'images fabuleuses du monde vivant infiniment petit. Merci de me l'avoir fait découvrir ! Merci également pour ta grande générosité et ta gentillesse. J'ai vraiment aimé travailler à tes côtés, et j'avoue que ça va me faire drôle de quitter le labo. Merci pour tout Bruno !

A Sonia Schott,

Sonia, merci pour ta confiance et ta disponibilité ! Je me souviens de la première manip de biomol que nous avons faite ensemble, tu étais très pédagogue et patiente. Je me souviens aussi que tu m'as laissé très vite me débrouiller seule avec la biomol, grâce à toi je suis devenue très vite autonome au labo. Je tiens à te dire que j'admire ton sens de la rigueur et de l'organisation.

A Arnaud, mon acolyte de paillasse,

Arnaud, nous avons partagé nos travaux afin de construire un bel article et nous y sommes arrivés ! Nous avons su travailler ensemble, nous avons été solidaire dans la lourde tâche d'obtenir le N suffisant... nous avons également su nous parler avec bienveillance et respect quand nous n'étions pas d'accord. Au-delà du travail, merci pour ta bonne humeur, et toutes les fois où tu nous as fait rire, parfois malgré toi !

A Marianne et Sophie, la relève,

Merci à toutes les deux pour la légèreté que vous apportez à l'équipe, c'est toujours agréable de discuter avec vous. Aussi, merci pour vos talents culinaires que nous adorons tous ! Marianne, merci d'être toujours pleine d'énergie et d'enthousiasme ! Merci également de m'avoir aidé à mettre en page ce manuscrit et pour une relecture de dernière minute.

Sophie, merci d'être toujours souriante.

Courage pour la fin de votre thèse, mais je ne me fais pas de souci pour vous, votre travail à chacune est prometteur !

A Corinne, Martine, Emmanuel, Daniela et Amsha,

Corinne, merci pour tous tes bons conseils !

Martine ça ne fait pas longtemps que tu es au labo, j'espère que tu t'y sens bien.

Manu, je n'oublierai pas ton rire si communicatif !

Daniela, merci pour ta gentillesse.

Amsha, merci d'avoir partagé tes connaissances en physiques, j'ai apprécié les discussions que nous avons pu avoir.

A Mélanie,

Mélanie, j'ai l'impression que nous avons grandi ensemble ! C'était vraiment sympa d'évoluer ensemble, ça a entraîné une certaine solidarité que j'ai beaucoup apprécié ! J'ai apprécié les moments que nous avons passé en congrès, surtout celui de San Diego, c'était vraiment sympa ! Merci pour ta grande gentillesse !

A Audrey,

Audrey, je tiens particulièrement à te remercier pour ton sens de l'amitié et ton sens de l'humour ! Je n'oublierai pas tous les échanges que nous avons pu avoir, à parler de tout et de rien, de choses légères ou sérieuses. Merci pour ta grande capacité d'écoute et ta joie de vivre !

A Lucie,

Lucie, j'ai adoré toutes les discussions profondes que nous avons eu au labo et à l'extérieur. Merci à toi pour ta tolérance ! Tu es de loin l'une des personnes les plus humaines que je connaisse. Tu fais preuve d'une grande empathie pour chaque personne que tu peux croiser. Merci pour ta bienveillance à l'égard du monde !

Au club des 5,

Sarah, Thomas, Mélanie et Audrey, que serait la vie de labo sans vous ?! J'ai besoin de vous retrouver chaque midi pour refaire le monde, inventer des histoires sans queue ni tête, pour savoir mon horoscope du jour, pour parler de chats. Vous allez vraiment me manquer ! Merci, pour tous les repas partagés à l'Upsidum, pour tous les moments passés au Black Lion, au ciné, et autres soirées !

Au personnel de l'Upsidum, grâce à qui j'ai pu bien manger chaque midi, depuis quatre ans,

Merci pour votre patience, toutes ces fois où j'ai pu oublier ma carte de cantine, si bien que vous avez fini par retenir mon identité et les habitudes du groupe. Merci à vous tous d'avoir été agréables et souriants, d'avoir fait de nos repas de vraies pauses.

Au JCB, le jogging club Borderouge,

Merci à tous les membres du JCB, plus particulièrement à Justine (notre présidente), à Manu (notre coach), à Isabelle, à Nathalie, à Audrey, à Leila, à Pauline, à Claire, à Anna, à Jean-Marc et à Sihem. C'était vraiment génial de courir à vos côtés. Ça m'a fait beaucoup du bien de pouvoir lâcher prise et discuter avec des personnes de tout âge mais unies par la même passion ! Merci le JCB pour surtout pour toutes ces belles rencontres ! Vous avez égayé ma dernière année de thèse ! Mon seul regret est de ne pas avoir croisé votre route plus tôt ! A un de ces jours sur les courses !

A Chuc, ma copine du M2R,

Merci d'avoir été de très bonne compagnie durant la deuxième année de master, j'ai adoré les soirées crêpes. Merci pour la visite guidée du Strip à Las Vegas, ça m'a fait un plaisir immense de te revoir ! J'espère revenir bientôt chez toi aux USA.

Aux amies de Bordelaises,

Merci à Sophie, July, Pauline et Lucile, pour tous les précieux moments d'amitié, merci d'être toujours là, pour les brunchs, les soirées à thèmes, les nombreux verres en terrasse et toutes les autres sorties que nous avons pu faire.

A mes anciennes coloc d'internat, et amies pour la vie,

Julie, Mélanie, Delphine, presque dix ans d'amitié déjà ! Merci d'être toujours présentes ! Il s'en est passé des choses depuis l'internat... Que du bonheur ! A nos nombreuses vacances et autres moments passés ensemble ! Merci à ma Ju d'être venue de nombreuses fois passer un peu de temps à Toulouse ! Ma Crottie, je suis si fière et heureuse de t'avoir comme amie ! Delph, aux moments inoubliables passés dans ta Normandie natale !

A mes profs de Lycée et de BTS, qui ont joué un rôle important dans mes choix,

Merci à Nathalie Meutelet, à Emmanuel Rochoux, à Isabelle Pouant et Corinne Rigaux.

A ma famille, ces personnes chères à mon cœur,

A Mélo, cette petite boule de poils réconfortante !

Merci petit chat, d'apporter de la douceur et du réconfort, tu es si mignon !

A ma belle-famille, Tahar, Sophie et Julien des personnes très généreuses, avec le cœur sur la main

Merci pour les moments que nous avons partagé ces quatre dernières années, pour votre curiosité à l'égard de mon travail, merci pour les moments d'évasion dans le Médoc et le bon vin bordelais !

A mes cousins, cousines, oncles et tantes,

Merci pour tous vos encouragements, et merci pour la jolie famille soudée que nous formons !

A mon oncle, Thierry, qui a toujours le mot pour nous faire rire !

Tu me demandes à chaque fois comment vont mes mouches et ce que je fais avec elle, merci tonton pour ton intérêt. Merci, aussi pour ton excentricité qui fait de toi une personne unique.

A, ma grand-mère, Josette

Je n'ai manqué aucune occasion pour te rendre visite depuis ces quatre dernières années, ton bien-être est tellement important ! J'essayerai de faire le maximum à l'avenir pour ne pas manquer ces moments si précieux ! Merci mamie, pour toutes ces belles journées que tu m'as offertes.

A mon grand-père Maurice,

J'aurais aimé que tu sois encore là, ta sérénité et ta gentillesse me manque.

A mes grands-parents, Claudette et Denis,

Je tiens à vous remercier pour votre soutien lorsque je faisais mes études à Orléans et à Tours. Il était bon de venir vous rendre visite le weekend, de retrouver une ambiance familiale. Sans vous ma vie d'étudiante n'aurait pas eu la même saveur. Aux souvenirs de nos nombreux voyages en caravane à travers les beaux paysages français !

A mon frère adoré, Erwan

Erwan, merci d'être toujours là dans les bons comme dans les moments les plus difficiles ! J'ai beaucoup de chance de t'avoir comme frère, nous avons toujours des conversations très passionnantes ! Merci pour tout ton soutien si important.

A mes parents, Claude et Sylvie,

Papa, maman, je vous dois tout. Vous êtes les plus grands acteurs de ma réussite, je ne vous remercierai jamais assez d'être de si bons parents. Merci, de m'avoir transmis ces valeurs si chères à mon cœur : la tolérance, le respect, la solidarité, les valeurs de la famille, la valeur du travail et pleins d'autres encore.

Maman, tu nous fais tellement rire, merci pour ta joie de vivre en toutes circonstances ! Merci, pour ta grande générosité, ton soutien et ta gentillesse !

Papa, merci pour ton soutien, pour m'avoir transmis le goût de l'effort, du dépassement de soi, la patience et le sens du sacrifice. Des qualités utiles pour mon travail et ma vie personnelle.

Merci tout simplement pour votre amour

A Laura, qui partage mon quotidien,

Laura, grâce à toi j'ai repensé ma philosophie de vie, nous avons grandi et j'en suis si fière ! Je tiens à te remercier d'avoir été là chaque jour, surtout ces derniers jours où tu as vécu la thèse plus que jamais ! Merci pour ta grande patience, pour ton humour, pour ton grand cœur et pour ton amour. Je suis heureuse de t'avoir rencontré, tu as tellement enrichi ma vie ! Je tiens aussi à te remercier de m'avoir permis de m'évader dans ce monde imaginaire qui te passionne (les Funko, les comics, Star wars...). Merci pour toutes ces choses que tu m'as fait découvrir, de m'avoir incité à reprendre la course à pied. Cela m'a été très bénéfique pour le travail et la vie personnelle, sans toi, je ne pense pas que j'aurais tenté de faire un semi-marathon. Je n'y avais même jamais pensé, maintenant j'envisage de faire un marathon. Qui sait, peut-être celui de New-York... J'ai hâte de commencer notre nouvelle aventure à l'étranger.

A notre amour, à nos projets de vie...

«... l'organisme vivant n'acquiert pas toujours du premier coup la forme particulière qui caractérise l'espèce. Dans bien des cas, le développement comporte de singuliers détours, et l'individu doit traverser, avant de parvenir à l'état adulte, une série de stades transitoires qui, pour ainsi dire, superposent plusieurs êtres dans la durée. »

J. ROSTAND, *La Vie et ses problèmes*. 1939, p. 46.

« Do we understand development ? »

L. Wolpert, 1994

Table des matières

AVANT PROPOS	1
INTRODUCTION	7
I. Les tissus épithéliaux.....	9
II. La boîte à outil cellulaire pour le remodelage des épithéliums.....	11
2.1. Le cytosquelette.....	11
2.1.1. Les microtubules dans les cellules épithéliales.....	13
2.1.2. L'acto-myosine.....	19
2.1.2.1. L'actine.....	19
2.1.2.2. La myosine II non musculaire, le générateur de force.....	23
2.2. Les éléments d'ancrage cellulaire nécessaires aux épithéliums.....	27
2.2.1. La cohésion du groupe : les jonctions.....	29
2.2.1.1. Le complexe protéique des jonctions adhérentes.....	31
2.2.1.2. La régulation des jonctions adhérentes.....	35
2.2.2. L'adhésion basale.....	37
2.2.2.1. La matrice extracellulaire.....	39
2.2.2.2. Le complexe protéique des adhésions basales.....	41
2.2.2.3. La régulation des adhésions basales.....	45
2.2.3. La transmission des forces par les différents complexes d'adhérence.....	47
III. Et le noyau dans tout ça ?	55
3.1. Généralités sur le noyau.....	55
3.2. Les molécules impliquées dans la transmission des forces au noyau.....	57
3.2.1. Le nucléosquelette de Lamines.....	57
3.2.2. Le complexe LINC forme un pont entre le cytosquelette et le nucléosquelette.....	61
3.3. Le noyau prend sa place : le positionnement nucléaire.....	65
3.3.1. Le repositionnement nucléaire dépendant du LINC.....	65
3.3.2. Le LINC parfois dispensable.....	69
3.4. Le noyau sensible à la force.....	71
3.4.1. Les forces qui déforment le noyau.....	71
3.4.2. La mécano-transduction nucléaire.....	79
IV. Les forces mécaniques au service de la morphogenèse.....	83
4.1. Les forces planaires dans la morphogenèse épithéliale.....	83

4.1.1.	L'intercalation cellulaire : l'allongement d'un épithélium en 2D grâce à la polarité de la myosine.....	85
4.1.2.	L'invagination : la constriction apicale initiatrice d'un changement de forme en 3D.....	87
4.2.	Les forces apico-basales.	95
V.	La patte fait mouche !	97
VI.	La mort au service de la morphogenèse.....	101
6.1.	L'apoptose, c'est quoi ?.....	101
6.1.1.	La découverte de l'apoptose.....	101
6.1.2.	La cascade apoptotique.....	103
6.1.3.	Les changements morphologiques des cellules mourantes.....	105
6.1.4.	L'extrusion des cellules apoptotiques.....	111
6.2.	Morphogenèse apoptose-dépendante.....	113
6.2.1.	Une mort parfois silencieuse : créer une forme en éliminant les cellules en excès.....	115
6.2.2.	Le dernier mot avant la mort : l'apoptose influence son environnement.....	115
6.2.3.	La force de la mort : l'apoptose influence son environnement par la force.....	119
	PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	129
	RESULTATS.....	133
I.	Observer la mort en direct !.....	137
	A FLUORESCENT TOOLKIT FOR SPATIOTEMPORAL TRACKING OF APOPTOTIC CELLS IN LIVING <i>DROSOPHILA</i> TISSUES.....	141
II.	Un nouveau mécanisme de génération de force apico-basale par les cellules apoptotiques lors de la morphogenèse.....	143
	MECHANICAL FUNCTION OF THE NUCLEUS IN FORCE GENERATION DURING EPITHELIAL MORPHOGENESIS.....	145
III.	Une nouvelle étape dans le processus apoptotique : la relocalisation nucléaire.....	147
3.1.	Vers un processus actif.....	147
3.2.	Où est le moins ? Où est le plus ? Trouvez-les dans la patte de drosophile.	151
3.3.	Un modèle qui se dessine.....	153
3.3.1.	La relocalisation du noyau dans les cellules pas encore tout à fait mortes.....	153
3.3.2.	Des allers et venues en permanence dans les cellules non mourantes !.....	155
3.4.	Conclusion.....	157

IV. Une fin en mille morceaux !	159
4.1. La dernière danse : la dynamique de l'enveloppe nucléaire lors des phases tardives de l'apoptose.....	161
4.2. Un réseau destructeur d'acto-myosine péri- et intranucléaire.	163
4.3. Conclusion.	165
CONCLUSION ET DISCUSSION.....	167
I. C'est trop dense ! Qui est à qui ?.....	169
II. Les noyaux à la bonne place.	175
2.1. Tous en haut !.....	175
2.2. La descente en rappel du noyau.	175
III. Les mystères de la force apico-basale générée par les cellules mourantes.	177
3.1. Par quel mécanisme le noyau est-il ancré au basal ?	179
3.2. L'ancrage basal du noyau et la formation du câble de Myosine sont-ils des évènements simultanés ou séquentiels ?.....	183
3.3. La rencontre du noyau avec le câble de myosine.....	185
3.3.1. L'émergence du câble de myosine.....	185
3.3.2. L'attraction du câble de myosine pour le noyau.....	187
3.4. Le noyau, résistance de la force : un nouveau rôle du noyau.	189
3.5. Le côté obscur de la force : La force apico-basale est-elle requise pour la fragmentation nucléaire ?	193
IV. Que la force soit avec toi, toujours !.....	199
V. Revisiter l'invagination.	199
MATERIELS ET METHODES	207
ANNEXES.....	215
BIBLIOGRAPHIE.....	217

Table des figures

Figure 1. La diversité des formes et leur origine.	2
Figure 2. Les différents types d'épithélium de revêtements.	8
Figure 3. Les différents types de cytosquelette.	10
Figure 4. Les microtubules et leurs régulateurs.	12
Figure 5. Polarité des microtubules centrosomaux et non-centrosomaux dans une cellule épithéliale.	14
Figure 6. Le transport antérograde et rétrograde le long des microtubules.	16
Figure 7. Schémas simplifiés des complexes Dynéine/Dynactine et Kinésine.	17
Figure 8. Le cycle de régulation de la formation des filaments d'actine.	18
Figure 9. L'organisation de l'actine.	20
Figure 10. Structure, régulation et formation des minifilaments de Myosine.	22
Figure 11. La contraction des réseaux d'acto-myosine. Corrigé.	24
Figure 12. Les différents types de jonction d'une cellule épithéliale.	28
Figure 13. Schéma de la structure, de l'organisation et de la régulation des jonctions adhérentes.	30
Figure 14. L'activation et la mécano-transduction des complexes d'adhérence basale.	32
Figure 15. Les biosenseurs de force basés sur le FRET.	48
Figure 16. Représentation schématique du déploiement d'une protéine sensible à la force détecté avec des pincettes magnétiques.	52
Figure 17. Schéma général de l'organisation du noyau.	56
Figure 18. Schéma du complexe LINC.	60
Figure 19. Différents processus de relocalisation nucléaire dépendant du LINC.	64
Figure 20. Différents processus de relocalisation nucléaire indépendant du LINC dans la chambre ovarienne de la drosophile.	68
Figure 21. Mesure de la rigidité du noyau par aspiration.	72
Figure 22. La compression du noyau provoque une rupture de l'enveloppe nucléaire.	74
Figure 23. Les forces externes sont transmises, ressenties et intégrées par le noyau.	78
Figure 24. Le mini-Nesprin2G : l'outil pour mesurer la tension transmise au complexe LINC.	80
Figure 25. Changement de forme en 2D d'un épithélium causé par l'intercalation cellulaire.	84
Figure 26. Acquisition d'une forme en 3D.	86
Figure 27. Différents processus de constriction apicale dépendants de l'acto-myosine.	88
Figure 28. Schéma de l'invagination du mésoderme de l'embryon de drosophile.	90
Figure 29. Schéma de l'invagination de l'endoderme de l'embryon d'ascidie.	94
Figure 30. Développement de la patte de drosophile.	96
Figure 31. Modèle de régulation de la formation des plis des tarsi.	98
Figure 32. Les changements morphologiques de la cellule apoptotique.	100
Figure 33. La cascade apoptotique, un processus conservé entre différentes espèces.	102
Figure 34. Mécanisme de fragmentation nucléaire en culture cellulaire.	106
Figure 35. Le bourgeonnement cellulaire au cours de l'apoptose.	108

Figure 36. Dynamique des microtubules lors de l'apoptose.....	110
Figure 37. L'extrusion des cellules apoptotiques de l'épithélium.	112
Figure 38. L'apoptose « silencieuse » sculpte le vivant grâce à la simple élimination simple de cellules ou tissus par apoptose.	114
Figure 39. L'apoptose influence son environnement par la libération de molécules biochimiques.....	116
Figure 40. L'apoptose participe à l'invagination de tube neural.	118
Figure 41. L'apoptose participe à la fermeture dorsale en créant des forces planaires.....	120
Figure 42. L'apoptose génère une force apico-basale conduisant à la formation d'un pli.	124
Figure 43. Problématique.	130
Figure 44. Localisation basale du noyau avant la construction apicale.	148
Figure 45. La perte de fonction de MSP300 ne perturbe pas le positionnement des noyaux dans la patte de drosophile.....	150
Figure 46. L'organisation des microtubules dans l'épithélium de patte.	152
Figure 47. Hypothèse du rôle de Klarsicht dans la relocalisation du noyau des cellules apoptotiques.....	154
Figure 48. Les protéines motrices sont requises pour la localisation des noyaux dans l'épithélium de patte.	156
Figure 49. Modèle spéculatif de la régulation du positionnement nucléaire.	158
Figure 50. La dynamique de l'enveloppe nucléaire au cours des phases tardives de l'apoptose.....	160
Figure 51. La dynamique de la cellule mourante lors des phases tardives.	162
Figure 52. Un réseau d'acto-myosine autour et dans le noyau mourant.....	164
Figure 53. Un modèle de génération de forces apico-basales et de dynamique apoptotique.	168
Figure 54. Un outil reposant sur le principe du BiFC pour visualiser le noyau uniquement dans les cellules apoptotiques.	172
Figure 55. Un outil reposant sur le principe du BiFC pour visualiser les microtubules uniquement dans les cellules apoptotiques.....	173
Figure 56. Hypothèse de relocalisation basale du noyau médié par les caspases.	176
Figure 57. Le mécanisme d'ancrage basal de noyau.	178
Figure 58. L'actine et la Lamine pourraient ancrer le noyau au basal.	180
Figure 59. La formation du câble : recyclage de l'acto-myosine apicale ou création d'un réseau d'acto- myosine <i>de novo</i> ?	184
Figure 60. Nature du lien physique entre le câble de Myosine et l'ancrage du noyau.	188
Figure 61. Modèle spéculatif du rôle de résistance du noyau lors de la force apico-basale générée par la cellule apoptotique.....	190
Figure 62. Le câble de Myosine pourrait participer à la fragmentation du noyau apoptotique.....	192
Figure 63. Modèle spéculatif de la fragmentation nucléaire.....	194
Figure 64. Modèle de la force apico-basale lors de l'invagination du Mésoderme de drosophile.	202
Figure 65. La formation de tubes.....	203

Figure 66. Est-ce que des câbles de myosine apico-basale se forment dans les cellules de la future glande salivaire ?..... 204

AVANT PROPOS

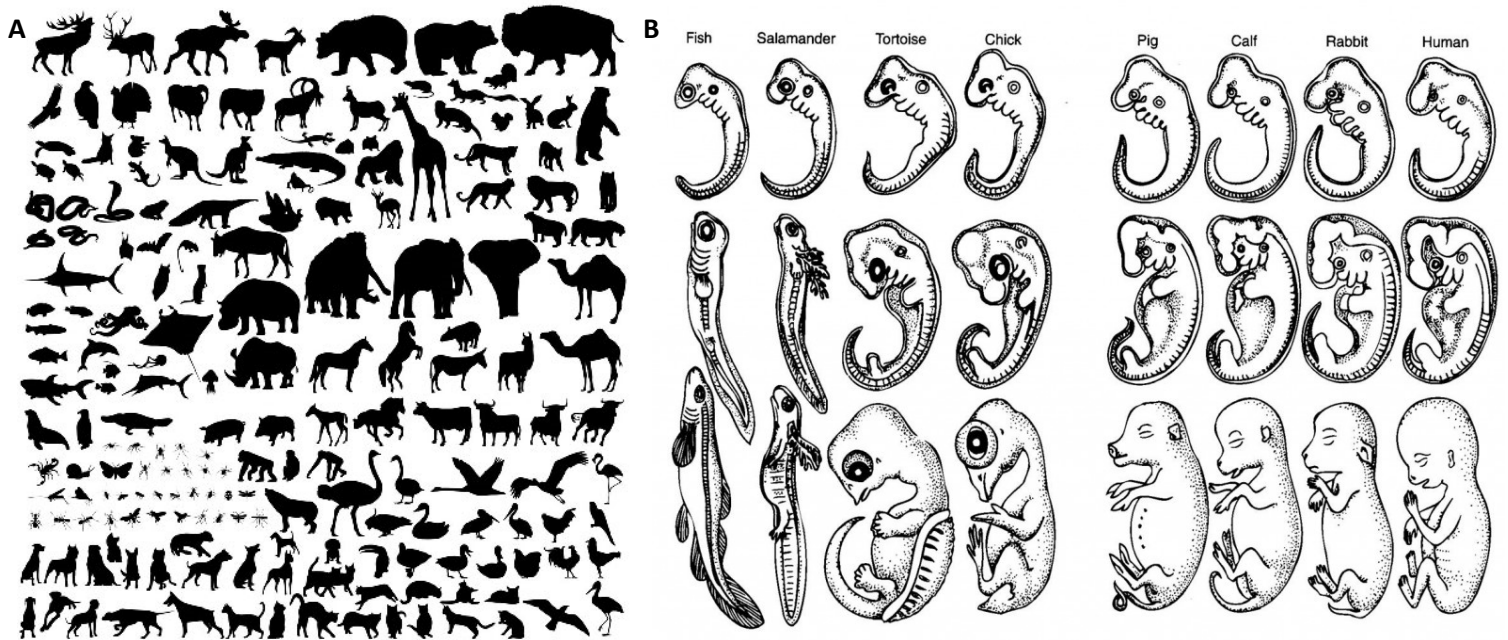


Figure 1. La diversité des formes et leur origine.

(A) Chaque espèce se caractérise et est reconnaissable par sa forme. (B) Loi de Von Baer. Les premiers stades de la vie sont similaires d'une espèce à l'autre. Puis, au cours du développement, les embryons acquièrent des caractères spéciaux propres à chaque espèce, les différenciant les unes des autres. L'individu adulte aura donc une forme caractéristique de son espèce. La morphogenèse est le processus qui régit tous les changements morphologiques au cours du développement

La naissance des formes.

Le monde qui nous entoure abrite des formes diverses et variées, inertes ou vivantes. Il semble y avoir autant d'espèces vivantes que de formes sur notre planète (**figure 1A**). Ce constat fascine l'Homme depuis bien des siècles. C'est en effet l'une des grandes interrogations de l'Homme : pourquoi et comment les êtres vivants peuvent-ils avoir des formes aussi différentes d'une espèce à l'autre et en même temps très conservées au sein d'une même espèce ? Depuis l'antiquité les scientifiques tentent d'élucider cette question fondamentale, à travers l'étude de la phylogénie et du développement des organismes. Deux théories ont été opposées : la théorie de la préformation par Nicolas Hartsoeker en 1694 (l'individu est initialement présent dans l'œuf et grandit pour donner un individu adulte) et celle d'Aristote (V^{ème} siècle avant notre ère) qui propose que de nouvelles structures apparaissent au fur et à mesure du développement. C'est la théorie de l'épigenèse, qui sera ensuite retenue grâce à l'identification que tout être vivant est constitué de cellules (Theodor Schwann et Mathias Schleiden en 1839) et que ces cellules sont les filles d'une même cellule mère, la cellule œuf (Rudolf Virchow en 1858). Karl Ernst Von Bear, pionnier de l'embryologie avec la découverte de la cellule œuf, décrit et compare dans son ouvrage *Histoire du développement des animaux* (1828), le développement embryonnaire de différentes espèces et en tire la conclusion que le début de l'embryogénèse est similaire entre différentes espèces animales et diverge ensuite avec la diversification des cellules. Mais comment une cellule unique peut donner naissance à des individus de morphologies si différentes (**figure 1B**)?

La morphogénèse est un terme grec qui signifie l'origine (-génèse) des formes (morpho-). En biologie, ce terme définit les concepts permettant à un organisme d'acquérir sa forme définitive. C'est un processus très complexe qui regroupe plusieurs phénomènes biologiques. La biologie moléculaire et la génétique ont permis une avancée majeure dans la compréhension de la biologie du développement. Notamment, la découverte chez la drosophile des gènes impliqués dans la segmentation précoce de l'organisme a été un tremplin dans la compréhension de la morphogénèse (Nüsslein-Volhard and Wieschaus 1980). La morphogénèse est ainsi régie par l'expression de gènes finement régulés dans l'espace et le temps au cours du développement. Mais il a aussi été montré que l'organisme peut être soumis à des forces physiques. C'est en 1917, avec son livre « *On growth and form* » que

d'Arcy Thompson établit un lien entre la forme biologique et les forces physiques. Cependant, l'étude de l'influence des forces physiques a été développée bien plus tard car les techniques de l'époque étaient limitées. Ainsi, c'est à la fin du XX^{ème} siècle que les forces physiques dans le vivant reprennent une place importante pour la communauté scientifique. Aujourd'hui, nous cherchons encore à comprendre les liens entre génétique et forces physiques.

L'ensemble de toutes ces grandes découvertes met en lumière que la morphogénèse nécessite des réarrangements cellulaires et tissulaires extrêmement contrôlés dans le temps et l'espace pour *in fine* créer des organes de formes différentes, importantes pour leur fonction. Aujourd'hui la compréhension de la morphogénèse reste un domaine de recherche d'actualité. D'autant plus que le progrès technique ne cesse de croître. Par exemple, la vidéo-microscopie confocale nous offre la possibilité de visualiser la dynamique des processus morphogénétiques, notamment, à travers l'étude des réarrangements des tissus épithéliaux, ce qui peut nous aider à mieux comprendre par quels mécanismes cellulaires et moléculaires les forces physiques sont dictées.

INTRODUCTION

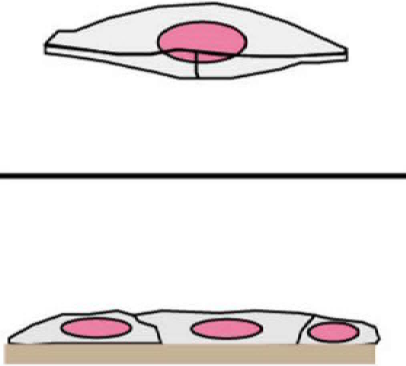
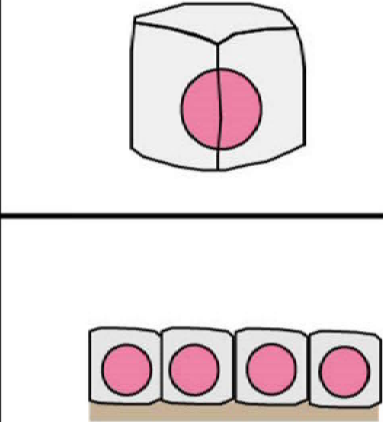
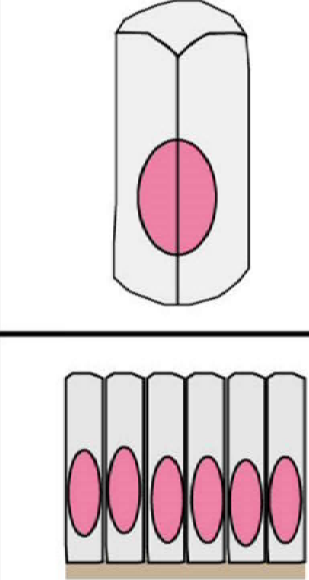
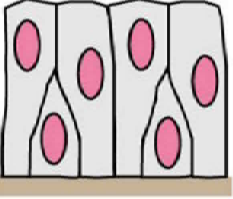
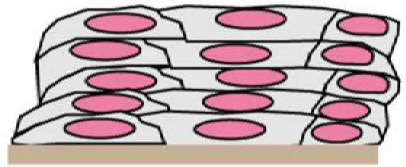
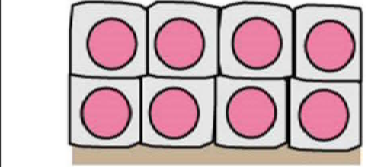
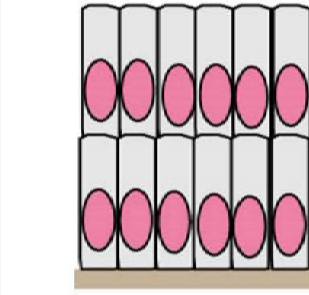
		formes des cellules épithéliales			
		squameux	cubique	en colonne	
nombre de couches cellulaires	simple				
	stratifié				

Figure 2. Les différents types d'épithélium de revêtements.

∞ Le noyau est représenté en rose.

I. Les tissus épithéliaux.

L'organisme d'un animal est constitué de groupes de cellules différenciées qui forment ce que l'on appelle un tissu. Il existe quatre types de tissu chez l'animal : les tissus nerveux, les tissus musculaires, les tissus conjonctifs et les tissus épithéliaux. C'est ce dernier type qui m'a particulièrement intéressée au cours de mon travail de thèse.

Commençons par une simple définition de ce qu'est un tissu épithélial.

Les épithéliums sont des tissus formés par des cellules spécialisées, juxtaposées et étroitement liées les unes aux autres formant ainsi une barrière imperméable. Cet ensemble de cellules repose sur le tissu conjonctif jouant un rôle de soutien aux épithéliums. Il existe deux types d'épithélium. Le premier regroupe les épithéliums glandulaires formant les différentes glandes de l'organisme, ils sont composés d'amas de cellules aux propriétés sécrétrices. Le second type, objet de mon étude, constitue les épithéliums de revêtements recouvrant la surface et les cavités internes du corps. Ces derniers peuvent être classés selon trois catégories (**Figure 2**)(Lowe and Anderson 2015) :

- Le nombre de couches de cellules : les épithéliums simples composés d'une seule couche de cellules ; les épithéliums pseudostratifiés composés d'une seule couche de cellules mais qui semblent en posséder plusieurs du fait que les noyaux ne sont pas à la même hauteur et que le pôle apical de certaines cellules n'atteint pas toujours la lumière de la cavité ; les épithéliums stratifiés composés de plusieurs couches de cellules superposées les unes aux autres.
- La forme des cellules : cubiques (aussi larges que hautes), squameuses (plus larges que hautes), et en colonne (plus hautes que larges).
- La spécialisation de surface des cellules : présence de cils (cellules des trachées), de microvillosités (les cellules de l'intestin grêle) ou de Kératine (peau).

Ainsi de nombreuses fonctions essentielles sont attribuées aux tissus épithéliaux en fonction de leur morphologie. Ils protègent l'organisme du milieu extérieur (la peau), permettent l'absorption des nutriments (les intestins) ou encore les échanges gazeux (les poumons).

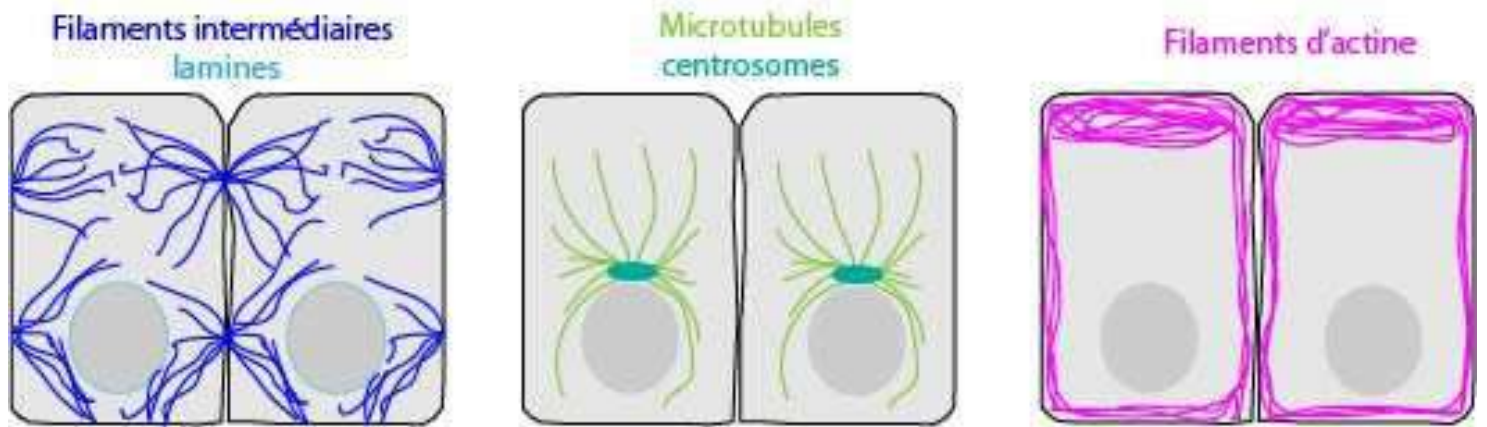


Figure 3. Les différents types de cytosquelette.

L'homéostasie de ces tissus doit donc être très préservée tout au long de la vie de l'individu. Ainsi les cellules vieillissantes et dangereuses sont éliminées par apoptose puis remplacées par division cellulaire, deux processus extrêmement contrôlés.

Au cours du développement, ces tissus vont subir des nombreux remaniements et laisser apparaître des structures de plus en plus complexes et spécialisées. La morphogenèse des épithéliums est un processus indispensable à la maturation d'un organe. Ainsi, pour comprendre ces transformations morphogénétiques, il est important de déterminer comment les cellules s'organisent, car c'est leurs comportements individuel et collectif qui orchestrent le changement de forme des épithéliums.

II. La boîte à outil cellulaire pour le remodelage des épithéliums.

Dans cette partie je vais vous décrire tous les éléments d'une cellule épithéliale qui vont permettre aux épithéliums de changer de forme au cours de la morphogenèse. En effet, la génération, la transmission de forces et la réponse à celles-ci impliquent de nombreuses molécules. Une cellule épithéliale est composée d'une membrane plasmique, délimitant le milieu interne (le cytosol) du milieu externe et pouvant prendre diverses formes. A l'intérieur du cytosol plusieurs organites assurent le bon fonctionnement de la cellule, notamment le noyau qui renferme l'information génétique permettant la synthèse de toutes les protéines constituant la cellule. Parmi ces protéines, certaines s'assemblent pour former le cytosquelette, qui permet le maintien de la forme des cellules ou encore les structures d'adhérences qui permettent la liaison des cellules entre elles ou à la matrice extracellulaire.

2.1. *Le cytosquelette.*

Comme son nom l'indique le cytosquelette est le squelette de la cellule. Il forme la charpente de la cellule, par conséquent c'est lui qui va déterminer sa forme. Les cellules sont, en effet, renforcées par des réseaux de filaments. Dans les cellules eucaryotes, ces réseaux sont formés par trois types de filaments : les microtubules, les fibres d'actine et les filaments intermédiaires (**Figure 3**). Ces molécules étaient considérées comme très stables physiquement mais elles sont en réalité très dynamiques. Elles s'assemblent et se désassemblent en fonction des besoins de la cellule. Cette dynamique est essentielle à la

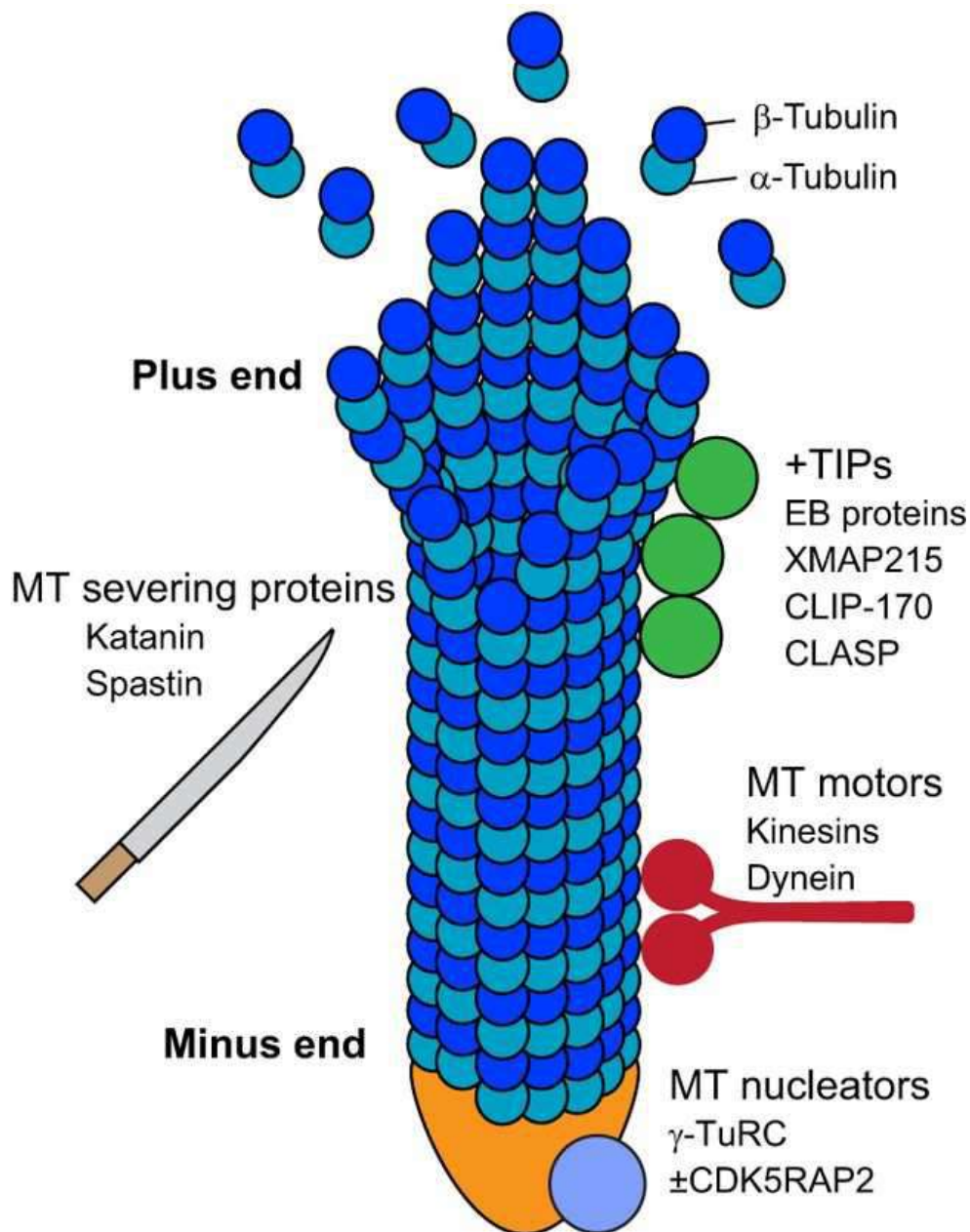


Figure 4. Les microtubules et leurs régulateurs.

Les microtubules sont formés par l'assemblage d'une sous-unité β -Tubuline et d'une sous-unité α -Tubuline. La nucléation est initiée à l'extrémité (-), notamment par le α -TuRC. Les microtubules vont former des protofilaments stables à leur extrémité (-). Les régulateurs des microtubules vont soit favoriser leur polymérisation à l'extrémité (+) (e.g. « les +TIPs ») soit leur désassemblage (les enzymes de coupure). Tiré de (Muroyama and Lechler 2017).

migration, la division ou encore au changement de forme de la cellule. Chaque type de cytosquelette a des fonctions et une régulation propre au cours de la vie d'une cellule (Alberlts et al. 2019, Bolsover et al. 2006). Ils sont très conservés bien que les drosophiles n'aient pas de filaments intermédiaires.

2.1.1. Les microtubules dans les cellules épithéliales.

Les microtubules ont pour unité fonctionnelle les dimères d' α -tubuline et de β -tubuline. Ces dimères vont s'assembler pour former des protofilaments dont l'enchaînement formera des faisceaux creux plus ou moins longs. En effet, les microtubules sont des structures extrêmement dynamiques qui se polymérisent et dépolymérisent constamment en fonction des besoins de la cellule. Ils sont associés à de nombreuses fonctions telles que la division cellulaire, le maintien de la forme des cellules et le transport intracellulaire. Les microtubules sont des structures polarisées ayant une extrémité négative (-) et à l'opposé une extrémité positive (+). L'extrémité (-) des microtubules est relativement stable contrairement à l'extrémité (+). En effet, afin de réguler leur dynamique, les microtubules sont associés à de nombreuses protéines, les MAP (« Microtubules Associated Protein ») (Hohmann and Dehghani 2019) (**Figure 4**). Les MAP qui stabilisent les microtubules vont être essentiellement localisées le long des microtubules. En revanche, les protéines régulant la polymérisation et la dépolymérisation vont être concentrées à l'extrémité (+) (Muroyama and Lechler 2017). Par exemple, les « End-Binding » (EB), telle que EB1, sont des protéines qui assurent la polymérisation des microtubules à l'extrémité (+) (Mustyatsa et al. 2017, Nehlig et al. 2017, Maurer et al. 2014). Au contraire, la Spastine est une enzyme de cassure (« Microtubule-severing Enzyme ») permettant de tronquer les microtubules afin de les désassembler (Hohmann and Dehghani 2019). Ainsi, les microtubules grandissent puis se détruisent régulièrement.

Dans les épithéliums, il existe deux types de microtubules. Les microtubules associés à leur centre organisateur, les centrosomes, et les microtubules non-centrosomaux, mis en évidence plus récemment (Muroyama and Lechler 2017, Toya and Takeichi 2016). Les microtubules centrosomaux sont associés par leur extrémité (-) à leur centre organisateur. En revanche, les microtubules non-centrosomaux ont leur extrémité (-) localisée et, parfois, ancrée (du moins dans l'oocyte de la drosophile) au pôle apical de la cellule indépendamment des centrosomes

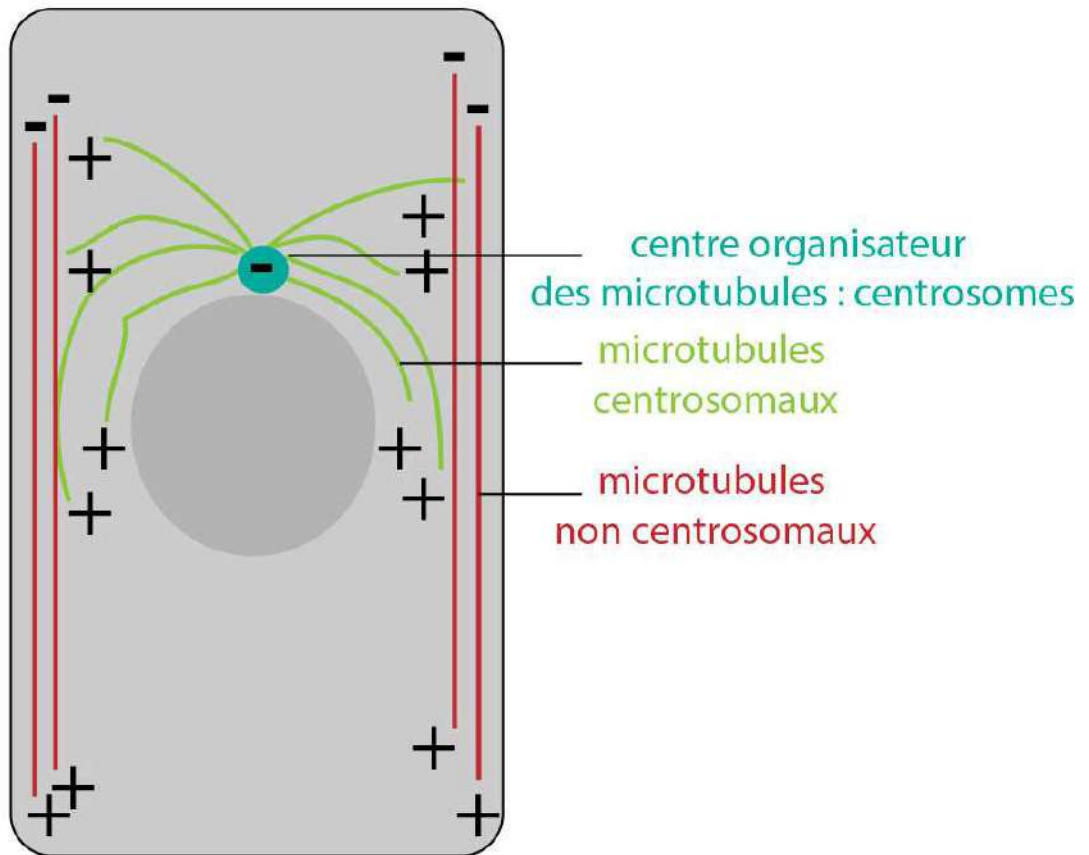


Figure 5. Polarité des microtubules centrosomaux et non-centrosomaux dans une cellule épithéliale.

(Nashchekin, Fernandes and St Johnston 2016), leur extrémité (+) se dirigeant vers le pôle basal. Ces derniers forment des faisceaux parallèles le long de l'axe apico-basal (Toya et al. 2016, Bacallao et al. 1989, Jankovics and Brunner 2006) (**Figure 5**).

Cette polarité est une caractéristique importante puisqu'elle va être utilisée pour le transport intracellulaire. En effet, les microtubules vont former comme des voies de circulation pour assurer le trafic de cargos à l'intérieur de la cellule. La cellule met en place cette stratégie pour déplacer des éléments cellulaires tels que des vésicules (d'endo-/exocytose) ou des organites (noyau, appareil de Golgi) afin qu'ils soient localisés au bon endroit, au bon moment. Des protéines spécialisées, appelées protéines motrices, vont donc utiliser les microtubules tels des rails pour le transport de leurs cargos. Il existe deux catégories de protéines motrices, celles allant de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) et inversement celles allant de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) (Vale et al. 1985b) (**Figure 6**).

Les Dynéines sont les protéines motrices qui se déplacent du (+) vers le (-) (**Figure 6-7**). Elles sont composées d'une chaîne lourde comprenant un domaine moteur et le site de liaison des microtubules. Elles ont aussi une queue qui va permettre la dimérisation, le recrutement de régulateurs et de lier le cargo à transporter. Le domaine moteur va, lui, garantir le déplacement du complexe sur les microtubules grâce à sa fonction ATPase. En effet, c'est l'hydrolyse de l'ATP qui va fournir l'énergie au moteur afin de pouvoir se déplacer, comme s'il « marchait » le long du microtubule (Cianfrocco et al. 2015). Cependant, ce n'est pas suffisant pour que la Dynéine soit active, des activateurs additionnels sont essentiels à son fonctionnement. En effet, elle forme un complexe de six protéines différentes. La Dynactine, est un complexe régulateur indispensable à l'activité de la protéine motrice (Gill et al. 1991, Whited et al. 2004). La Dynactine est considérée comme un cofacteur de la Dynéine, lui permettant de se lier à son cargo (Waterman-Storer et al. 1997) et d'optimiser son déplacement (King and Schroer 2000). Glued, l'orthologue de la Dynactine chez la drosophile, est également important pour le fonctionnement de la Dynéine chez cet organisme (McGrail et al. 1995).

Les kinésines forment, au contraire, des dimères allant du (-) vers le (+) (Vale, Reese and Sheetz 1985a, Hirokawa et al. 1991) (**Figure 6-7**). Leur structure est proche de celle des Dynéines. En effet, elles possèdent aussi des moteurs catalytiques de l'ATP (Brady 1985) au niveau de leurs chaînes lourdes (« Kinesin Heavy Chain », Khc) et une queue formée par les chaînes légères (« Kinesin Light Chain », Klc) afin de lier les cargos et les régulateurs (Gauger

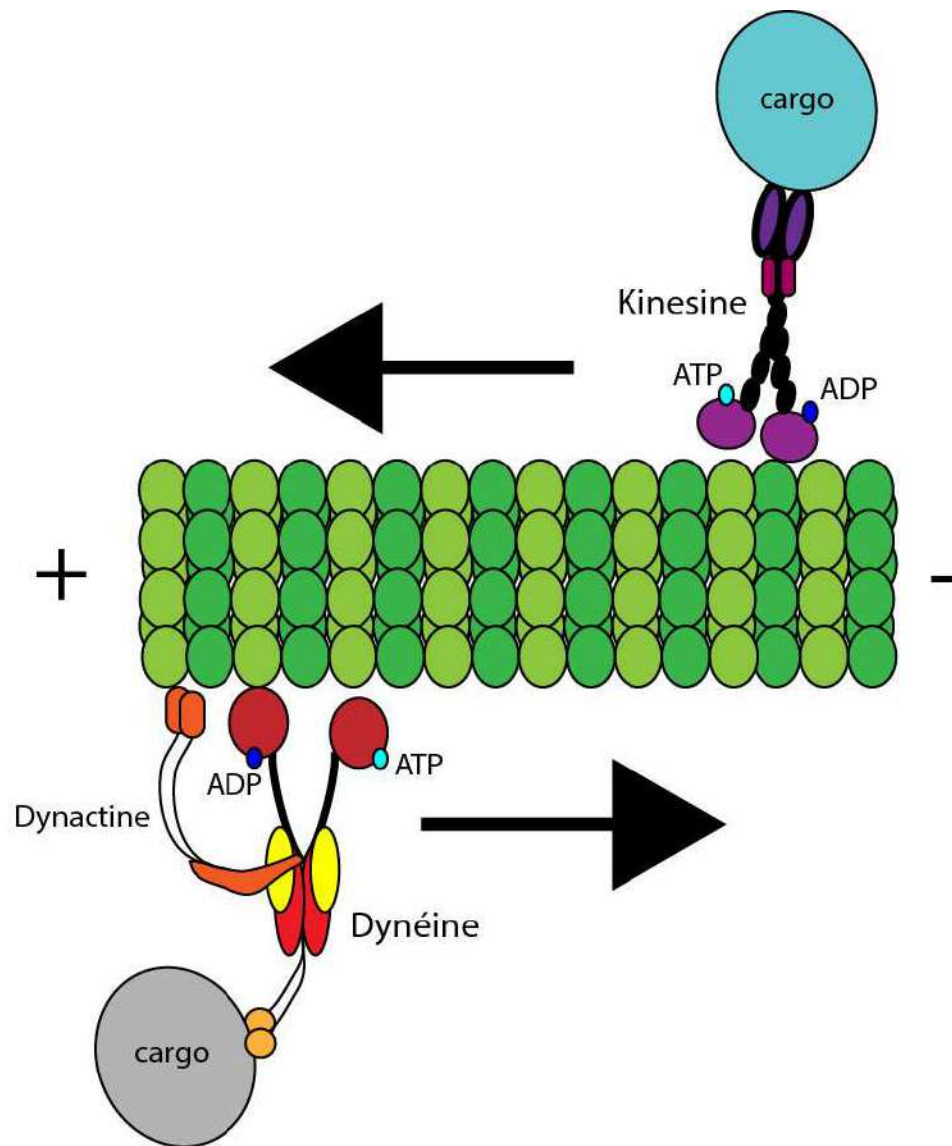


Figure 6. Le transport antérograde et rétrograde le long des microtubules.

La Kinésine transporte son cargo vers l'extrémité (+). Le complexe Dynéine/Dynactine se déplace avec son cargo vers l'extrémité (-) des microtubules. Les deux protéines motrices ont besoin d'ATP pour leur fournir l'énergie nécessaire à leur déplacement.

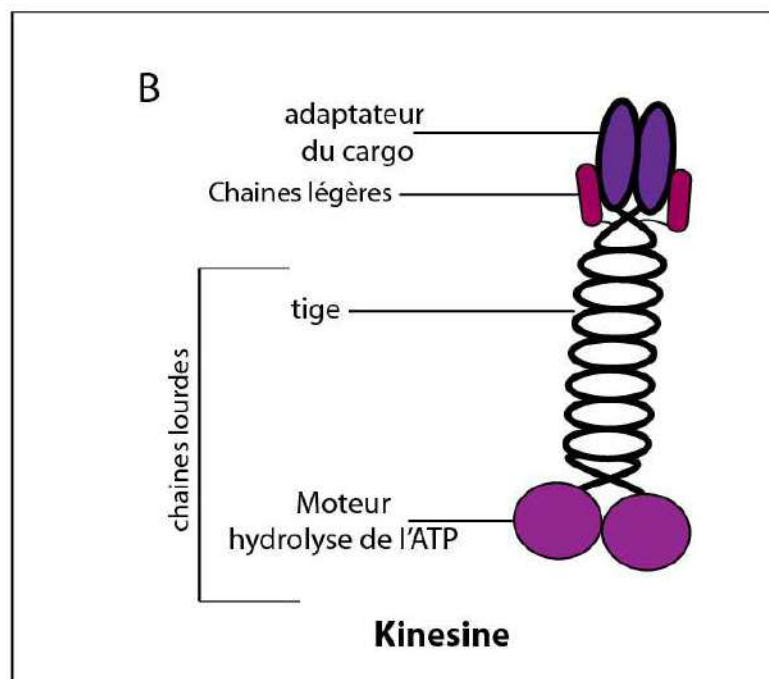
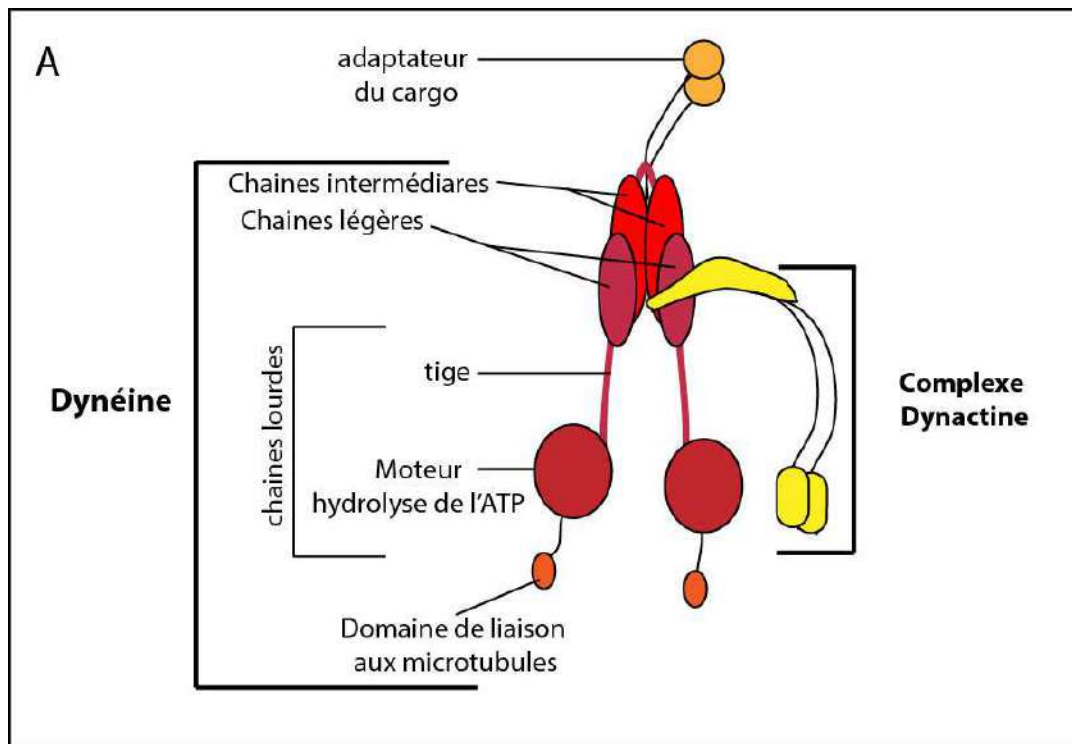


Figure7. Schémas simplifiés des complexes Dynéine/Dynactine et Kinésine.

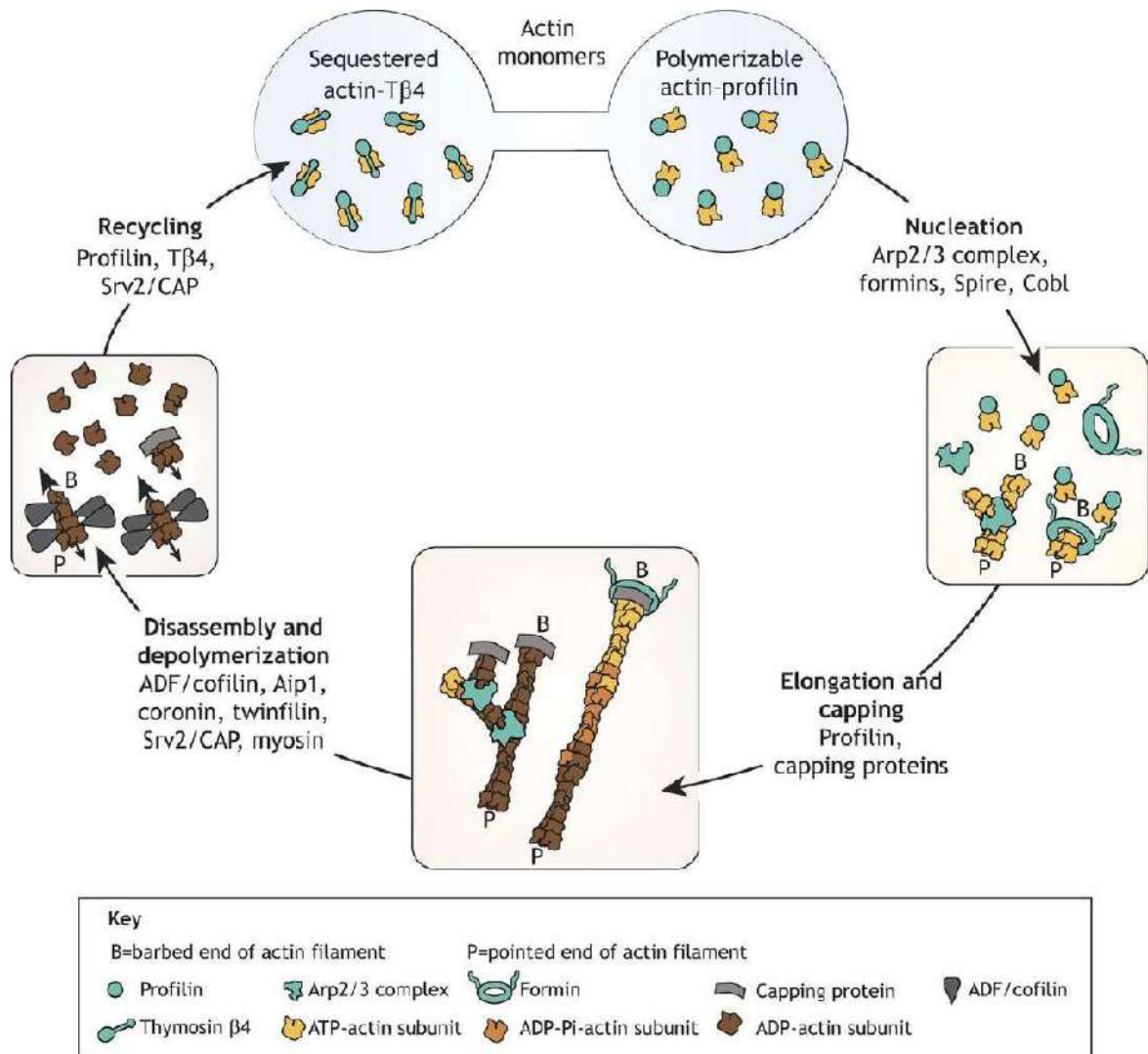


Figure 8. Le cycle de régulation de la formation des filaments d'actine.

L'actine monomérique est séquestrée notamment grâce à l'action de Profiline. La nucléation est initiée par le complexe ARP2/3. Une fois les filaments formés ils peuvent être désassemblés par des molécules telles que ADF/Cofiline, menant au recyclage des monomères. Tiré de (Plastino and Blanchoin 2018).

and Goldstein 1993). Les Klc diffèrent selon les nombreuses kinésines (environ quarante chez les mammifères) conférant la spécificité de liaison aux différents cargos (Hirokawa et al. 2009). Les cargos peuvent être de natures diverses, telles que des vésicules ou organites. Ainsi, chaque Kinésine reconnaît spécifiquement son cargo.

Les protéines motrices ont pour rôle de transporter des vésicules ou des organites pour garantir divers processus tels que l'endocytose, l'exocytose et la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. Par exemple, elles assurent le déplacement du noyau, important lors du développement. Le positionnement des noyaux dans les photorécepteurs composant l'œil du poisson zèbre ou de la drosophile est régulé notamment *via* le complexe moteur formé par la Dynéine et la Dynactine. Une absence des Dynéines ou du complexe Dynactine entraîne un défaut de morphogénèse de l'œil chez ces espèces (Whited et al. 2004, Tsujikawa et al. 2007). Les microtubules et les molécules associées jouent donc un rôle important au cours du développement.

2.1.2. L'acto-myosine.

2.1.2.1. L'actine.

L'actine est un autre type de cytosquelette ayant des propriétés mécaniques différentes de celles des microtubules. Elle est retrouvée sous deux formes dans le cytoplasme. Elle est soit monomérique (G-actine, pour actine globulaire) ou soit sous forme de filament (F-actine pour actine filamenteuse). Les filaments d'actine sont des structures flexibles, moins rigides que les microtubules. Leurs fonctions principales sont le maintien de la forme des cellules, la migration cellulaire, la transmission de forces, l'ancrage des organites et plus rarement le transport d'organites. Les filaments d'actine sont constitués d'un enchainement d'actine monomérique dépendant de la présence d'ATP et de nombreuses protéines régulatrices associées à l'actine (Pollard 2016). La formation des filaments implique, en effet, des mécanismes complexes orchestrés par différentes protéines. La dynamique des filaments nécessite quatre processus (**Figure 8**): la nucléation, l'élongation, le désassemblage et enfin le recyclage (Plastino and Blanchoin 2018). C'est l'enchainement de ces phases qui va permettre à l'actine de former différents réseaux, importants pour la forme, la migration et la transmission de forces à travers la cellule.

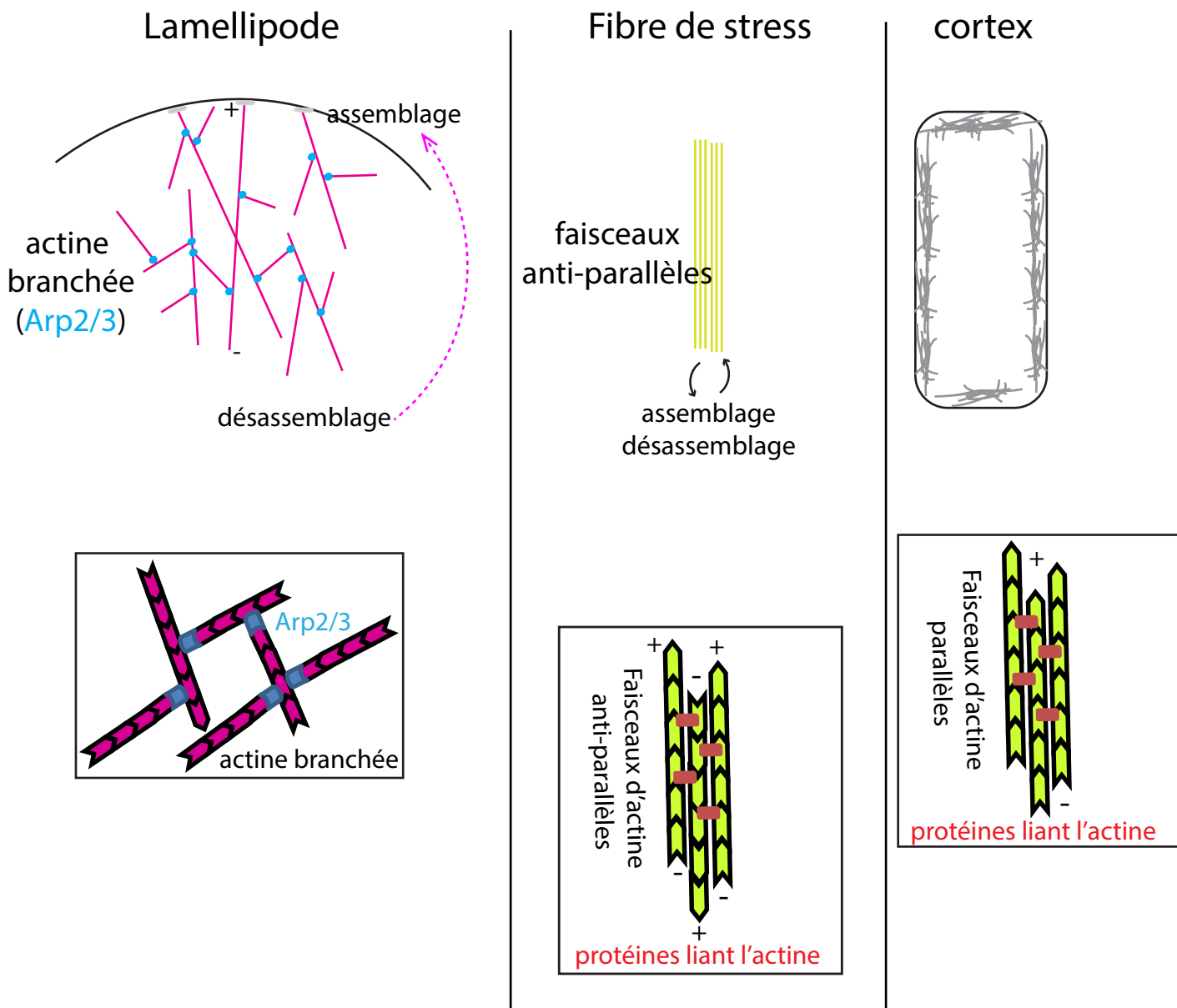


Figure 9. L'organisation de l'actine.

(A) Les lamellipodes sont formés par de l'actine branchée via le complexe Arp2/3. Le désassemblage à l'extrémité (-) et l'assemblage à l'extrémité (+) permettent à la cellule d'avancer lors de la migration cellulaire. **(B)** Lors de la migration, les cellules vont former des fibres de stress par la formation d'un réseau d'actine anti-parallèle. **(C)** La cellule est soutenue par un réseau d'actine sous-jacent la membrane plasmique.

Comment se déroule la formation de filaments ? Afin de former des filaments, les monomères d'actine doivent être liés à l'ATP (Hohmann and Dehghani 2019). Les monomères de G-actine-ADP s'associent à la Profiline, empêchant la formation spontanée de dimères ou de trimères (Pollard and Cooper 1984, Kang, Purich and Southwick 1999) et permettant l'échange d'ADP en ATP (Mockrin and Korn 1980, Vinson et al. 1998) afin de contrôler et promouvoir l'initiation de la nucléation du filament d'actine. La polymérisation de l'actine est ensuite favorisée par les Formines et le complexe Arp2/3 (de l'anglais « Actin-related-protein »). Ces régulateurs vont favoriser la nucléation de la G-actine afin de permettre l'élongation des filaments (Pollard 2016). Les filaments sont polarisés, c'est-à-dire qu'ils possèdent une extrémité (+) où l'ATP est enrichie, favorisant la polymérisation, contrairement à l'extrémité (-) qui est sujette à la dépolymérisation car elle concentre peu d'ATP (Pollard 1986). Le complexe ADF/cofiline, va permettre le désassemblage des filaments d'actine au niveau de l'extrémité (-) (Carlier et al. 1997, Gressin et al. 2015), libérant ainsi des monomères de G-actine -ADP qui seront ensuite recyclés et liés à la Profiline pour être à nouveau polymérisés à l'extrémité (+) ou pour former de nouveaux filaments (Carlier et al. 1997, Rosenblatt et al. 1997, Gressin et al. 2015). L'actine est alors régulée de manière cyclique, c'est le phénomène de « tapis roulant », utilisé lors de la migration des cellules par exemple (Hohmann and Dehghani 2019, Plastino and Blanchoin 2018). En effet, la dynamique de l'actine a été très étudiée lors de la migration de cellules individuelles en culture. Afin de se déplacer la cellule forme ce que l'on appelle des lamellipodes (Abercrombie, Heaysman and Pegrum 1970), où un réseau d'actine dont les extrémités (+) des filaments sont au bord du front de migration, proche de la membrane, alors que les extrémités (-) en sont éloignées. Ainsi, la polymérisation des extrémités (+) va promouvoir le déplacement puisque les filaments grandissent en poussant la membrane plasmique (Hohmann and Dehghani 2019, Carlier et al. 1997). De plus, les filaments d'actine forment au front de migration un réseau d'actine branchée (Svitkina and Borisy 1999, Young, Cooper and Bridgman 2004) (**Figure 9**). C'est l'une des organisations de l'actine qui consiste à réaliser des ramifications de filament. Le complexe Arp2/3, en plus de son rôle dans l'assemblage de l'actine, va favoriser la formation de ramifications sur des filaments d'actine déjà existants (Blanchoin, Pollard and Mullins 2000, Mullins, Heuser and Pollard 1998).

L'actine peut également former des filaments parallèles ou antiparallèles qui vont se lier les uns aux autres dans le sens de la longueur grâce à des protéines liant l'actine tel que l' α -

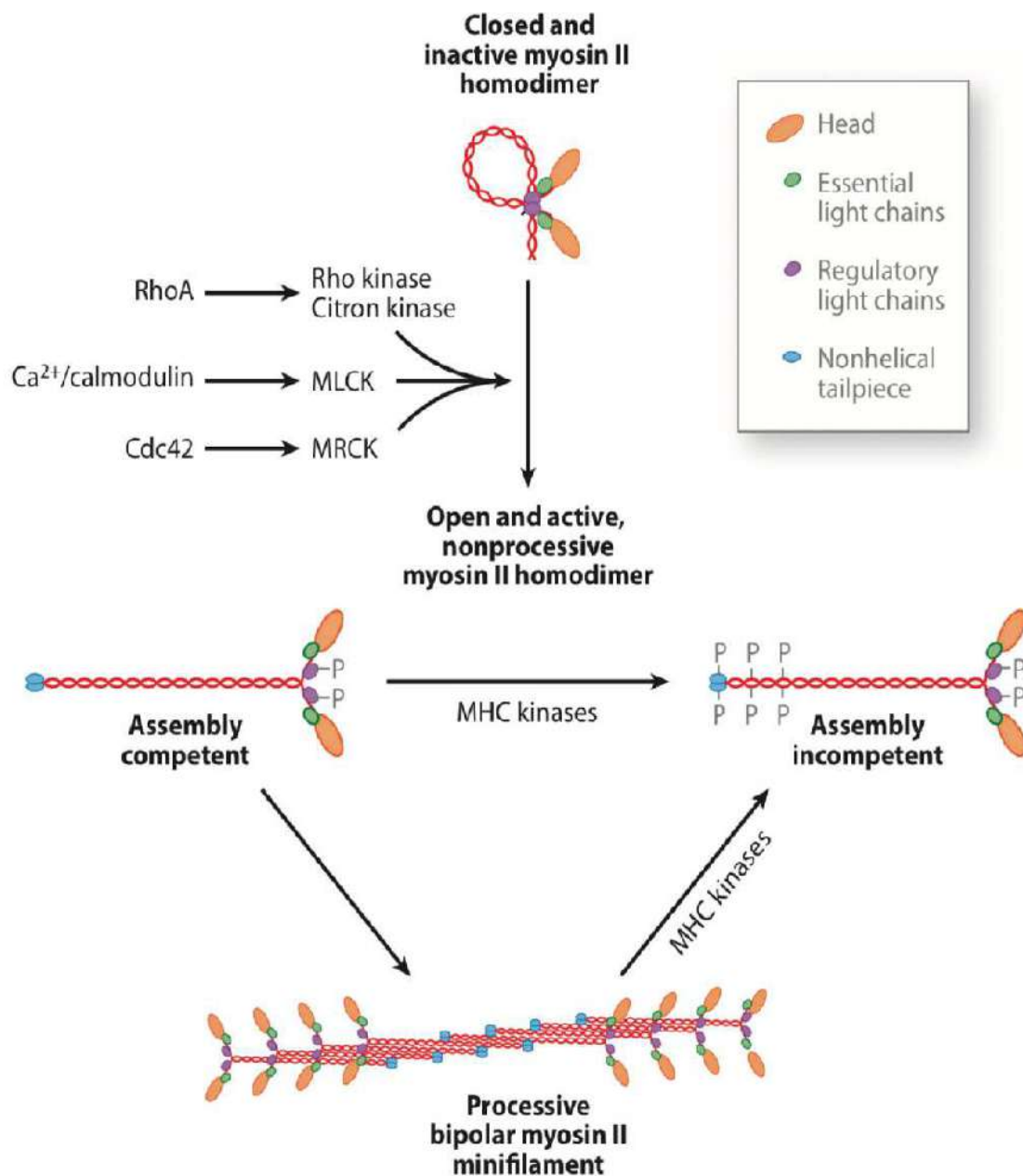


Figure 10. Structure, régulation et formation des minifilaments de Myosine.

La phosphorylation par la kinase de la chaîne légère régulatrice favorise le déploiement d'un homodimère de myosine II. Ainsi, la myosine active peut former des minifilaments. La MHCK (« Myosin Heavy chain ») favorise le désassemblage des minifilaments. MLCK : « myosin light chain kinase », MRCK : myotonia dystrophy-related Cdc42-binding kinase. Tiré de (Lecuit, Lenne and Munro 2011).

Actinine ou la Filamine (Hohmann and Dehghani 2019). Ces types d'organisation vont notamment former le cortex cellulaire et les fibres de stress, réseaux requis pour la forme cellulaire et la transmission de forces (Hohmann and Dehghani 2019) (**Figure 9**). Le cortex cellulaire est un réseau fin de filaments d'actine sous-jacent à la membrane plasmique (Morone et al. 2006). Ainsi, ce réseau maintient la forme de la cellule qui peut être modulée dans le temps, selon le type cellulaire, grâce à la tension à laquelle il peut être soumis (Chugh et al. 2017, Roh-Johnson et al. 2012). Les fibres de stress sont des filaments d'actine sous tension, elles sont formées par des filaments d'actine parallèles et antiparallèles (Kreis and Birchmeier 1980), traversant la cellule, liant les molécules d'adhésion ainsi que le noyau (Ridley and Hall 1992, Braga et al. 1997, Maninova, Caslavsky and Vomastek 2017). Ce sont des fibres contractiles retrouvées dans les cellules non-musculaires. Elles sont importantes pour la diffusion des forces à travers la cellule et à l'extérieur de celle-ci (Hohmann and Dehghani 2019). Cependant, les filaments d'actine seuls n'ont pas de propriété contractile intrinsèque. Pour pouvoir générer les forces nécessaires à la migration, à l'adhésion cellulaire et à la morphogénèse, les filaments d'actine sont généralement couplés à une protéine motrice, la myosine.

2.1.2.2. La myosine II non musculaire, le générateur de force.

Les myosines forment une famille de protéines motrices très étudiée pour leur rôle fondamental dans la contraction cellulaire, notamment dans les muscles. Dans ce type de cellules, la myosine II est associée à l'actine pour former des sarcomères, l'unité fonctionnelle des muscles (lisses et striés). Dans ce cas, la myosine active va provoquer un glissement des filaments d'actine, induisant leur raccourcissement et donc la contraction du muscle (Ojima 2019, Alberlts et al. 2019). De nombreuses maladies connues sous le nom de myopathies sont causées par des mutations de la myosine (Marston 2018).

Dans les cellules épithéliales, les myosines sont également présentes, notamment la myosine II non musculaire, que je nommerai « myosine » pour plus de simplicité dans la suite de mon manuscrit.

Cette myosine forme un hexamère constitué d'un homodimère de deux chaînes lourdes ayant chacune une tête motrice (tête globulaire) et une queue, de deux chaînes légères régulatrices et de deux chaînes légères essentielles (**Figure 10**). Ces hexamères s'associent pour former des minifilaments (Mahajan and Pardee 1996). Comme pour les protéines motrices liées aux

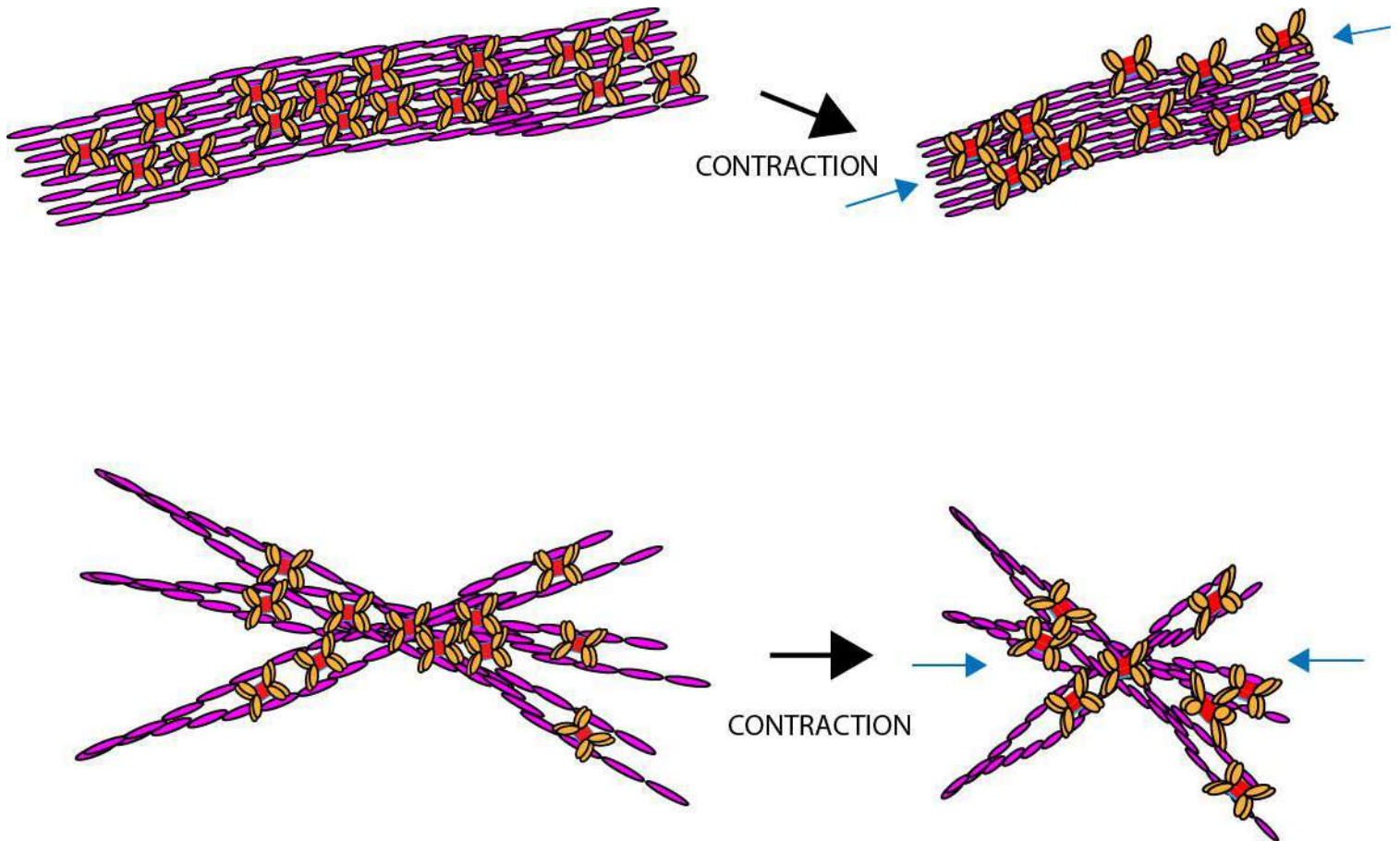


Figure 11. La contraction des réseaux d'acto-myosine.

L'activité motrice de la Myosine (orange) va entraîner une contraction des filaments d'actine (rose) conduisant à leur rétrécissement (flèches bleues), qu'il s'agisse de faisceaux parallèles (haut) ou d'un réseau branché (bas).

microtubules, l'activité de la myosine II dépend de l'ATP, le domaine moteur renferme donc un domaine catalytique ATPase. Les têtes des chaînes lourdes, outre leur domaine moteur, permettent aussi la liaison à l'actine (Rayment et al. 1993). Les chaînes légères régulatrices vont être activées par différents facteurs, permettant d'amplifier l'activité catalytique de la myosine pour l'hydrolyse de l'ATP (Umemoto, Bengur and Sellers 1989). En effet, l'activité de la myosine est finement régulée par diverses voies de signalisation. Notamment par les RhoGTPase, tel que Cdc42, Rac1 et RhoA qui vont activer ROCK, MRCK et PAK, des kinases qui vont spécifiquement phosphoryler les chaînes légères régulatrices permettant l'activité motrice de la myosine. La présence de Ca^{2+} /Calmoduline est également requise pour l'activation de la myosine, en activant la kinase MLCK. Enfin, la myosine est régulée négativement par une myosine phosphatase (MLCP) qui déphosphoryle la chaîne légère régulatrice (Newell-Litwa, Horwitz and Lamers 2015) (**Figure 10**).

Toute seule, la molécule de myosine ne peut pas générer de forces efficaces (Finer, Simmons and Spudich 1994). La myosine utilise l'actine comme support pour générer des forces (**Figure 11**). Afin de générer une force efficace, les polymères de myosine vont lier des filaments d'actine antiparallèles. Le mouvement exercé par la tête de la myosine entraîne un déplacement des filaments d'actine, se traduisant *in fine* par la contraction de la structure d'actine. Ce mécanisme est similaire au sarcomère des muscles mais, étant plus petits, les polymères de myosine fournissent une force plus faible que celle des muscles, (Lecuit, Lenne and Munro 2011).

Beaucoup d'études ont montré l'importance de la myosine dans différents processus cellulaires. En effet, la perte de fonction de la myosine peut entraîner des pathologies (Newell-Litwa et al. 2015), par exemple des défauts de développement lors de la morphogénèse. Chez la drosophile, il a été montré que la myosine, codée par les gènes *zipper* (chaîne lourde (Young et al. 1993)) et le gène *spaghetti squash* (chaîne légère régulatrice (Karess et al. 1991)) joue un rôle important dès les étapes précoces du développement. En effet, pour la première fois, en 1993, le chercheur Daniel Kiehart et son équipe ont mis en évidence l'importance de la myosine dans la morphogénèse de la drosophile. Une mutation du gène *zipper* entraîne un défaut de fermeture dorsale de l'embryon de drosophile par une perte du changement de la forme des cellules (Young et al. 1993). Aussi, une mutation dans la chaîne régulatrice empêchant l'activation de la myosine entraîne un défaut de gastrulation de l'embryon de drosophile (Vasquez et al. 2016). La myosine joue également un rôle dans la morphogénèse

des vertébrés, par exemple l'absence de la myosine entraîne un retard de fermeture du tube neural, causé par une forme cellulaire inadaptée (Rolo, Skoglund and Keller 2009). Par ces exemples, on comprend bien l'importance de la myosine et des forces qu'elle génère dans le changement de forme cellulaire lors de la morphogenèse. L'inhibition des régulateurs de la myosine provoque aussi des défauts de morphogenèse comme par exemple la perte de fonction de la protéine Rock. Un agent chimique (Y27632) peut être utilisé pour bloquer l'activité de la protéine Rock, empêchant ainsi l'activation de la myosine. Bien que Rock puisse avoir d'autres fonctions, cette méthode a pu mettre en évidence l'importance de Rock dans la dynamique de l'acto-myosine lors de développement précoce du poulet (Duess, Puri and Thompson 2016). Des outils génétiques ont permis de montrer que, chez la drosophile, Rock participe aussi à la morphogénèse tissulaire, par exemple en contrôlant la mise en place du cortex d'acto-myosine dans les cellules du mésoderme lors de la gastrulation (Coravos and Martin 2016).

Ainsi, ensemble, l'actine et la myosine forment des réseaux contractiles, tels que fibres de stress ou réseau cortical. Ces réseaux sont finement régulés par de nombreux facteurs. Ainsi, la formation et la dynamique de l'acto-myosine sont extrêmement importantes pour l'homéostasie et la morphogenèse des épithéliums, notamment pour l'acquisition d'une nouvelle forme à l'échelle cellulaire. Cependant, les réseaux d'acto-myosine ne sont pas suffisants pour transmettre des forces à l'échelle tissulaire et générer de nouvelles formes, il faut que l'acto-myosine soit ancrée par des molécules spécialisées dans l'adhérence cellulaire.

2.2. *Les éléments d'ancrage cellulaire nécessaires aux épithéliums.*

Les cellules épithéliales sont des cellules cohésives et polarisées. La polarité correspond à une organisation asymétrique de la membrane plasmique divisant ainsi la cellule en deux pôles. Le pôle apical est libre, il est orienté vers le milieu extérieur au contact de l'air ou de fluides. Le pôle basal est attaché au tissu conjonctif sous-jacent. Les molécules d'ancrage apical ne sont pas les mêmes que celles permettant l'attachement en basal. Ainsi la membrane plasmique est polarisée grâce à des complexes d'adhérence particuliers de part et d'autre de la cellule (**Figure 12**).

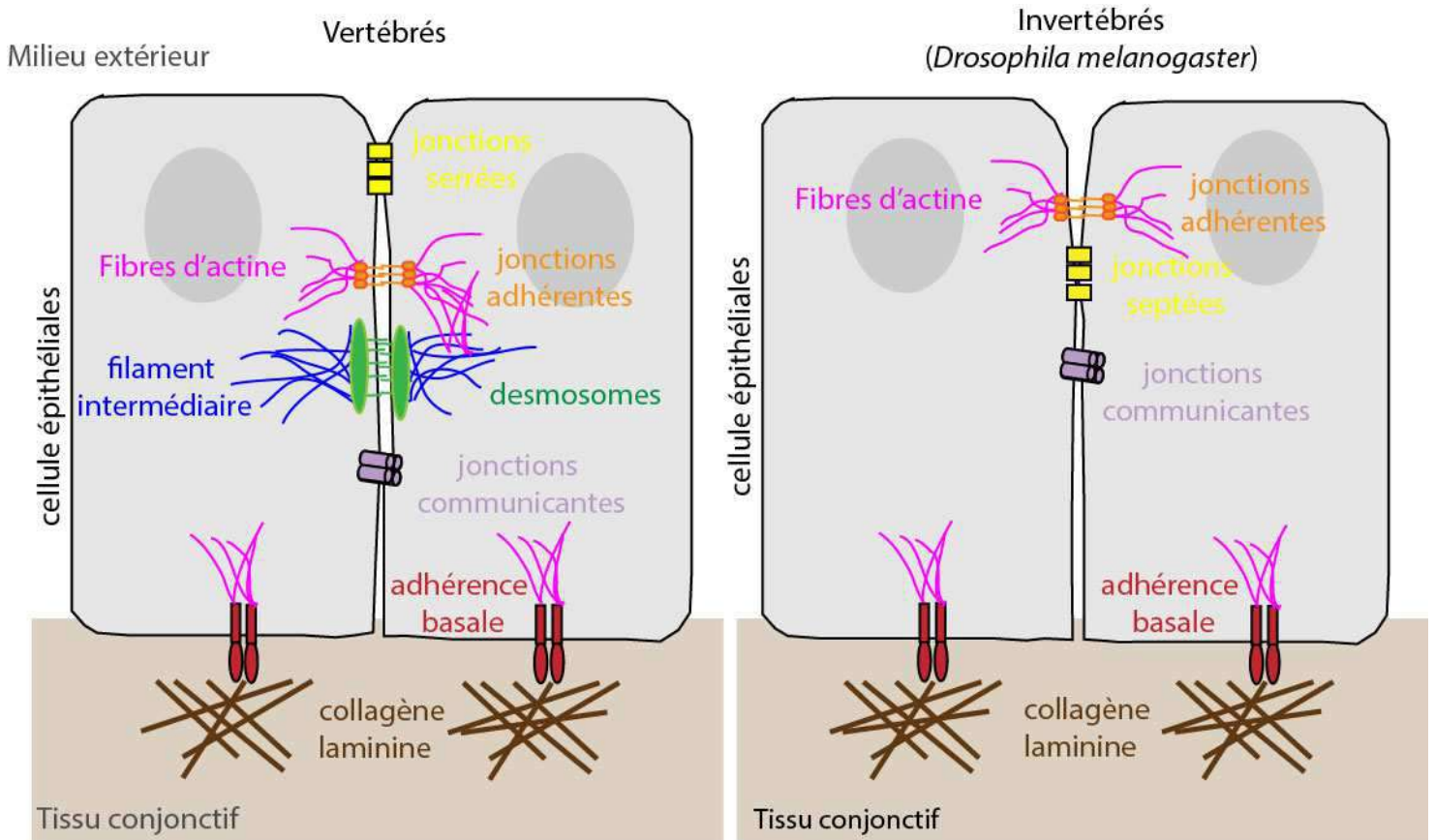


Figure 12. Les différents types de jonction d'une cellule épithéliale.

Les jonctions cellulaires régulent la perméabilité de l'épithélium (serrées), permettent la connexion cellule/cellule (adhérentes) et la communication intercellulaire (jonctions communicantes). Les différents types de cytosquelette associés aux jonctions sont indiqués.

2.2.1. La cohésion du groupe : les jonctions.

Afin de maintenir une organisation tissulaire et de former une couche de cellules imperméable, les cellules épithéliales doivent être liées entre elles. Pour cela, elles possèdent plusieurs types de jonction ayant chacune leur fonction (**Figure 12**) : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes.

Les jonctions serrées (ou jonctions imperméables) assurent l'étanchéité de l'épithélium (**Figure 12**) et jouent un rôle de barrière empêchant la diffusion de fluides afin d'éviter les chocs osmotiques (Farquhar and Palade 1963). Elles sont formées par des protéines de la superfamille des Claudines (Furuse et al. 1998, Tsukita, Tanaka and Tamura 2019) et des Occludines (Furuse et al. 1993). C'est l'interaction de deux Claudines de cellules voisines qui va garantir l'obstruction apicale de l'espace intermembranaire. Les analogues des jonctions serrées sont les jonctions septées chez les invertébrés (**Figure 12**). En effet, il a été découvert que le nématode *C.elegans* et la drosophile possèdent également des protéines apparentées aux Claudines (Behr, Riedel and Schuh 2003, Asano et al. 2003).

Au contraire, les jonctions communicantes connectent le cytoplasme de deux cellules par des canaux constitués par les connexines (Meşe, Richard and White 2007). Ainsi les cellules peuvent échanger des informations directement à travers leurs cytoplasmes (**Figure 12**). Les cellules épithéliales de la drosophile possèdent également des jonctions communicantes, elles sont formées par les Innexines (Güiza et al. 2018).

Enfin, les cellules épithéliales doivent aussi être solidement ancrées les unes aux autres. Ce sont les jonctions d'ancrage qui assurent ce rôle, elles font le lien entre les cytosquelettes de deux cellules voisines (**Figure 12**). Ainsi, en fournissant un attachement mécanique aux cellules, elles permettent le maintien de la morphologie de l'épithélium. Il existe plusieurs types de jonction d'ancrage tel que les jonctions adhérentes liant l'actine et les desmosomes liant les filaments intermédiaires. Les invertébrés, n'ayant pas de filaments intermédiaires, ne possèdent pas de desmosomes. Travaillant sur la drosophile, je vais me focaliser sur la description des jonctions adhérentes.

invertébrés
(*Drosophila melanogaster*)

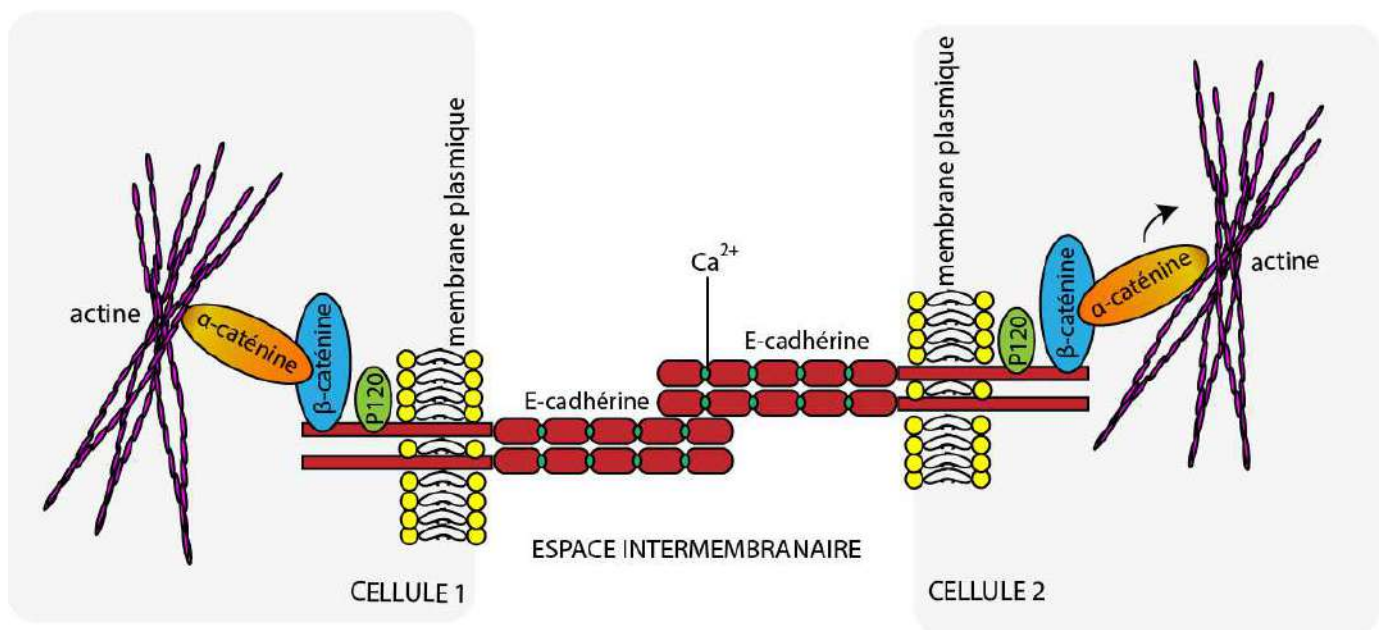
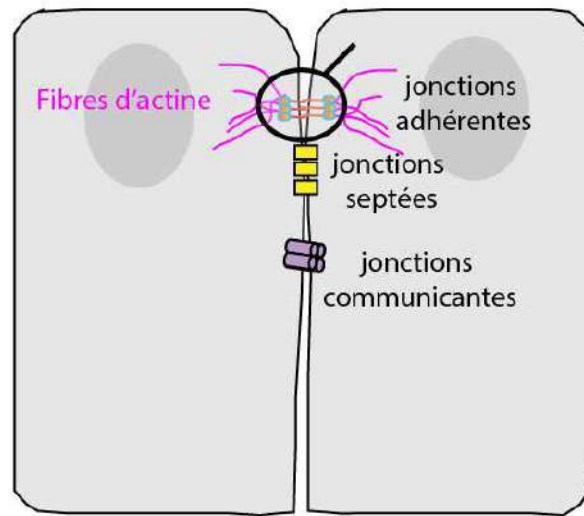


Figure 13. Schéma de la structure, de l'organisation et de la régulation des jonctions adhérentes.

La zone au niveau de la loupe, sur le schéma général du haut, est illustrée de manière agrandie sur le schéma du bas.

2.2.1.1. Le complexe protéique des jonctions adhérentes.

La principale protéine du complexe des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales est l'E-cadhérine (**Figure 13**). Elle assure l'attachement entre deux membranes voisines. Celle-ci fait partie de la superfamille des cadhérines dont les plus connues sont les E-cadhérines et les N-cadhérines (Takeichi 1988, Gumbiner 2005). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires. Elles possèdent un domaine extracellulaire situé du côté N-terminal de la protéine et un domaine intracellulaire situé en C-terminal. Le domaine extracellulaire est composé de plusieurs motifs cadhérines (ou EC) (Boggon et al. 2002, Parisini et al. 2007). La liaison entre deux cadhérines de cellules différentes est homophile et se fait sur le domaine extracellulaire le plus éloigné de la membrane (EC1) (Zhang et al. 2009b). L'adhérence cellulaire dépend de la présence des ions Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire (Takeichi 1977). Ce dernier favorise la rigidité de la cadhérine en se fixant sur les différents sites localisés sur les domaines extracellulaires (Nagar et al. 1996), favorisant ainsi la formation d'un dimère en *trans* (dimère d'E-cadhérine de deux cellules voisines). Au contraire en absence de calcium, la cadhérine perd sa rigidité et n'est plus capable de s'orienter pour former un dimère en *trans*, elle privilégiera dans ce cas une liaison en *cis* (dimère d'E-cadhérine d'une même cellule) (Parisini et al. 2007). Cette liaison va notamment favoriser le regroupement d'E-cadhérine qui formera des groupes de jonctions adhérentes à la membrane plasmique.

Les cadhérines dites classiques sont conservées entre les espèces, bien qu'il y ait des divergences chez la drosophile. La E-cadhérine, codée par le gène *shotgun* chez la drosophile, possède plus de domaines extracellulaires que chez les vertébrés (Oda and Tsukita 1999). Leur fonction adhérente et leur comportement moléculaire présentent, cependant, des ressemblances (Tepass 1999).

La partie C-terminale intracellulaire des cadhérines est longue de 150 acides aminés et s'avère très conservée (Nollet, Kools and van Roy 2000). Cette queue cytoplasmique va permettre le lien avec le cytosquelette par l'intermédiaire de protéines régulatrices et capables d'interagir avec le cytosquelette telles que les caténines (**Figure 13**): la P120-caténine, la β -caténine et l' α -caténine (Armado chez la drosophile).

La région de l'E-cadhérine située proche de la membrane plasmique permet l'interaction avec la P120 alors que l'extrémité de la chaîne interagit avec la β -caténine (Huber and Weis 2001). La P120 régule positivement l'activité de l'E-cadhérine en augmentant la

quantité de molécules à la surface de la cellule (Davis, Ireton and Reynolds 2003). Il a été montré qu'elle a la capacité d'interagir avec les microtubules pour favoriser le transport d'E-cadhérine jusqu'à la membrane plasmique (Chen et al. 2003, Shahbazi et al. 2013). Elle interagit également avec des régulateurs de l'actine, tels que les petites GTPase ou des régulateurs de la voie de signalisation Rho/Rac (Wildenberg et al. 2006, Noren et al. 2000). Bien qu'elle semble être importante pour la régulation des jonctions adhérentes, il a été montré de manière surprenante que sa présence n'est pas indispensable chez la drosophile. En effet, lorsque le site liaison de la P120 à l'E-cadhérine est muté, il n'y a pas d'effet sur l'adhésion intercellulaire (Pacquelet, Lin and Rorth 2003).

L'autre interacteur important de l'E-cadhérine est la β -caténine. Leur association se fait dans le réticulum endoplasmique, permettant ainsi la localisation du complexe à la membrane. La β -caténine peut aussi être monomérique et cytoplasmique, elle est alors impliquée dans la voie de signalisation Wnt (Cadigan and Peifer 2009). La β -caténine se lie à l' α -caténine au niveau des jonctions adhérentes afin de permettre la liaison et la régulation du cytosquelette (Pokutta and Weis 2000).

L' α -caténine est une protéine essentielle à la fonction d'adhérence car elle permet le lien avec le cytosquelette d'actine. Elle a été montrée comme capable, du moins *in vitro*, de lier directement les fibres d'actine (Rimm et al. 1995) (**Figure 13**). *In vivo*, il a été montré que la perte de fonction des constituants des jonctions adhérentes affecte la formation de fibres d'actine au niveau des points de contact cellulaire (Costa et al. 1998) et que la dépolymérisation de l'actine conduit à une immobilisation des jonctions adhérentes qui, normalement, suivent la dynamique des fibres d'actine (Kametani and Takeichi 2007). L'ensemble de ces études montre donc l'importance de cette protéine faisant le lien entre l'E-cadhérine et le cytosquelette. De plus, de nombreuses autres études ont identifié des interactions possibles avec des protéines liant l'actine, telles que la Vinculine, l' α -actinine et la Formine (Kobielak, Pasolli and Fuchs 2004, Kobielak and Fuchs 2004). Ainsi, le recrutement de ces protéines permet la régulation de l'état de l'actine au niveau des jonctions adhérentes et par conséquent permet le contrôle de leur dynamique.

Le complexe des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales est donc principalement composé des E-cadhérines, des Caténines (P120, β -caténine, α -caténine) et du cytosquelette d'actine (**Figure 13**), auxquelles s'ajoutent les diverses protéines de régulation.

La maintenance et la dynamique des jonctions adhérentes doivent être régulées en fonction des besoins et du rôle de la cellule.

2.2.1.2. La régulation des jonctions adhérentes.

Les jonctions adhérentes vont subir au cours du temps des modifications afin de contrôler le maintien de la polarité épithéliale, leur nombre, leur renouvellement, leur stabilité et leur regroupement. Un dérèglement de leur régulation peut conduire à des pathologies, telles que le cancer. En effet, la déstabilisation accrue des cadhérines peut conduire à la formation des métastases (Canel et al. 2013) : la perte de ces protéines favorise la transition épithélio-mésenchymateuse nécessaire à l'acquisition d'un comportement migratoire de ces cellules. Les jonctions adhérentes jouent également des rôles très importants lors de la morphogénèse épithéliale. Il est donc primordial que leur dynamique soit finement régulée. Pour cela, elles vont subir des phosphorylations/déphosphorylations afin de les maintenir ou de les dissocier de la membrane plasmique (Coopman and Djiane 2016). En effet, certaines protéines kinases vont agir pour favoriser des interactions protéine/protéine. Par exemple, la Caséine kinase 2 phosphoryle l'E-cadhérine afin d'augmenter son interaction avec la β -caténine, permettant ainsi la stabilisation des jonctions adhérentes (Lickert et al. 2000). Au contraire la kinase Src, dans les cellules de mammifère, va phosphoryler la E-cadhérine sur des résidus tyrosines, ce qui va promouvoir l'ubiquitinylation de l'E-cadhérine et donc sa dégradation (Fujita et al. 2002).

Les réactions de phosphorylation peuvent aussi influencer le nombre de complexes recrutés au niveau de la membrane plasmique. La phosphorylation par cdk1 de l'E-cadhérine empêche sa localisation à la membrane, diminuant ainsi son nombre en surface (Dupre-Crochet et al. 2007).

Quelques phosphatases vont permettre de contrebalancer l'activité des kinases, comme par exemple la protéine tyrosine phosphatase, PCP-2 qui favorise une stabilisation des jonctions adhérentes (Yan et al. 2006).

Un autre moyen important de régulation du nombre de jonctions adhérentes au cours du remodelage des tissus consiste en la mise en jeu de l'endocytose et de l'exocytose des molécules d'E-cadhérine (Brüser and Bogdan 2017).

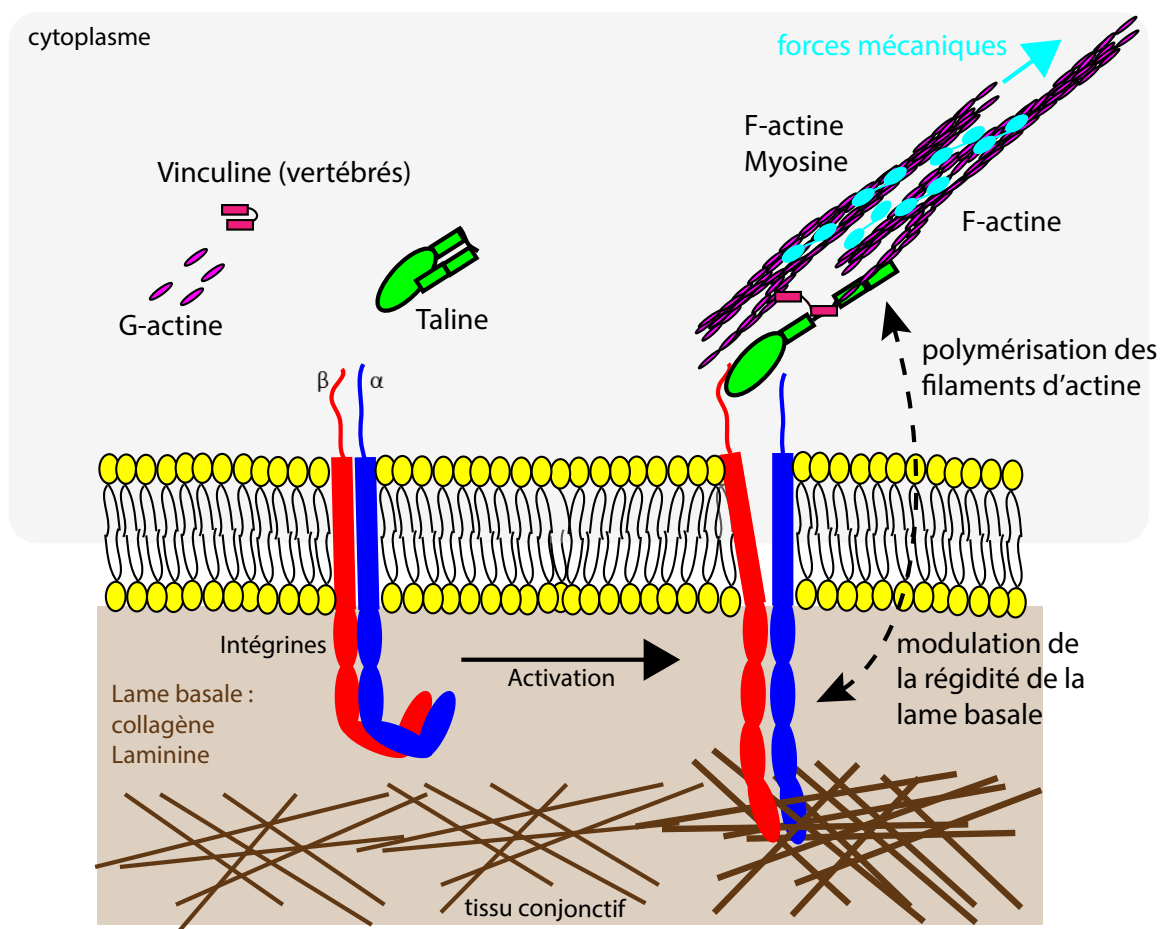


Figure 14. L'activation et la mécano-transduction des complexes d'adhérence basale.

Le schéma en haut à gauche permet de localiser les complexes d'adhérences dans la cellule. La loupe indique la zone agrandie vue sur le schéma du bas. Cette schématisation agrandie des complexes d'adhérence représente les intégrines (rouge et bleue) qui sont repliés en absence de signaux activateurs. La Taline (vert) et la Vinculine (rose foncée) sont également sous forme repliée en absence de signaux activateurs. La liaison de la Taline aux intégrines va déclencher leur activation. La Taline va lier les filaments d'actine (rose fuchsia) et de myosine (bleu ciel), favorisant leur dépliement et libérant le site de liaison à la Vinculine. La Vinculine lie à son tour les filaments d'actine permettant d'amplifier la transmission de forces. Ainsi organisés et activés, les complexes d'adhérences basales vont pouvoir percevoir des signaux venant de la matrice extracellulaire et adapter une réponse comme le renforcement de l'acto-myosine. La tension exercée par les filaments d'acto-myosine va permettre des modifications de la matrice extracellulaire (marron).

Une autre grande famille de protéines influence la dynamique des jonctions adhérentes. Il s'agit des petites Rho GTPase, notamment Rho, Rac et cdc42 (Braga 2002, Georgiou et al. 2008). L'inhibition de Rho et de Rac induit, dans certains types cellulaires, une altération des cadhérines matures (Braga et al. 1999). Ces protéines vont être activées localement par les E-cadhérines (Noren et al. 2001, Nakagawa et al. 2001, Kim, Li and Sacks 2000) ce qui va induire l'activation de divers régulateurs impliqués dans l'organisation de l'actine (Arnold, Stephenson and Miller 2017). L'activation de ces effecteurs va conduire à la maintenance des E-cadhérines à la membrane plasmique (Braga et al. 1999, Yamazaki, Oikawa and Takenawa 2007) et au remodelage tissulaire.

Enfin, la régulation des jonctions adhérentes dépend également de la polarisation de l'épithélium. Les protéines impliquées dans la polarité épithéliale sont importantes pour la localisation correcte des jonctions adhérentes et surtout permettent la stabilité de celle-ci. Par exemple les protéines Par3 (Bazooka chez la drosophile) sont connues pour être des protéines échafaudage (Coopman and Djiane 2016).

L'ensemble de ces différentes voies de régulation montre bien l'importance des jonctions adhérentes au sein d'un épithélium. Ainsi régulées, les jonctions adhérentes sont des éléments cellulaires extrêmement dynamiques qui vont par conséquent jouer un rôle crucial dans le comportement de la cellule lors de la morphogenèse épithéliale, notamment, grâce à leur capacité à ressentir les forces, comme nous le verrons plus loin. Elles ne sont, cependant, pas les seules molécules nécessaires à l'ancrage des cellules pour le maintien d'un épithélium.

2.2.2. L'adhésion basale.

Les cellules épithéliales ont besoin d'être liées entre elles afin de former un épithélium mais il faut aussi qu'elles soient ancrées sur un support (**Figure 14**). C'est le tissu conjonctif qui joue ce rôle, il est constitué majoritairement par la matrice extracellulaire. L'épithélium s'ancre à la matrice par son pôle basal grâce à des protéines transmembranaires capables de lier des constituants de la matrice extracellulaire. Elle fournit ainsi un support mécanique à l'épithélium dont les propriétés varient en fonction de sa composition. En effet, ce support sera plus ou moins rigide selon la nature moléculaire de la matrice. Cette différence de rigidité influencera le remodelage de l'épithélium lors de la morphogenèse tissulaire (Rozario and DeSimone 2010, Ramos-Lewis and Page-McCaw 2019).

2.2.2.1. *La matrice extracellulaire.*

La matrice extracellulaire, conservée dans le règne animal, forme un maillage composé de différentes molécules fibrillaires qui s'interconnectent telles que les fibres de collagène, l'élastine, la fibronectine, les laminines, les glycoprotéines structurales, les protéoglycans et enfin les glycosaminoglycans (Theocharis et al. 2016). Ces composants sont fabriqués principalement par les fibroblastes, cellules présentes dans le tissu conjonctif, mais aussi par les cellules de l'épithélium. Les fibroblastes étant absents chez la drosophile, la matrice extracellulaire est sécrétée par des cellules spécialisées telles que les cellules du corps gras et les macrophages (Brown 2011). Autrefois, la matrice extracellulaire était vue comme un support passif. Cependant, il a été découvert qu'elle joue de multiples rôles dans la physiologie et l'homéostasie des tissus. Elle permet la migration de cellules, la différenciation, l'adhésion à l'épithélium, la réponse à des stress mécaniques, tout cela grâce à un échange bidirectionnel de signaux (Rozario and DeSimone 2010). Il existe deux niveaux de matrice extracellulaire : l'interstitielle, qui est plus profonde par rapport à l'épithélium, et la pericellulaire, qui se situe juste au-dessous des cellules et qui est appelée lame basale. C'est celle-ci qui interagit directement avec les cellules de l'épithélium. Elle est composée principalement du collagène IV, de laminines, de Nidogène, et du Perlecan, un Proteoglycan (Theocharis et al. 2016). Le collagène IV et les laminines forment des réseaux interconnectés par les autres composants. Un défaut dans la composition de la lame basale peut conduire à des pathologies ou à la létalité de l'individu. Par exemple, une mutation du gène codant pour le collagène IV a montré que non seulement le collagène IV est indispensable au maintien de la lame basale mais aussi que sa perte entraîne un retard du développement de la souris (Pöschl et al. 2004). La présence du Perlecan est également importante au cours du développement, en effet sa perte entraîne un défaut de développement céphalique et du cartilage qui conduira à la mort du souriceau peu de temps après sa naissance (Arikawa-Hirasawa et al. 1999). Ainsi de nombreuses études ont pu montrer l'importance de la lame basale durant le développement, notamment lors de la morphogénèse. Les propriétés biomécaniques, qui détermineront le niveau de la rigidité de la lame basale, dépendent de sa composition et sont importantes pour l'acquisition et le maintien de la forme d'un organe. Des expériences sur la drosophile ont montré son importance morphogénétique. Par exemple, des expériences sur l'aile de drosophile en développement ont montré que la perte du collagène IV entraîne un étalement

et un aplatissement de l'aile car la lame basale est plus souple. Au contraire, une augmentation de la rigidité de la lame basale par la perte de Perlecan induit une compression de l'organe (Ramos-Lewis and Page-McCaw 2019, Pastor-Pareja and Xu 2011).

Ainsi, le rôle principal de la lame basale est de fournir un point d'ancrage aux cellules de l'épithélium grâce à son interaction avec le complexe des adhésions basales. De manière importante, elle est capable d'envoyer et de recevoir des signaux mécaniques à travers le complexe des adhésions basales, influençant ainsi le comportement cellulaire.

2.2.2.2. *Le complexe protéique des adhésions basales.*

Le complexe majeur des adhésions basales implique les intégrines, des glycoprotéines transmembranaires très conservées au cours de l'évolution (Tamkun et al. 1986). Elles s'organisent en hétérodimères α et β , possédant chacune des domaines extracellulaires (N-terminal) dont les extrémités (le domaine β -propeller de la sous-unité α et le domaine β A de la sous-unité β) forment une « poche » pour fixer la lame basale, fournissant ainsi un point d'ancrage solide. La sous-unité α possède quatre ou cinq domaines extracellulaires alors que la sous-unité β en a sept (Campbell and Humphries 2011). Chez l'homme, il y a dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β ce qui permet de faire vingt-quatre combinaisons de dimères différents. Il y a moins de possibilités chez la drosophile car il n'y a que cinq sous-unités α et deux sous-unités β . Ainsi, grâce à la formation de différents dimères, les intégrines vont capter un ligand extracellulaire provenant de la laminine ou du collagène (Takada, Ye and Simon 2007). Cependant, la liaison avec un ligand externe dépend de la conformation spatiale du dimère d'intégrine. En effet, le complexe d'intégrine peut être sous trois états différents : inactif, intermédiaire et actif (Nishida et al. 2006). À l'état inactif, les domaines extracellulaires sont repliés vers la membrane plasmique (**Figure 14**), ainsi le site de liaison à la lame basale est inaccessible (Takagi et al. 2002). De plus, lorsque les intégrines sont sous forme inactive, les sous-unités α et β interagissent par leur domaine transmembranaire (β 3 et α IIb respectivement) (Iwamoto and Calderwood 2015). En revanche, l'activation des intégrines va déclencher leur dépliement par une extension des domaines extracellulaires afin de libérer le site de liaison à la lame basale (Takagi et al. 2002) (**Figure 14**). Cette dynamique moléculaire permet de contrôler la liaison à la matrice extracellulaire. L'affinité des intégrines pour leurs ligands extracellulaires dépend de la présence des cations Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} (Campbell and Humphries 2011). De plus, les intégrines, grâce à leur domaine intracellulaire, peuvent lier les

fibres d'actine via d'autres protéines (Hynes 2002). Ainsi, ce complexe multiprotéique forme un lien mécanique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Tamkun et al. 1986).

La Taline est l'une des protéines cytoplasmiques du complexe d'adhésion basale qui va se fixer sur la partie interne des intégrines (Burrige and Connell 1983, Horwitz et al. 1986). C'est une très grande protéine composée de 2500 acides aminés. Elle possède de nombreux domaines (« une tête » et « une tige » composées de plusieurs sous domaines chacune), dont un sous domaine de dimérisation lui permettant d'adopter différentes conformations spatiales, parallèle ou perpendiculaire à la membrane (Klapholz and Brown 2017). C'est une protéine importante, car elle permet l'activation des intégrines en se liant aux motifs NPxY des intégrines grâce à son domaine F3 (Calderwood et al. 1999, García-Alvarez et al. 2003). Sa liaison aux intégrines augmente leur affinité pour le ligand extracellulaire, modulant ainsi l'ancrage à la matrice extracellulaire et la mécano-transduction (Ye et al. 2010). Aussi, la Taline permet la liaison directe avec les fibres d'actine (Muguruma, Matsumura and Fukazawa 1990) ce qui permet la transduction de signaux mécaniques de la lame basale vers l'intérieur de la cellule ou, inversement, de l'intérieur de la cellule vers la lame basale (Hynes 2002) (**figure 14**). Elle permet également le recrutement de nombreuses protéines cytoplasmiques afin de réguler diverses voies de signalisation telles que les petites GTPase. L'importance de Taline sur la fonction des intégrines a été identifiée chez la drosophile. La suppression du gène codant pour la Taline (*rhea*) entraîne par exemple, des défauts d'embryogenèse et des malformations dans les ailes, dus à la perte de l'adhésion basale (Brown et al. 2002, Prout et al. 1997). Un phénotype similaire a aussi été mis en évidence dans les mutants pour la Taline chez les mammifères (Zhang et al. 2008). La Taline joue ainsi un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire et la transduction de messages mécaniques (Klapholz and Brown 2017).

Enfin, la Vinculine est une protéine connue, chez les vertébrés, pour interagir avec le cytosquelette d'actine au niveau des adhérences focales (**Figure 14**). Elle permet aussi le recrutement et la stabilisation de la Taline (Bays and DeMali 2017). Toutefois, elle ne semble pas être requise dans l'adhérence basale des cellules de la drosophile (Alatortsev et al. 1997). Ainsi formées, les adhérences basales vont être régulées pour permettre à la cellule d'adapter son comportement en fonction de son environnement.

2.2.2.3. *La régulation des adhésions basales.*

Le recrutement et le recyclage des intégrines au niveau de la membrane plasmique se fait via des vésicules de transport permettant ainsi de contrôler le nombre de complexes d'adhésion à la membrane, un paramètre important non seulement pour l'ancrage à la lame basale mais également lors de la migration des cellules qui nécessite un renouvellement dynamique des intégrines (Iwamoto and Calderwood 2015). Les intégrines peuvent être transportées par les vésicules sous forme inactive. Les domaines extracellulaires des intégrines sont repliés sur eux même, vers la membrane plasmique, empêchant ainsi la liaison aux ligands extracellulaires (Takagi et al. 2002). Le Ca^{2+} permet également le maintien de la forme inactive des intégrines. En revanche, la présence de Mn^{2+} va entraîner le début de l'extension du domaine extracellulaire vers la matrice extracellulaire bien que l'affinité pour le ligand reste basse (Campbell and Humphries 2011, Hall and Slack 2019). D'autres signaux sont alors nécessaires pour l'activation totale des intégrines, c'est-à-dire sous leur forme étendue. Par exemple, l'interaction de la Taline avec le domaine intracellulaire de la sous-unité β des intégrines va contribuer à l'activation des intégrines. Les intégrines, une fois actives, vont pouvoir lier un ligand de la lame basale ce qui va déclencher l'activation de voies de signalisation, il s'agit d'un signal « outside-in » (de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule). La « Focal Adhesion Kinase » (FAK) et les petites GTPases Rho, Rac et Cdc42 vont dans ce cas être activées par les intégrines, entraînant l'activation de différentes voies de signalisation régulant la dynamique de l'acto-myosine. En réponse, un réseau d'acto-myosine peut se former au niveau des adhésions basales générant une tension qui va être ressentie par les intégrines et transmise à la matrice extracellulaire. Finalement, la matrice peut répondre en modifiant sa rigidité par exemple. Dans ce sens, on parle de signal « inside-out » (de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur) (Askari et al. 2009).

L'adhérence basale est contrôlée de manière biochimique grâce à l'interaction de plusieurs facteurs protéiques, mais elle est également régulée par des signaux mécaniques. La combinaison de ces signaux est interdépendante, c'est-à-dire que les signaux biochimiques vont permettre des réponses mécaniques, et inversement que les signaux mécaniques vont induire des réponses biochimiques.

2.2.3. La transmission des forces par les différents complexes d'adhérence.

Les complexes d'adhérence apicaux et basaux forment des ancrages solides et modulables grâce à leur liaison au cytosquelette dont la dynamique va pouvoir engendrer des changements de comportement cellulaire. En effet, les jonctions adhérentes et les points focaux d'adhésion sont considérés comme des biosenseurs de force permettant de sentir, intégrer et transmettre des messages mécaniques entre les cellules mais aussi entre les cellules et la matrice extracellulaire.

Ces dernières années, beaucoup d'études ont mis en évidence le rôle essentiel de la mécano-transduction lors de la morphogénèse et pour l'homéostasie des tissus. Qu'est-ce que la mécano-transduction ? Les cellules peuvent communiquer entre elles par le biais de signaux biochimiques ou mécaniques. La mécano-transduction est la capacité des cellules à percevoir et intégrer une information mécanique et à la convertir en information biochimique ou électrique. Les complexes d'adhérence, situés dans la membrane plasmique, à l'interface entre le milieu intra- et extra-cellulaire, sont généralement les premiers à ressentir les forces extérieures provenant soit de la matrice extracellulaire, soit des cellules voisines. Leur exposition aux forces mécaniques a suscité l'intérêt des chercheurs, et de nombreux outils ont été générés afin d'étudier leur fonctionnement par rapport aux forces. Ainsi, des expériences élégantes ont apporté une meilleure compréhension sur leur rôle dans la mécano-transduction. Les forces biomécaniques peuvent être mesurées et analysées à plusieurs échelles : tissulaire, cellulaire ou moléculaire. Dans cette partie je vais me focaliser sur l'impact des forces au niveau moléculaire, ce qui est nécessaire pour comprendre l'impact des forces à l'échelle de la cellule et du tissu.

La détection basée sur le FRET de tension moléculaire est l'une des méthodes qui a permis de caractériser l'impact des forces sur certaines protéines clés. Le principe de cette méthode repose sur une construction composée d'un fluorophore donneur d'énergie (CFP) et d'un fluorophore accepteur d'énergie (YFP), tous les deux séparés par un lien étirable issu d'un constituant des fils de toiles d'araignée (Brenner et al. 2016). Ainsi, lorsque la tension est basse, le transfert d'énergie a lieu car les fluorophores restent proches. En revanche, lorsque la construction est sous tension, les fluorophores s'éloignent, empêchant le transfert d'énergie. Le rapport d'intensité de chacun des fluorophores varie et permet ainsi de détecter

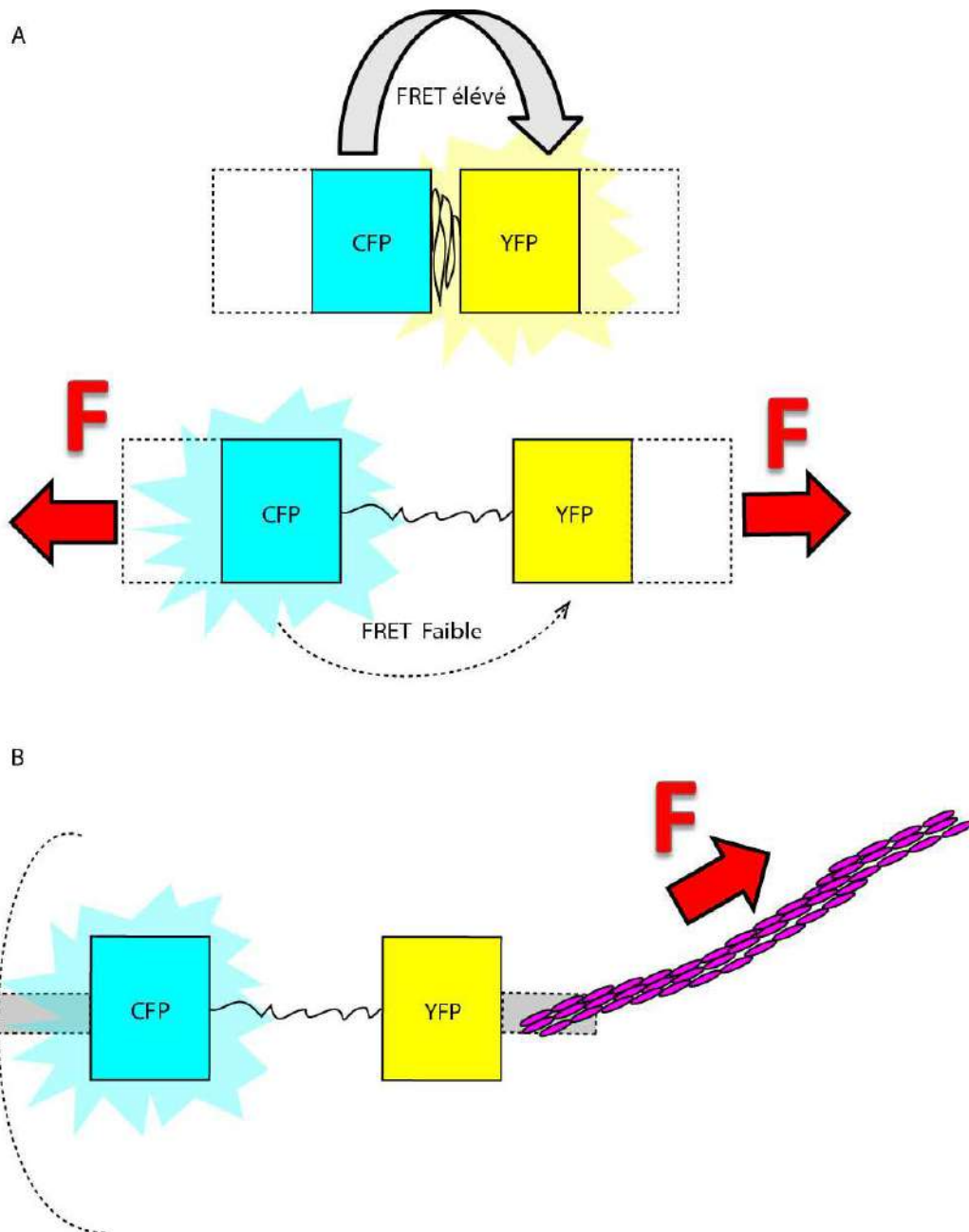


Figure 15. Les biosenseurs de force basés sur le FRET.

(A) La CFP et l'YFP sont liées par une séquence peptidique « souple » (noir). Lorsque la protéine d'intérêt (rectangle pointillés) n'est pas sous tension, l'énergie émise par la CFP est transmise à la YFP qui fluoresce. Dans ce cas, le signal FRET est fort (en haut). Sous tension, la CFP et l'YFP s'éloignent, la CFP ne transfère plus son énergie, c'est elle qui fluoresce. Le signal FRET diminue quand la molécule est sous tension (en bas). **(B)** Exemple hypothétique d'une protéine associée à un biosenseur et soumise à une force générée par l'acto-myosine (rose).

le fait qu'une molécule est sous tension ou non (**Figure 15 A**). Ces constructions, nommées senseur de force, peuvent être fusionnées à des protéines d'intérêt afin de pouvoir étudier leur capacité à ressentir les forces (Gayrard and Borghi 2016) (**Figure 15A-B**). Cette méthode, bien qu'usuellement utilisée *in vitro* (Grashoff et al. 2010, Borghi et al. 2012), s'avère particulièrement puissante pour l'exploration du rôle de la mécano-transduction *in vivo* et *ex vivo*, notamment lors du développement des organismes. Cependant, une limite importante de cette méthode est que la tension ne peut être mesurée que dans une fenêtre restreinte de mesure, c'est-à-dire qu'une force au-dessous ou au-dessus de cette fenêtre ne pourra pas être mesurée (Sugimura, Lenne and Graner 2016, Campàs 2016).

Il est maintenant bien établi que les jonctions adhérentes permettent la propagation des forces dans un épithélium (voir section 3.2.1.). Les cadhérines sont donc des protéines d'intérêt pour mesurer les forces mécaniques générées dans un épithélium. Par conséquent, la fusion d'un senseur de force avec une cadhérine a été déterminante pour comprendre son rôle dans la transmission des forces. Il a initialement été montré grâce à un senseur de force intégré dans les molécules d'E-cadhérine que les jonctions adhérentes sont de manière permanente sous tension, cependant la tension est plus forte au niveau des points de contact intercellulaire contrairement à là où il n'y en pas. En effet, l'acto-myosine va exercer une force sur les jonctions adhérentes qui sera transmise aux jonctions adhérentes voisines (Borghi et al. 2012), renforçant ainsi l'adhésion cellulaire. Cet outil a été plus tard développé pour des analyses *in vivo*, par exemple chez les amphibiens. Les auteurs ont montré que dans l'embryon vivant de xénope le signal FRET est diminué au niveau des contacts cellulaires, indiquant qu'une force est appliquée sur les cadhérines, confirmant les résultats obtenus en culture de cellules (Herbomel et al. 2017). Des expériences *in vivo* ont également été faites chez la drosophile. Ici, le senseur de tension de l'E-cadherine a contribué à la compréhension de la migration collective des cellules de bordure dans l'ovaire de la drosophile. Dans ce processus, l'E-cadhérine est préférentiellement sous tension au front de migration des cellules pour contrôler la direction de migration du groupe des cellules de la bordure vers l'oocyte (Cai et al. 2014).

D'autres expériences novatrices ont permis de mesurer la force appliquée sur une molécule unique telle que l' α -Caténine, une molécule importante du complexe des jonctions adhérentes. Initialement, son interaction avec les fibres d'actine suggérait qu'elle pouvait agir comme un senseur de force. L'utilisation de pinces magnétiques a permis d'analyser l'effet

des forces sur l' α -caténine. Dans ce cas, les molécules d' α -caténine sont ancrées entre une lamelle de cuivre et une bille paramagnétique afin d'appliquer une force d'intensité variable sur la molécule pour en mesurer sa sensibilité. Ainsi, dans cette expérience, il a été mis en évidence que l' α -caténine change de conformation en fonction de la force appliquée. En effet, lorsque la force appliquée est supérieur à 5pN, l' α -caténine va se déplier afin d'ouvrir son site de liaison à la Vinculine, ce qui va favoriser la polymérisation de l'actine. En revanche, lorsque la force dépasse 30pN cela amplifie l'étirement, entraînant au contraire le détachement de la Vinculine. De plus ces expériences ont montré qu'en dessous de 5pN, l' α -caténine est sous sa forme repliée, empêchant toute interaction (Yao et al. 2014b). Le domaine de liaison à l'actine va lui aussi être étiré pour libérer un site permettant à deux protéines d' α -caténine de former un dimère pour favoriser le regroupement des jonctions adhérentes et la polymérisation de l'actine (Ishiyama et al. 2018). L'ensemble de ces études montre l'engagement et l'importance des jonctions adhérentes dans la transmission correcte des forces à travers la cellule et l'épithélium.

Qu'en est-il des adhésions basales ? Initialement, un senseur de force FRET a été combiné à la Vinculine (VinTS), afin d'étudier son rôle dans la transmission des forces en culture cellulaire. L'utilisation de la sonde VinTS a permis de mettre évidence que, lors de la migration cellulaire, la Vinculine est sous tension au niveau des protrusions du front de migration mais que la tension est basse lors de la rétraction des protrusions. Ces résultats suggèrent que la Vinculine a la capacité de transmettre les forces, déterminant ainsi l'assemblage ou le désassemblage des adhésions basales (Grashoff et al. 2010). De manière similaire à la Vinculine, la Taline est davantage sous tension à la périphérie de la cellule qu'en son centre, montrant que l'adhésion est plus forte en périphérie. Le recrutement de la Taline va augmenter l'affinité au ligand extracellulaire en favorisant le dépliement total des intégrines, initialement repliées vers la membrane plasmique (Ye et al. 2010, Calderwood et al. 1999, Tadokoro et al. 2003). Ainsi la liaison de la Taline aux intégrines induit un changement de conformation des intégrines. Cependant, pour pouvoir se lier aux intégrines, il faut que la Taline reçoive un signal d'activation. La Taline forme un homodimère replié sur lui-même qui va s'ouvrir en réponse à un signal mécanique ou à un signal biochimique (Klapholz and Brown 2017). Une fois active elle va pouvoir se lier à la sous-unité β des intégrines, ainsi qu'à la membrane plasmique (Tadokoro et al. 2003, Goult et al. 2010). Cette liaison intégrine-Taline-cytosquelette va provoquer la dissociation des sous unités- α/β au niveau du domaine

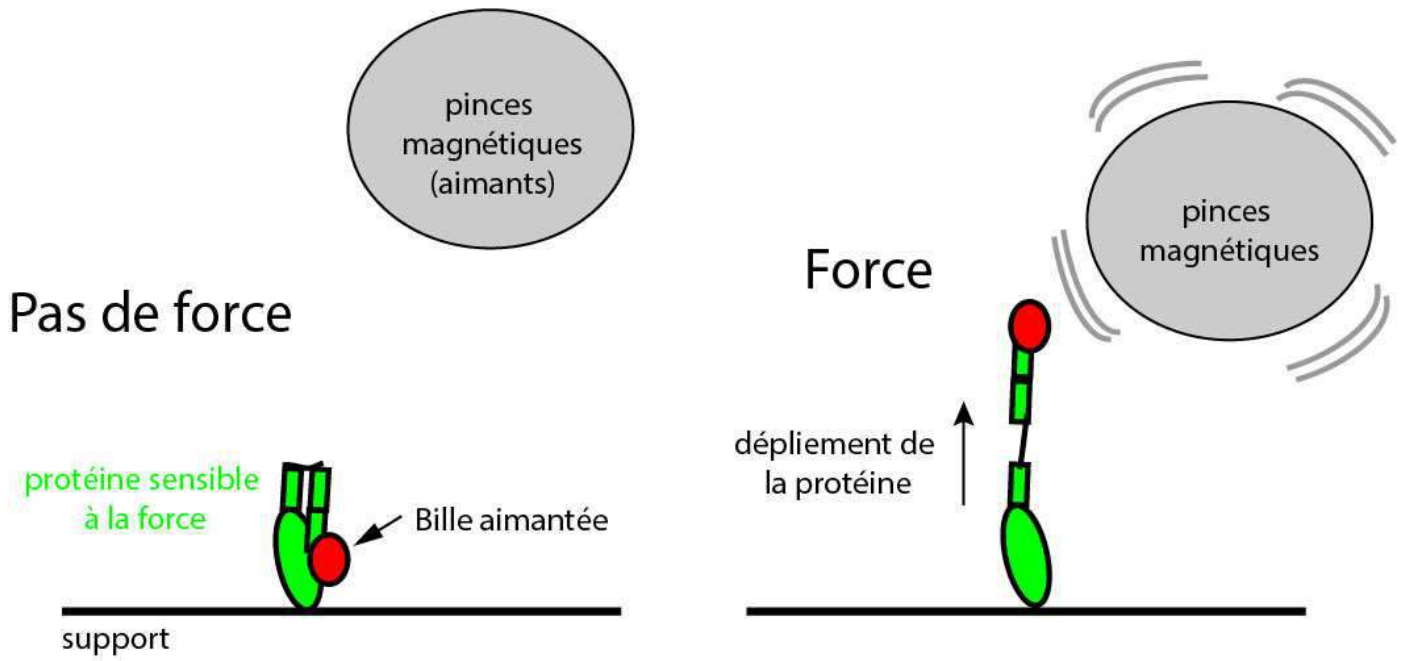


Figure 16. Représentation schématique du dépliement d'une protéine sensible à la force détecté avec des pincettes magnétiques.

transmembranaire permettant l'ouverture du site de liaison à la matrice extracellulaire des intégrines (Vinogradova et al. 2002).

La Taline est une protéine importante pour la mécano-transduction. En effet, elle va permettre à la cellule de sentir la rigidité de la matrice extracellulaire : lorsque les cellules sont sur un support mou, la Taline est moins sous tension, alors que sur un support rigide la Taline est davantage sous tension. C'est grâce aux multiples sous-domaines présents dans son domaine tige qu'elle peut sentir et transmettre la force (Kumar et al. 2016, Klapholz and Brown 2017). La force appliquée par l'acto-myosine sur la tige de la Taline peut induire son dépliement. Elle va s'étendre progressivement jusqu'à une centaine de nanomètres, ce qui permettra l'ouverture de différents sites d'interaction, notamment celui de la Vinculine (chez les vertébrés) afin d'induire la polymérisation de l'actine (Yao et al. 2014a, Yao et al. 2016, Papagrigoriou et al. 2004, Klapholz and Brown 2017) (**Figure 14**). La capacité de molécules de Taline à sentir les forces a été mesurée de la même manière que précédemment pour l' α -caténine grâce à des billes paramagnétiques (**figure 16**). Les auteurs ont mesuré que la force moyenne appliquée sur la Taline associée aux adhérences basales lors de l'étalement cellulaire ne dépasse pas 10pN (Yao et al. 2016). Ainsi, la Taline agirait comme un temporisateur de force afin d'assurer le maintien des adhérences basales et la transduction de messages mécaniques à travers la cellule. Ce processus est réversible puisque lorsque la force est faible la Talin va perdre sa liaison avec Vinculin (Yao et al. 2016). Ainsi, comme l' α -caténine, la Taline est un véritable senseur de la force capable de provoquer une réponse en fonction de l'intensité de la force générée par l'acto-myosine. La Taline est donc une protéine clé qui va garantir la transmission et la diffusion des signaux mécaniques de part et d'autre de la membrane plasmique par différents moyens de réponse.

En conclusion, l'ensemble des études menées sur le rôle des adhérences cellulaires dans la mécano-transduction et la transmission des forces ont permis de comprendre comment les molécules répondent aux forces afin de contrôler le comportement d'une cellule, soulignant l'importance du lien entre complexes d'adhérence et cytosquelette d'acto-myosine pour la transmission des forces à travers les cellules.

III. Et le noyau dans tout ça ?

Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressée au noyau et son rapport aux forces puisque mon travail de Master suggérait un potentiel rôle du noyau dans la morphogenèse, inconnu jusque-là. Je vais donc introduire ici les connaissances acquises ces dernières années sur le lien du noyau avec les forces.

Comment une cellule, après avoir perçu des signaux mécaniques à travers ses complexes d'adhérence, va-t-elle pouvoir adapter son comportement ? Ces signaux vont pouvoir activer en cascade des voies de signalisation qui vont *in fine* réguler l'expression génique en réponse au signal initial. Finalement, le message mécanique arrive jusqu'au noyau. Il existe aussi un moyen plus direct de transmettre un signal mécanique au noyau. En effet, le cytosquelette est non seulement ancré aux complexes d'adhésion mais également au noyau par un autre complexe spécifiquement localisé dans les membranes nucléaires et connecté au nucléosquelette. Je me concentrerai dans cette partie sur le lien direct qui a été établi entre les signaux mécaniques et le noyau.

3.1. Généralités sur le noyau.

Le noyau est le « gardien » de l'intégrité du génome des cellules eucaryotes. Il forme un compartiment délimité par une double membrane phospholipidique, nommée enveloppe nucléaire. Elle est composée d'une membrane externe au contact du cytoplasme, en continuité avec le réticulum endoplasmique, un autre organe cellulaire, et d'une membrane interne au contact du nucléoplasme. Ces membranes sont séparées par un espace inter-membranaire (Alberlts et al. 2019, Bolsover et al. 2006). Ainsi délimité, l'ADN, support de l'information génétique, est protégé du cytoplasme. Cependant, l'enveloppe nucléaire n'est pas totalement infranchissable : elle est en effet traversée par les pores nucléaires, des complexes multi-protéiques qui permettent des échanges bidirectionnels de molécules nécessaires à l'expression et la régulation des gènes (Alberlts et al. 2019, Bolsover et al. 2006). Le noyau possède aussi un squelette, le nucléosquelette, composé notamment des lamines permettant le maintien de sa forme et lui conférant sa rigidité. Le nucléosquelette est relié au cytosquelette grâce à un complexe protéique, le LINC, qui traverse les membranes nucléaires

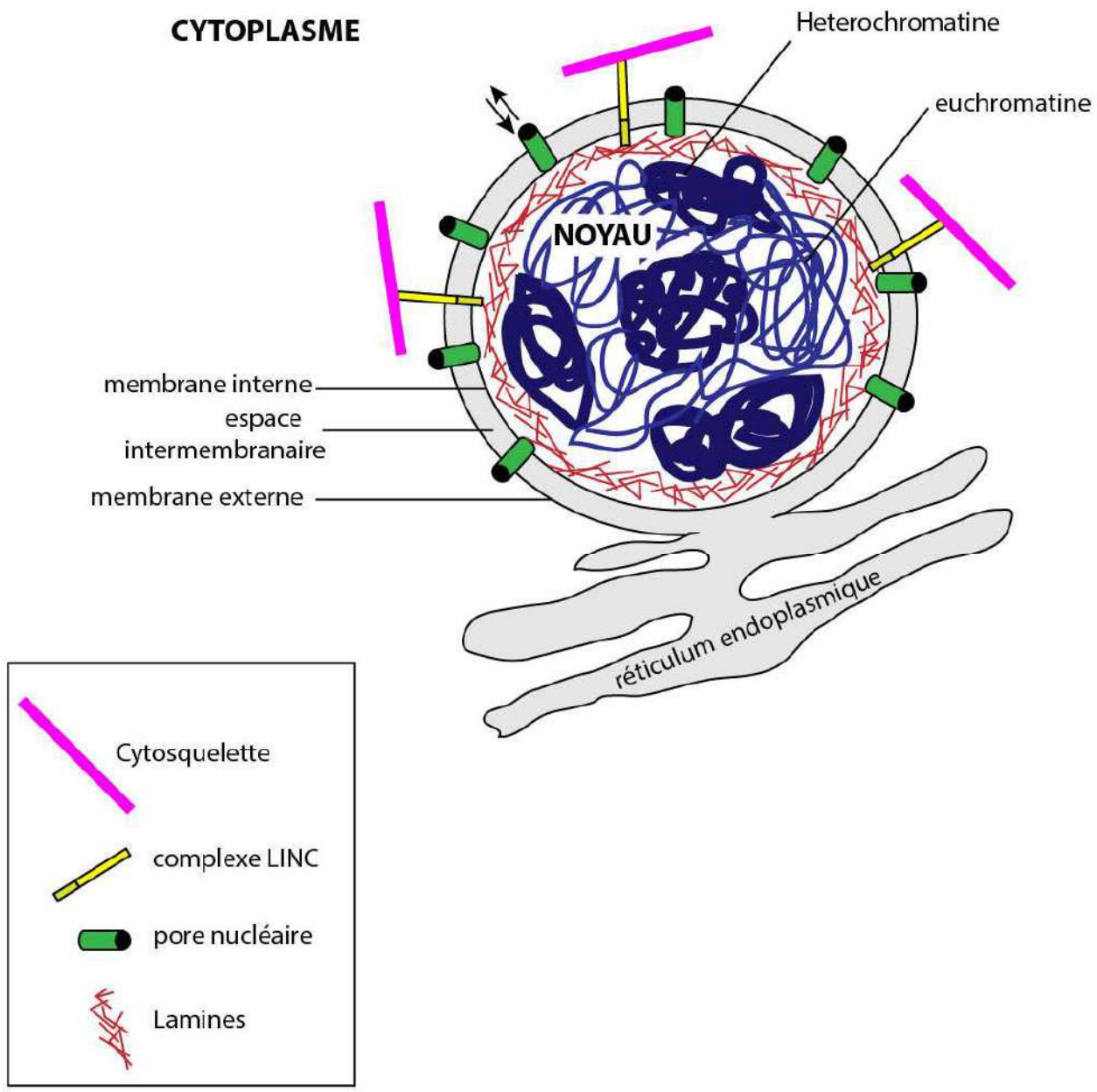


Figure 17. Schéma général de l'organisation du noyau.

(**Figure 17**). Ainsi, le noyau est étroitement lié au cytosquelette de la cellule, suggérant qu'il peut être soumis à des forces.

3.2. *Les molécules impliquées dans la transmission des forces au noyau.*

Le noyau est l'organite le plus volumineux et le plus rigide des cellules. Cette rigidité du noyau est essentielle pour garantir son intégrité et sa forme. Il est maintenant bien établi que le noyau est soumis à des forces mécaniques, il est donc important qu'il soit physiquement résistant au stress mécanique qu'il va subir. Cependant, le noyau ne va pas seulement subir les forces, il va être capable d'y répondre (Guilluy and Burridge 2015). Ces forces exercées sur le noyau vont être ressenties par celui-ci, et engendrer des réponses qui pourront modifier le comportement des cellules. En effet, ces forces vont être transmises à l'intérieur du noyau afin de moduler l'expression de certains gènes (Uhler and Shivashankar 2017, Maurer and Lammerding 2019). Plusieurs molécules sont impliquées dans la rigidité de l'enveloppe nucléaire et dans la mécano-transduction nucléaire, en particulier le nucléosquelette et les membres du complexe LINC.

3.2.1. Le nucléosquelette de Lamines.

La lamine est un type de filament intermédiaire (Aebi et al. 1986) . Elle est retrouvée dans tous les noyaux, même dans ceux des cellules de la drosophile, ne possédant pas d'autres types de filament intermédiaire. Il existe plusieurs isoformes de lamines : la lamine de type-A (Lamine A et C) codée par le gène *LMNA* chez les vertébrés et par le gène *Lamin C* chez la drosophile ; les lamines de type-B (Lamine B1 et B2), codées par les gènes *LMNB1* et *LMNB2* chez les vertébrés et par le gène *Dm0* chez la drosophile (de Leeuw, Gruenbaum and Medalia 2018, Lyakhovetsky and Gruenbaum 2014). Les lamines de type-B sont ubiquitaires alors que les lamines de type-A ne sont présentes que dans les cellules différenciées (Pajerowski et al. 2007). La structure des différentes lamines est similaire dans le sens où elles possèdent chacune une tête en N-terminal, une tige centrale et une queue en C-terminal (de Leeuw et al. 2018). La lamine étant localisée dans le noyau, elle est le seul filament intermédiaire à posséder une séquence signal contrôlant sa localisation nucléaire (NLS : nuclear localization signal) (Herrmann and Aebi 2016). Chaque isoforme de lamine va subir des modifications post-traductionnelles nécessaires à leur maturation (des farnesylations, des méthyl-estérifications,

des phosphorylations, des sumoylations et enfin des glycosylations) permettant de les différencier (de Leeuw et al. 2018). Les lamines de type-B sont toujours associées par leur extrémité C-terminal à la membrane interne alors que les lamines de type-A peuvent perdre ce domaine d'interaction à la membrane lors de leur maturation et se retrouver dans le nucléoplasme (Rusiñol and Sinensky 2006). Les lamines possèdent un domaine de dimérisation et vont pouvoir former des filaments aboutissant à la formation d'un réseau. Cependant, chaque type de lamine forme des maillages distincts à la périphérie du noyau sous l'enveloppe nucléaire. Par ailleurs, les lamines ont la faculté d'interagir avec diverses protéines situées soit dans la membrane interne soit à la périphérie du noyau, notamment la chromatine ou d'autres constituants du nucléosquelette tel que les Spectrines et la Titin (Adam 2017). En effet, les lamines possèdent des domaines d'interaction pour les histones (protéines impliquées dans l'organisation de la chromatine), ce qui permet à la lamine de contrôler le niveau de compaction de la chromatine et donc de contrôler l'expression des gènes. La chromatine à proximité de la lamine est de l'hétérochromatine c'est-à-dire de la chromatine condensée, empêchant la transcription des gènes situés dans cette zone du génome (Guerreiro and Kind 2019).

Cependant, le rôle principal des lamines est structural. Il est responsable de la rigidité du noyau, lui donnant sa morphologie qui peut varier selon le type cellulaire (Skinner and Johnson 2017). Les lamines forment, en effet une sorte de cage élastique à l'intérieur du noyau, lui permettant de maintenir sa forme et le protégeant des contraintes mécaniques qu'il subit. Par conséquent, des mutations dans les gènes codant pour les lamines de type A provoquent des maladies regroupées sous le terme de laminopathies (Hah and Kim 2019). Ces maladies sont caractérisées par la présence de noyaux déformés aux formes irrégulières, ce qui a des conséquences sur la viabilité des cellules (Lammerding et al. 2006).

Ainsi, la lamine contrôle la morphologie et les propriétés mécaniques du noyau, ce qui peut *in fine* réguler l'expression génique afin de modifier le comportement cellulaire. La transmission des forces au noyau nécessite le couplage du cytosquelette au réseau de lamine. Pour ce faire, il existe un complexe protéique reliant les différents types de cytosquelette au nucléosquelette : le LINC.

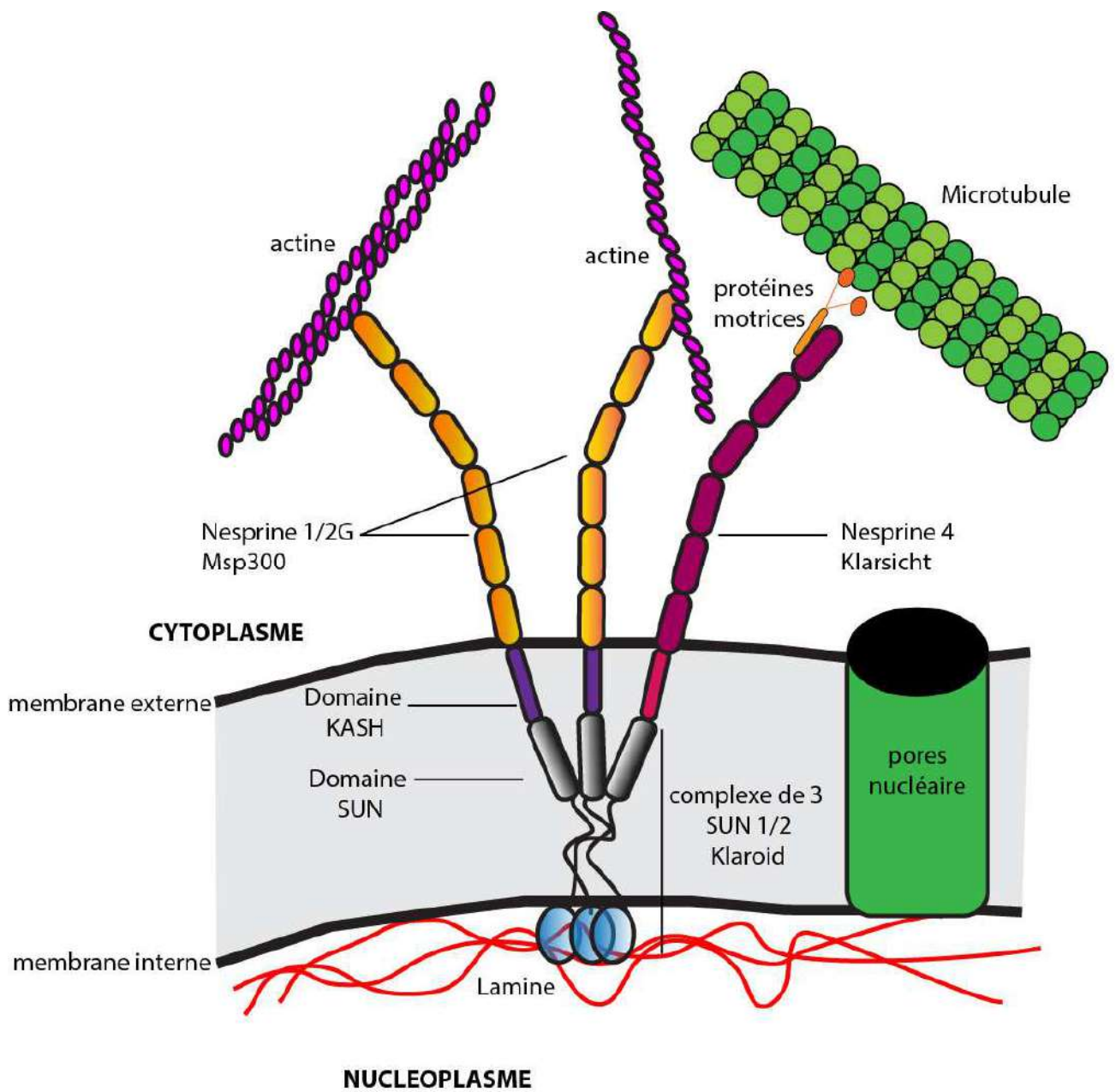


Figure 18. Schéma du complexe LINC.

Adapté de (Lee and Burke 2018)

3.2.2. Le complexe LINC forme un pont entre le cytosquelette et le nucléosquelette.

Le complexe LINC, de l'anglais « Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton », est composé de deux protéines principales : les Nesprines (ou protéines à domaine KASH), situées dans la membrane externe de l'enveloppe nucléaire, et les protéines à domaine SUN, dans la membrane interne du noyau (**Figure 18**). C'est l'interaction de ces deux protéines qui va permettre le lien mécanique entre le noyau et le cytosquelette, important dans divers processus cellulaires tels que le mécano-transduction et le positionnement nucléaire.

Les Nesprines (Nuclear envelope spectrin repeat protein) sont les protéines de la membrane externe du noyau qui vont pouvoir lier le cytosquelette directement ou indirectement grâce à leur extension cytoplasmique (Lee and Burke 2018, Zhang et al. 2001). Il existe cinq nesprines chez les mammifères (Nesprines 1G, 2G, 3, 4 et KASH 5), trois chez *C. elegans* (ANC-1, UNC-83, ZYG-12) (Lee and Burke 2018) et seulement deux chez la drosophile (Klarsicht et MSP300) (Zhang et al. 2002, Mosley-Bishop et al. 1999) . Elles diffèrent par le nombre de répétitions des domaines spectrines et du domaine de liaison au cytosquelette (Zhang et al. 2001, Cartwright and Karakesisoglou 2014). Les Nesprines géantes 1G et 2G peuvent lier l'actine et les microtubules, directement ou par l'intermédiaire de protéines motrices (Lee and Burke 2018). Les Nesprines 3 lient les filaments intermédiaires (Wilhelmsen et al. 2005), les Nesprines 4 et la KASH 5 lient les microtubules par l'intermédiaire des Kinésines et Dynéines respectivement (Roux et al. 2009, Morimoto et al. 2012). Chez la drosophile Klarsicht interagit également avec les microtubules par l'intermédiaire des protéines motrices (Gaspar et al. 2014) alors que MSP300 interagit avec l'actine (Zhang et al. 2002). Les Nesprines possèdent toutes une extrémité C-terminale caractéristique très conservée qui contient systématiquement un domaine KASH (Klarsicht, ANC-1, Syn Homology). Ce domaine particulier est situé dans l'espace périnucléaire afin de lier la deuxième moitié du complexe LINC composée par les protéines à domaine SUN (**Figure 18**). Les protéines SUN (Sad1, UNC-84), initialement caractérisées chez le nématode *C. elegans* (Malone et al. 1999), sont conservées au cours de l'évolution. Elles sont insérées dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Elles possèdent un domaine SUN dans l'espace périnucléaire et un domaine intranucléaire permettant de lier les lamines (**Figure 18**). Il existe

cinq protéines SUN chez les mammifères (Horn 2014). SUN1 et SUN2 sont les deux principales protéines SUN dans les cellules somatiques et sont partiellement redondantes (Hodzic et al. 2004, Lei et al. 2009, Zhang et al. 2009a). Il y a également deux protéines SUN chez la drosophile mais seule Klaroide est exprimée dans toutes les cellules somatiques (Kracklauer et al. 2007), Spag4 étant spécifiquement exprimée dans les cellules germinales chez le mâle (Kracklauer et al. 2010). Les SUN s'ancrent aux lamines par leur extrémité N-terminale (Crisp et al. 2006, Haque et al. 2006). Leur extrémité C-terminale, dans l'espace périnucléaire, va alors interagir avec le domaine KASH des Nesprines. Les protéines SUN vont former des trimères afin de pouvoir lier trois domaines KASH (Sosa et al. 2012). La présence des protéines SUN dans la membrane nucléaire interne est essentielle à la localisation des protéines à domaine KASH dans la membrane nucléaire externe (Padmakumar et al. 2005). L'inhibition des deux protéines SUN est létale chez la souris ce qui indique qu'elles jouent un rôle essentiel dans le développement des organismes (Lei et al. 2009).

De multiples études ont permis de montrer que le LINC joue plusieurs rôles importants au niveau cellulaire (Lee and Burke 2018): **(1)** Le LINC permet la migration et l'ancrage du noyau dans certains types cellulaires, **(2)** il participe avec la lamine au maintien de la forme et de la rigidité du noyau, **(3)** il permet la mécano-transduction de forces du cytoplasme vers l'intérieur du noyau et **(4)** il participe à l'attachement des chromosomes mitotiques. Dans la partie suivante je vais commencer par vous expliquer le rôle du LINC dans la relocalisation nucléaire. Je décrirai ensuite les propriétés mécaniques du noyau conduisant à sa rigidité et je présenterai enfin comment le noyau peut sentir et réagir aux forces. Ces différents points étant directement en rapport avec mon projet de thèse, il est important de comprendre comment et pourquoi les forces mécaniques sont transmises au noyau.

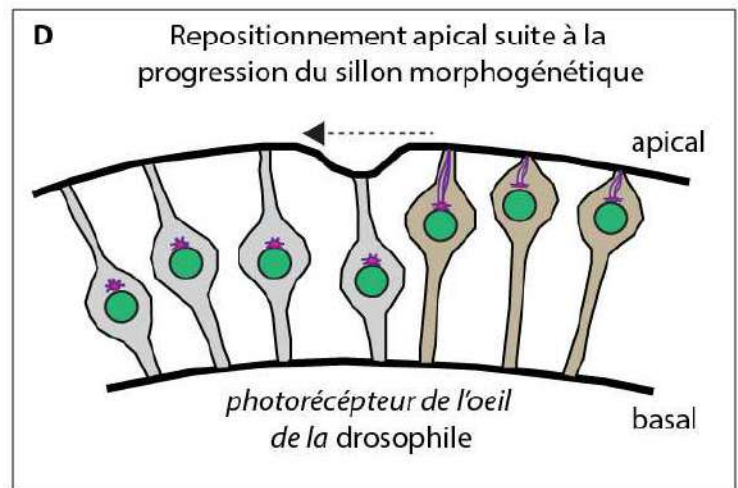
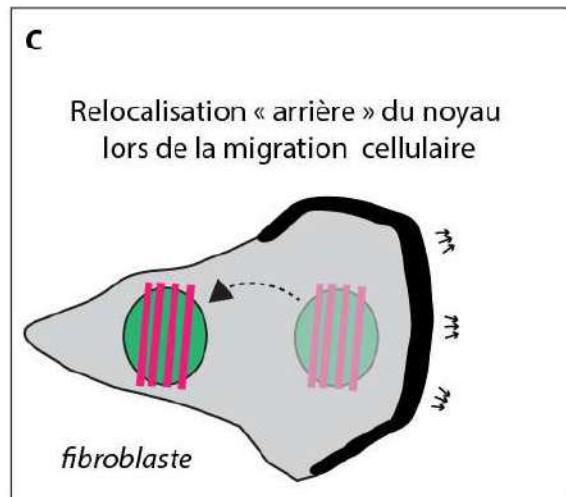
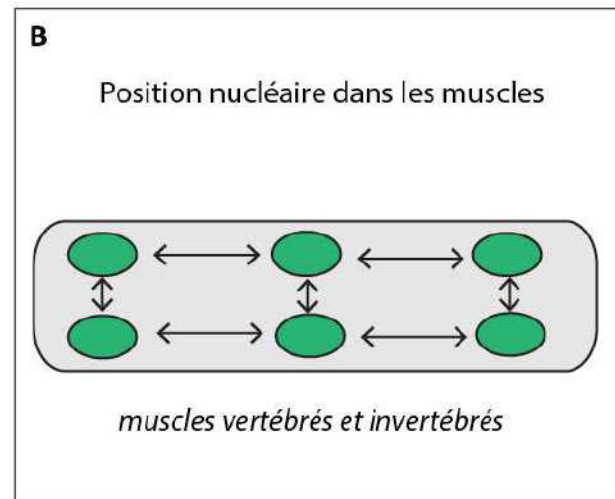
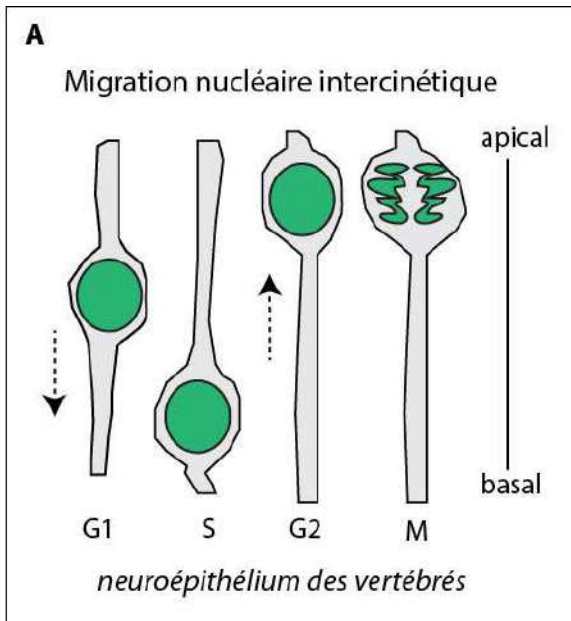


Figure 19. Différents processus de relocalisation nucléaire dépendant du LINC.

(A) La position du noyau change en fonction du cycle cellulaire dans les neuroblastes, lors de la mitose ils remontent vers l'apical (Flèche vers le haut en G2) puis redescendent vers le basal après la division (Flèche vers le bas en G1). **(B)** Les noyaux sont positionnés à égale distance dans les fibres musculaires (double flèches). **(C)** Les fibroblastes déplacent leur noyau vers l'arrière loin du front de migration pour qu'ils puissent avancer, ici vers la droite. **(D)** A mesure que le sillon morphogénétique dans le disque d'œil de la drosophile progresse (flèche), les noyaux des photorécepteurs matures sont repositionnés au niveau apicale de l'épithélium.

3.3. *Le noyau prend sa place : le positionnement nucléaire.*

3.3.1. Le repositionnement nucléaire dépendant du LINC.

Le noyau est, dans la majorité des cas, positionné au sein des cellules par un mécanisme actif qui va le contraindre à se déplacer. Les processus responsables de la position du noyau font fréquemment intervenir le complexe LINC. L'un des processus de repositionnement nucléaire le plus remarquable est mis en jeu lors du développement du système nerveux des vertébrés. La position du noyau dans les neuroblastes varie selon les phases du cycle cellulaire (**Figure 19A**). Ce phénomène, décrit en 1935, est nommé migration intercinétique (Sauer 1935). Le noyau, situé en basal des neuroblastes en interphase, va migrer vers le pôle apical lorsque la cellule entre en mitose. Une fois le neuroblaste divisé, le noyau va être de nouveau relocalisé au pôle basal des cellules (Zwaan, Bryan and Pearce 1969). Dans certains contextes, ce sont les microtubules qui vont garantir le déplacement du noyau en faisant intervenir la Kinésine pour la migration basale et la Dynéine pour la migration apicale (Tsai et al. 2010). Dans d'autres types cellulaires c'est l'actine qui coordonne la dynamique nucléaire (Spear and Erickson 2012). Aussi, des mutants des protéines SUN et KASH, qui affectent le développement du cerveau montrent que le LINC est important pour la position correcte du noyau dans le neuroépithélium (Zhang et al. 2009a). Finalement, un mauvais positionnement nucléaire peut être à l'origine de pathologies neuronales mais aussi musculaires.

Les muscles sont des syncytiums renfermant jusqu'à une centaine de noyaux, répartis à égale distance tout le long de la fibre musculaire (**Figure 19B**). Cette répartition stéréotypée des noyaux suggère donc un positionnement nucléaire finement régulé. Par exemple, une expérience réalisée chez la drosophile montre qu'une perte de fonction de l'un des membres du complexe LINC conduit à une mauvaise position des noyaux dans les muscles. Ils se retrouvent regroupés au centre du muscle alors que normalement ils sont répartis de façon équidistante le long de la fibre musculaire. Les larves mutantes pour le complexe LINC se déplacent plus lentement que des larves contrôles, mettant en évidence l'importance du contrôle de la localisation nucléaire (Elhanany-Tamir et al. 2012). De plus, une autre étude chez la drosophile suggère que la position des noyaux dépendante du LINC dans les muscles est nécessaire à l'assemblage des sarcomères, l'unité fonctionnelle permettant la génération des forces pour la contraction des muscles (Auld and Folker 2016). L'importance du

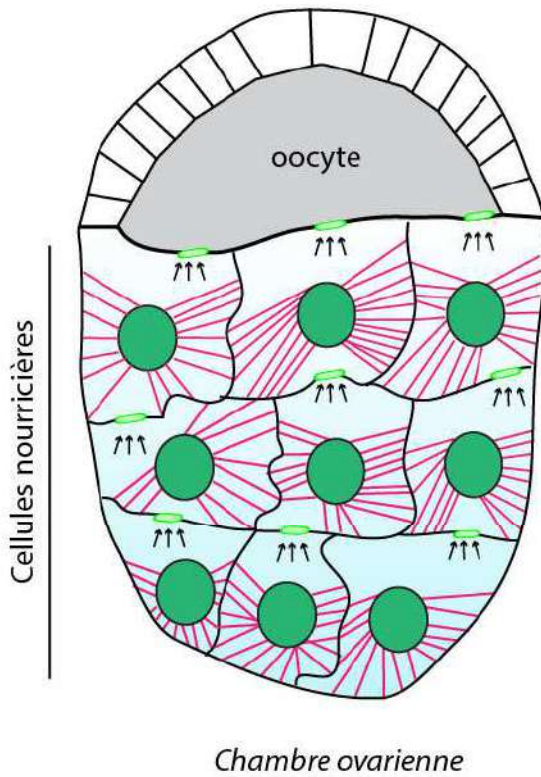
positionnement nucléaire est conservée à travers les espèces (Stroud et al. 2017, Elhanany-Tamir et al. 2012). En effet, des mutations dans certains gènes codant pour des membres du LINC sont responsables de myopathies chez l'homme. Ainsi, le LINC joue un rôle important dans le fonctionnement des fibres musculaires.

La position des noyaux est également importante pour la migration des fibroblastes. Afin d'avancer sur sa trajectoire, ces cellules vont relocaliser leur noyau loin du front de migration grâce à la formation de câbles d'actine connectés à la face dorsale du noyau (**Figure 19C**). La suppression de la fonction des protéines KASH (par expression d'un dominant négatif) ou des molécules SUN2 et la Nesprine-2 (par interférence à l'ARN) empêchent la relocalisation du noyau loin du front de migration. Les fibroblastes ne sont alors plus capables de migrer, montrant l'implication du complexe LINC dans ce processus (Luxton et al. 2010). Il a été proposé que la position du noyau à l'arrière du front de migration puisse servir de guide au fibroblaste. Le noyau exercerait une rotation grâce au cytosquelette, ce qui permettrait au fibroblaste de prendre une direction (Maninová et al. 2013, Maninová, Iwanicki and Vomastek 2014).

Ainsi, ces différents exemples montrent que le complexe LINC joue un rôle essentiel dans le repositionnement nucléaire dans de nombreuses cellules, un prérequis au bon fonctionnement des cellules dans de nombreux processus.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à la protéine Klarsicht. Klarsicht est la protéine KASH de la drosophile coopérant avec les microtubules (Mosley-Bishop et al. 1999, Fischer et al. 2004). Le gène codant pour Klarsicht est composé de 18 exons donnant naissance à plusieurs isoformes par épissage alternatif (Fischer et al. 2004, Guo, Jangi and Welte 2005). Dans un premier temps, il a été découvert que cette protéine était essentielle au transport bidirectionnel des vésicules lipidiques dans l'embryon (Welte et al. 1998). En temps normal, les vésicules situées au centre de l'embryon migrent le long des microtubules vers la périphérie de celui-ci. Or, lorsque Klarsicht est absent, les vésicules restent dans le centre de l'embryon, empêchant un développement correct de celui-ci (Welte et al. 1998). Certaines isoformes de Klarsicht possèdent donc un domaine de liaison aux vésicules lipidiques, le domaine LD. Klarsicht peut alors faire le lien entre les microtubules et les gouttelettes lipidiques et ainsi permettre leur relocalisation (Guo et al, 2005). D'autres isoformes de Klarsicht possèdent un domaine KASH en C-terminale à la place du domaine LD,

Les cellules nourricières ancrent leur noyau loin des canaux intercellulaires.



Relocalisation du noyau de l'oocyte

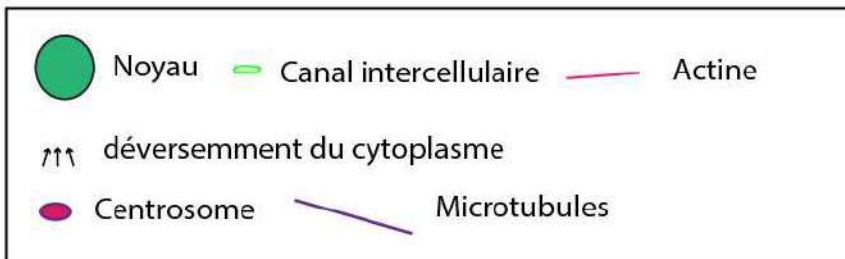
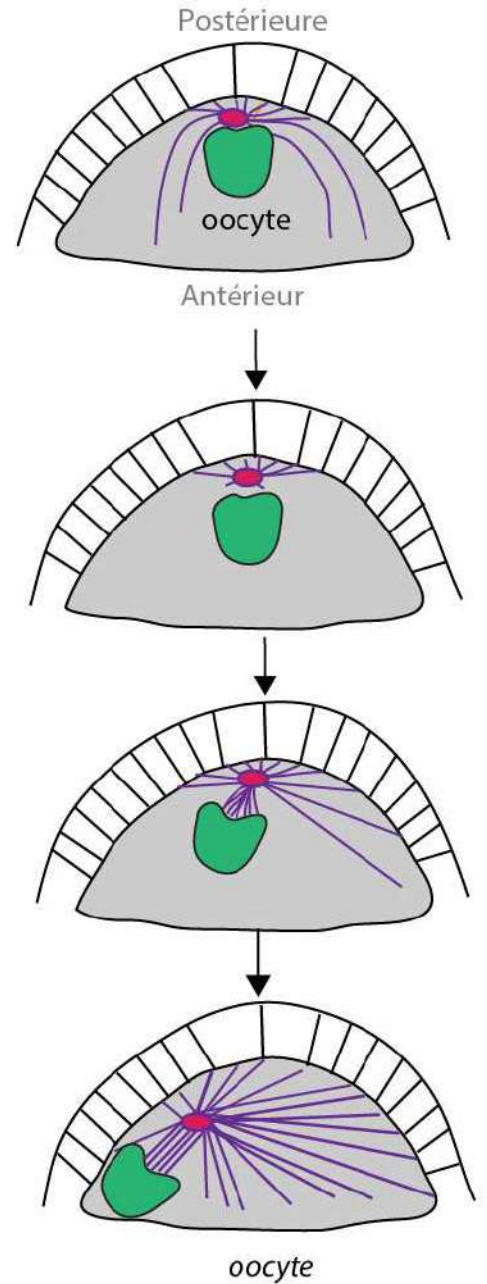


Figure 20. Différents processus de relocalisation nucléaire indépendant du LINC dans la chambre ovarienne de la drosophile.

(A) Les cellules nourricières ancrent leur noyau loin des canaux afin de verser leur contenu dans l'oocyte. **(B)** Les microtubules grandissent depuis le pôle postérieur et poussent le noyau vers le pôle antérieur de l'oocyte.

localisant Klarsicht dans l'enveloppe nucléaire (Mosley-Bishop et al. 1999, Patterson et al. 2004, Fischer et al. 2004). Klaroid, la protéine SUN somatique, est également requise pour la localisation de Klarsicht à l'enveloppe nucléaire (Kracklauer et al. 2007). Nous avons précédemment vu que le LINC joue un rôle dans la localisation des noyaux des muscles chez la drosophile (Elhanany-Tamir et al. 2012, Wilson and Holzbaur 2012, Volk 2013). Klarsicht est indispensable à cette fonction. Il est également requis lors de la morphogénèse de l'œil. Bien que le mutant nul du gène *klarsicht* soit viable, la mouche adulte présente des yeux malformés. Dans ce contexte, les photorécepteurs ne se différencient pas correctement. Des études ont mis en évidence la raison de ce phénotype. Au stade larvaire, en contexte sauvage, un centre signalisateur appelé « sillon morphogénétique » se déplace à travers l'épithélium précurseur de l'œil adulte. A mesure que le sillon morphogénétique progresse, le noyau des photorécepteurs va migrer du pôle basal vers le pôle apical, ce qui est nécessaire pour induire la différenciation en photorécepteurs matures (**Figure 19D**). Un tel mouvement baso-apical est aboli dans les mutant *klarsicht* (Patterson et al. 2004, Fischer et al. 2004), bloquant ainsi la différenciation, ce qui perturbera la morphogénèse de l'organe adulte.

3.3.2. Le LINC parfois dispensable.

Le positionnement nucléaire dépendant du LINC est requis au cours du développement dans divers types cellulaires, pour la migration, la division ou encore l'homéostasie tissulaire. Cependant, le complexe LINC n'est pas toujours requis dans ces différents processus. Parfois, le cytosquelette seul peut contrôler le déplacement du noyau. C'est le cas lors de l'ovogenèse chez la drosophile. La chambre ovarienne est composée d'une cellule œuf, l'oocyte, et des cellules nourricières. Les cellules nourricières et l'oocyte forment un syncytium. Leurs cytoplasmes sont interconnectés grâce à des canaux, ce qui sert aux cellules nourricières à expulser leur contenu cytoplasmique dans l'oocyte. En effet, les cellules nourricières produisent les ARN messagers et les protéines qui doivent être déposés dans l'oocyte (Becalska and Gavis 2009). Le noyau des cellules nourricières étant très volumineux, il doit être spécifiquement éloigné des canaux afin de ne les pas obstruer : la position et l'ancrage nucléaire est dans ce cas primordial (**Figure 20A**). Pour ce faire, les cellules nourricières vont former des câbles d'actine (ressemblant à des filopodia) émanant des jonctions adhérentes. Ceux-ci vont maintenir fermement le noyau au centre des cellules, l'empêchant d'obstruer les

canaux. Dans ce cas, l'absence du LINC n'a pas d'effet (Huelsmann, Ylänne and Brown 2013). La formation de ces câbles d'actine dépend de l'E-Cadhérine et du régulateur de la dynamique de l'actine Enabled aux jonctions adhérentes, mais les mécanismes d'ancrage au noyau n'ont pas été identifiés.

Dans l'oocyte le positionnement du noyau est aussi indépendant du LINC car sa position n'est pas affectée par la combinaison de mutations pour *klarsicht* et *MSP300* (Technau and Roth 2008). Dans ce contexte, les microtubules provoquent un changement de position du noyau. Les microtubules croissent du postérieur vers l'antérieur de l'oocyte et poussent le noyau (Zhao et al. 2012, Tissot et al. 2017) (**Figure 20B**). De manière intéressante, la croissance des microtubules corrèle avec une indentation locale du noyau, à l'arrière de celui-ci. Cela suggère que le noyau est « poussé » par les microtubules. Des expériences d'ablation laser ont été réalisées afin de sectionner les microtubules et d'observer le comportement du noyau. Les résultats ont montré que la migration du noyau dans l'oocyte est perturbée suite à l'ablation laser, et que l'indentation locale du noyau est perdue (Zhao et al. 2012, Tissot et al. 2017). Ces observations montrent que le noyau peut être déformé par des forces mécaniques.

3.4. *Le noyau sensible à la force.*

3.4.1. Les forces qui déforment le noyau.

Le noyau est en permanence soumis à des stress mécaniques. Ces forces générées par le cytosquelette d'actine ou de microtubules vont pousser ou tirer sur le noyau avec ou sans l'intervention du LINC. Elles provoquent alors son déplacement et/ou sa déformation. En effet, le noyau adopte une forme et une taille en fonction de sa rigidité et de son environnement. Parfois, dans les cas les plus extrêmes où la force appliquée sur le noyau est trop forte, l'enveloppe nucléaire peut se rompre (Thiam et al. 2016). Il est donc intéressant de comprendre comment le noyau résiste et réagit aux forces auxquelles il est soumis. Cette capacité physique du noyau à résister aux forces dépend de sa rigidité. La rigidité du noyau est notamment offerte par le nucléosquelette de lamines (voir section 3.2.1) et d'autres molécules telles que le LINC et la chromatine (Maurer and Lammerding 2019). Les différentes études que je vais vous présenter m'ont aidée à comprendre le rôle du noyau dans la morphogenèse.

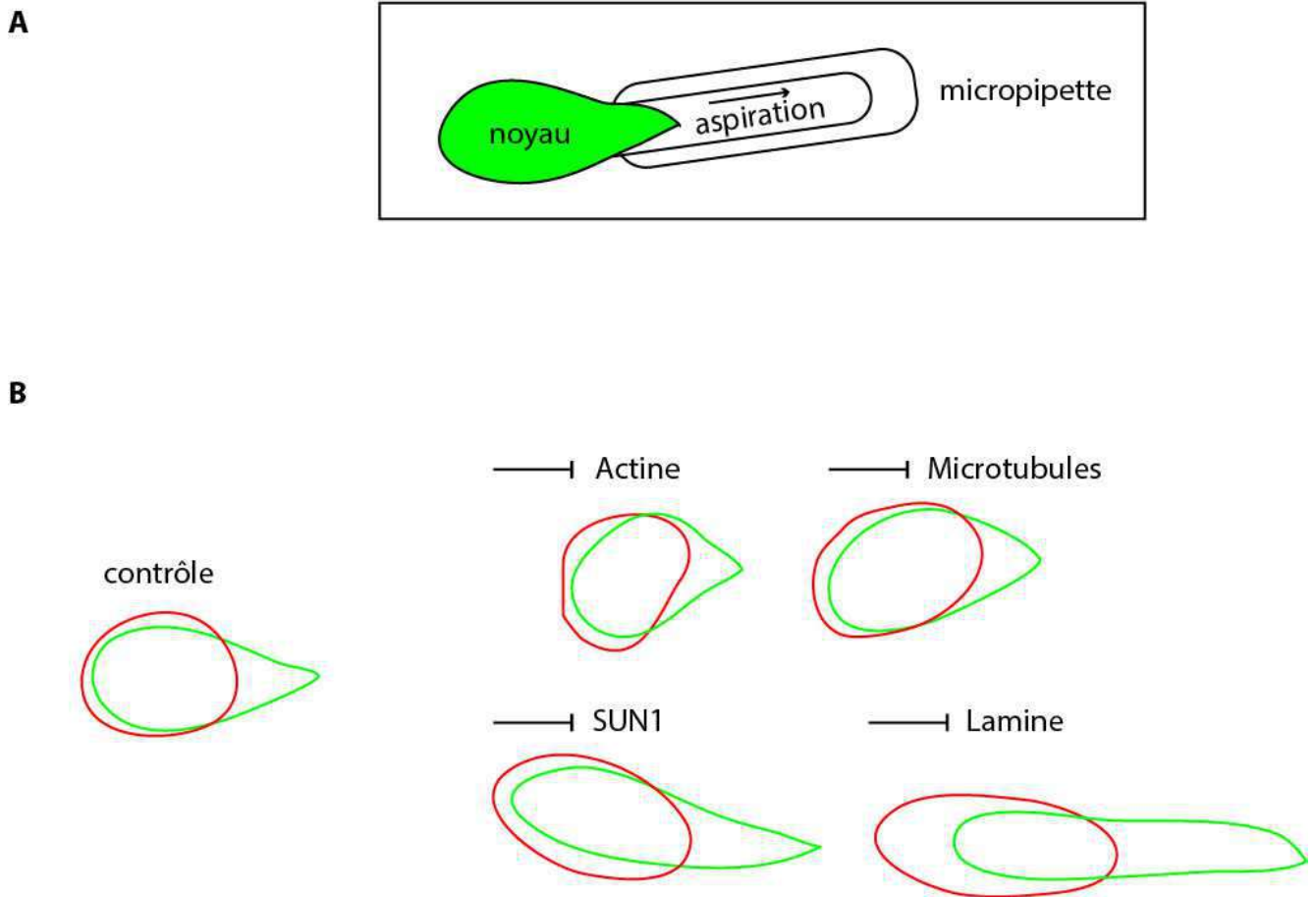


Figure 21. Mesure de la rigidité du noyau par aspiration.

(A) Le schéma encadré représente l'aspiration du noyau par une micropipette. (B) Les schémas suivant représentent les expériences d'aspiration de noyau dans divers contextes. Les noyaux dessinés en rouge représentent la forme nucléaire avant aspiration, ceux en vert représentent la forme du noyau pendant l'aspiration. Résultats tirés et adaptés de (Neelam et al. 2015). Le noyau est déformable en absence de Sun1 ou de Lamine mais ses propriétés ne sont pas affectées par les cytosquelettes d'actine ou de microtubules.

Afin de mieux comprendre comment le noyau se comporte face à des stress mécaniques intra- et extracellulaire, les chercheurs ont mis au point des méthodes permettant d'analyser et de mesurer la résistance aux forces de l'enveloppe nucléaire et l'intensité des forces à la surface de noyaux isolés (Lele, Dickinson and Gundersen 2018). La première expérience a été mise en œuvre il y a presque vingt ans, elle consiste à aspirer un noyau isolé à l'aide d'une micropipette. L'aspiration par la micropipette exerce une force de traction sur la surface du noyau. Au cours de cette expérience les auteurs ont pu observer un allongement de l'enveloppe nucléaire au cours du temps jusqu'à atteindre un état maximal ou d'équilibre (Guilak 2000). L'intensité de la force de traction nécessaire à la déformation du noyau a ensuite été précisément mesurée à la surface de celui-ci. Quelques nNewton (de l'ordre de 2nN) suffisent à déformer le noyau, lors de l'attachement de la micropipette, puis la déformation du noyau s'intensifie avec l'augmentation de la force d'aspiration. De plus, la déformation du noyau est réversible : à la fin de l'expérience, lorsque la micropipette est retirée, l'enveloppe nucléaire se rétracte et retrouve sa forme initiale en quelques secondes (Neelam et al. 2015). Les résultats de ces analyses montrent que l'enveloppe nucléaire est étirable, autrement dit élastique, comme si elle était « un amortisseur moléculaire » de forces (Dahl et al. 2004, Neelam et al. 2015). Cependant, d'autres expériences du même type ont montré que le noyau pouvait se comporter de manière non élastique c'est-à-dire garder une forme anormale après aspiration (Pajerowski et al. 2007). Cette propriété doit certainement dépendre de la nature moléculaire de l'enveloppe nucléaire (Hampoelz and Lecuit 2011).

Puisque les propriétés mécaniques du noyau sont supposées dépendre du nucléosquelette, des expériences sur cellules en culture ont été réalisées afin de tester cette hypothèse. Les expériences d'aspiration nucléaire ont donc été réalisées (**Figure 21A**), cette fois sur des noyaux dont les niveaux de lamine sont réduits. Ces expériences montrent que les noyaux sont nettement plus déformables et beaucoup moins résistants au déplacement en absence de lamine que les noyaux contrôle. Un comportement nucléaire similaire est observé en absence des protéines SUN. La lamine est donc importante pour le maintien de la forme du noyau et les protéines SUN semblent coopérer avec elle pour le maintien de la rigidité (**Figure 21B**). De manière surprenante, les protéines KASH ne semblent pas avoir d'importance dans la rigidité de l'enveloppe nucléaire dans ces conditions. Dans ces expériences, l'inhibition de l'actine et des microtubules par des drogues n'a pas d'impact : l'aspiration de l'enveloppe nucléaire cause une déformation proche de celle obtenue dans le contrôle. Le cytosquelette

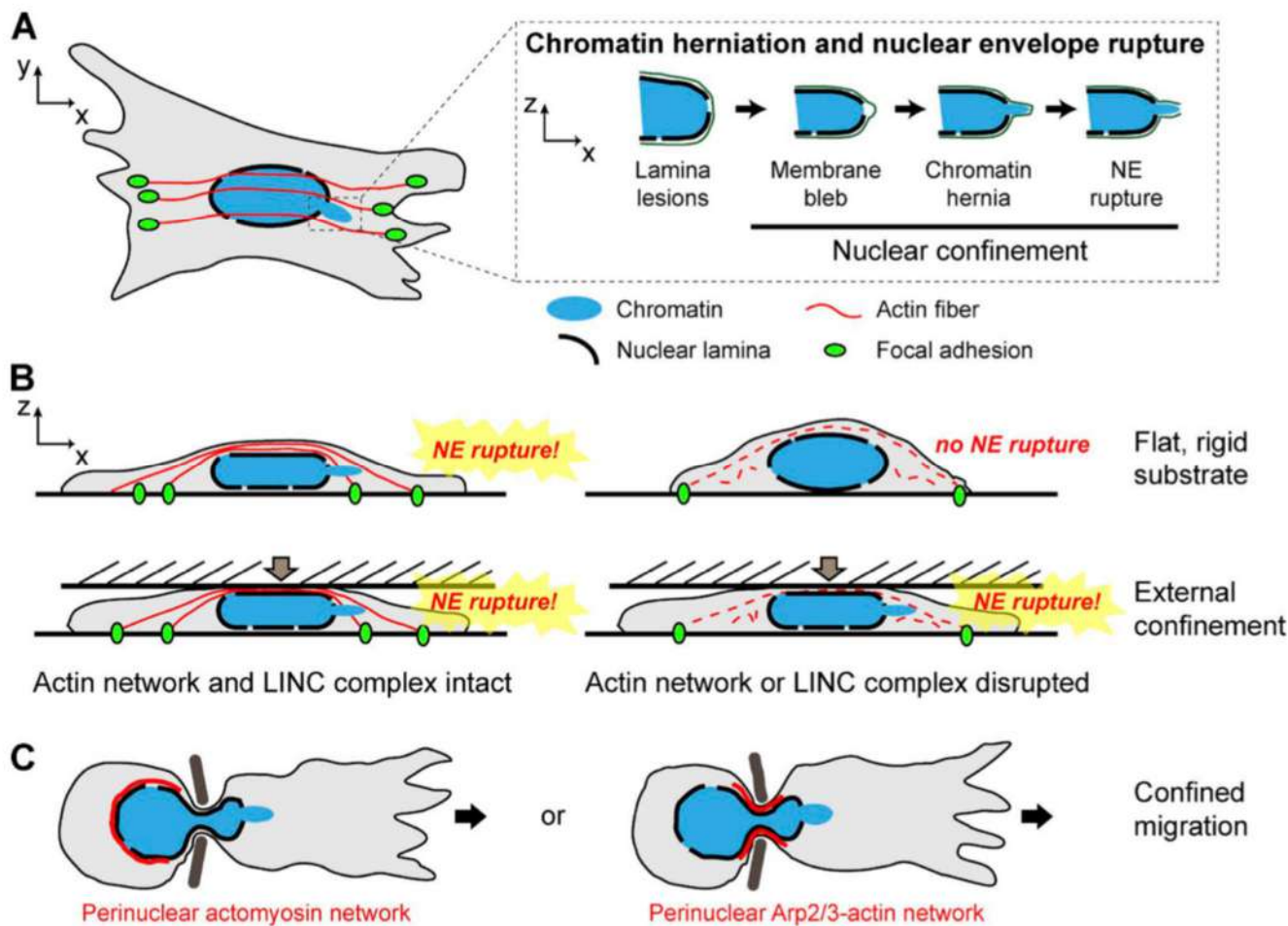


Figure 22. La compression du noyau provoque une rupture de l'enveloppe nucléaire.

(A) La rigidité du substrat est transmise par les fibres d'actine qui compriment le noyau induisant une rupture de l'enveloppe nucléaire et une hernie de la chromatine. (B) En haut à gauche, c'est une représentation d'une vue sagittale d'une cellule adhérente contrôle. En haut à droite, en absence du LINC ou d'actine le membrane nucléaire (NE : « Nuclear envelope ») reste intacte. En bas, une force de compression externe induit une rupture de l'enveloppe avec ou sans actine et avec ou sans complexe LINC. (C) Confinement nucléaire lors de la migration des cellules à travers des conduits à faible diamètre. A gauche, l'acto-myosine (rouge) pousse le noyau pour passer dans l'espace restreint. A droite, le complexe Arp2/3 régit la polymérisation de l'actine pour supporter la déformation induite par le passage confiné. Ces deux évènements peuvent se faire simultanément lors de la migration cellulaire. D'après (Lammerding and Wolf 2016).

ne semble donc pas influencer les propriétés mécaniques intrinsèques du noyau (**Figure 21B**). Ainsi, ces travaux montrent que le comportement du noyau face à des forces de traction peut varier en fonction de la nature biochimique de l'enveloppe nucléaire (Neelam et al. 2015).

Par ailleurs les cellules doivent également faire face à des forces de compression, où le noyau va adapter sa forme en fonction de celle des cellules (**Figure 22**). Par exemple, l'étalement ou l'étirement de la cellule va exercer une pression sur le noyau et il va s'étendre par aplatissement (Li et al. 2015). Au contraire lorsque des cellules adhérentes se détachent de leur support, elles vont s'arrondir et le noyau aussi (Lele et al. 2018).

Une autre étude sur la forme du noyau montre que l'acto-myosine influence la forme du noyau. En effet, lorsque le régulateur négatif de l'actine ADF/Cofiline est inhibé, les noyaux ont une forme irrégulière, certains allant jusqu'à former des bourgeonnements. Les auteurs ont montré que l'absence d'ADF/Cofiline entraîne une sur-activation de Rock, un activateur de la myosine, conduisant finalement à une augmentation de la contractilité de l'acto-myosine. Ainsi, une trop forte pression sur le noyau provoque des déformations, suggérant que l'acto-myosine doit être finement régulée de manière à exercer une force « supportable » par le noyau (Wiggan et al. 2017).

Etant donné la sensibilité du noyau aux forces d'étirement et de compression, quelle est la limite de résistance de la membrane nucléaire ? Certaines équipes de recherche étudient la déformation nucléaire lors de la migration des cellules. En effet, les cellules, en migrant, vont rencontrer des obstacles auxquelles elles doivent faire face. Notamment, elle vont devoir circuler dans des espaces particulièrement étroits, comme par exemple de petits capillaires, l'espace entre deux cellules endothéliales ou encore une matrice extracellulaire dense (Wolf et al. 2013). Les neutrophiles sont notamment des cellules circulantes devant emprunter des espaces étroits. Pour cela, leur noyau adopte une forme très particulière : il forme plusieurs lobes (Skinner and Johnson 2017, Salvermoser et al. 2018). D'autres cellules, moins adaptées à la migration, vont réussir à se frayer un chemin en milieu contraint grâce à leur capacité à se déformer. Elles vont « s'affiner » et, de manière surprenante, le noyau aussi (Yamauchi et al. 2005, Wolf et al. 2013). Pourtant, le noyau est volumineux et relativement rigide, il pourrait ralentir la cellule dans sa course en bloquant le passage. L'étude de la migration des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* à travers des espaces très confinés a permis de mettre en évidence que la migration cellulaire dépend de la capacité de la cellule à dégrader la matrice extracellulaire, de sa capacité à se déformer mais aussi de la déformabilité

du noyau (Wolf et al. 2013). En effet lors de la migration indépendante des MMPs, c'est la capacité du noyau à se déformer qui va permettre à la cellule de traverser un espace confiné et plus l'espace sera petit plus le noyau sera déformé (Wolf et al. 2013). Les auteurs ont observé que, lorsque le noyau s'engage dans le passage le plus étroit, il se déforme et acquière une forme de « sablier ». La déformation du noyau est dépendante de sa rigidité et une diminution de lamine offre au noyau une meilleure capacité à se déformer (Harada et al. 2014). La connexion du noyau au cytosquelette d'acto-myosine est également requise pour déformer le noyau lors de la migration confinée. Un réseau périnucléaire d'acto-myosine exerce une pression sur le noyau afin de l'écraser et de le déformer (Thiam et al. 2016). Cependant, il a été montré que le confinement d'une cellule provoque une rupture locale de l'enveloppe nucléaire, favorable à la migration dans de petits espaces, suivie de sa réparation (Denais et al. 2016). Cette rupture crée une sorte de « hernie » de la chromatine, c'est-à-dire que la chromatine sort légèrement du noyau et rentre en contact avec le cytoplasme de la cellule (Hatch and Hetzer 2016). Expérimentalement, la rupture de l'enveloppe nucléaire peut être repérée grâce à une GFP normalement nucléaire grâce à l'adjonction d'une séquence NLS (« nuclear localisation signal »). En effet, lorsque le noyau est intègre, la GFP-NLS est exclusivement nucléaire. En revanche, lorsque la rupture de l'enveloppe a lieu, il y a une fuite de la GFP-NLS dans le cytoplasme. Lors de la réparation de la membrane nucléaire, la GFP-NLS disparaît du cytoplasme et réintègre totalement le noyau (Hatch and Hetzer 2016). Au cours de ce travail, les expérimentateurs ont testé le rôle du cytosquelette dans la rupture de l'enveloppe en utilisant un agent chimique permettant de bloquer la polymérisation de l'actine (la Cytochalasine D) : en absence d'actine, il n'y a aucune rupture (Hatch and Hetzer 2016). La pression exercée par l'actine sur le noyau lors du confinement entraîne donc une rupture de l'enveloppe nucléaire (Thiam et al. 2016, Hatch and Hetzer 2016). De plus, ce phénomène est amplifié par une perte de la Lamine. En effet, l'enveloppe étant plus souple, elle est plus sujette à la rupture. Au contraire, une perte de la protéine SUN diminue l'apparition de rupture, suggérant que quand le complexe LINC n'est pas correctement assemblé, l'actine exerce une pression moindre sur le noyau (Hatch and Hetzer 2016). Ainsi, de nombreuses cellules vont rompre leur enveloppe nucléaire afin de pouvoir passer dans des espaces très restreints (**Figure 22**). Elles vont alors mettre en jeu un mécanisme de réparation une fois l'obstacle dépassé (Raab et al. 2016, Denais et al. 2016).

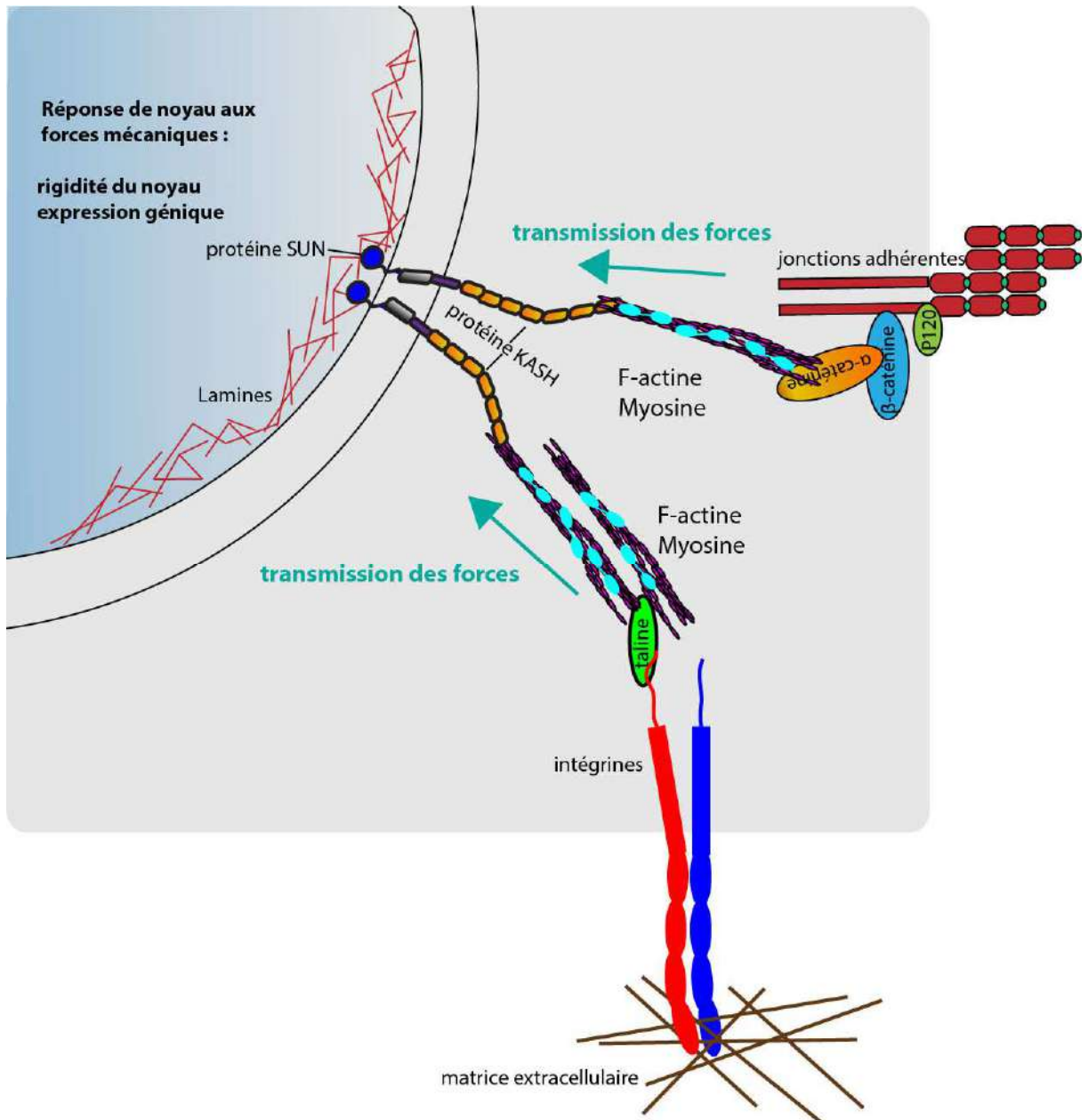


Figure 23. Les forces externes sont transmises, ressenties et intégrées par le noyau. Les forces vont être générées par l'acto-myosine couplées aux complexes d'adhérences (Intégrines et jonctions adhérentes) et transmise jusqu'au noyau grâce au couplage du cytosquelette à la Lamine par le complexe LINC (Protéine KASH et protéine SUN). Les forces sont ressenties par le noyau qui va répondre en modifiant sa rigidité et/ou l'expression génétique.

Ces études montrent que le noyau est constamment soumis à des forces, auxquelles il doit résister. Comment le noyau perçoit-il et répond-il à ces forces ? Dans la partie suivante, je décrirai comment le noyau peut ressentir les forces auxquelles il est soumis.

3.4.2. La mécano-transduction nucléaire.

Historiquement, des chercheurs ont découvert que, de manière surprenante, lorsqu'une force de traction est exercée sur les complexes d'intégrines, le noyau se déforme. En mettant en évidence le couplage physique entre les adhésions basales et le noyau, ce travail suggère que le noyau pourrait directement percevoir des forces en provenance des complexes d'adhérence (Maniotis, Chen and Ingber 1997). Ce n'est toutefois que très récemment qu'il a été découvert que le noyau se comporte tel un senseur de force. Le cytosquelette interagit via le LINC pour la transmission des forces à travers la cellule (**Figure 23**). Différentes méthodes, notamment l'utilisation des pinces magnétiques et l'élaboration d'un senseur de force FRET couplé à une Nesprine, ont permis de mesurer la capacité du noyau à répondre aux forces. La première méthode consiste, en travaillant sur noyaux isolés, à appliquer une force directement sur l'enveloppe nucléaire grâce à une bille aimantée recouverte d'anticorps dirigés contre les Nesprines. Ainsi, les pinces magnétiques vont permettre de déplacer la bille et ainsi d'imposer une force sur le noyau via les Nesprines. Les auteurs ont ainsi testé l'effet direct d'une force appliquée sur le noyau. Le premier constat de cette expérience a été que la force appliquée sur les Nesprines va induire une augmentation de la rigidité de l'enveloppe nucléaire, montrant que la force ressentie par le LINC va engendrer un changement des propriétés mécaniques du noyau. Ensuite, ils ont voulu comprendre comment la force ressentie par les Nesprines pouvait avoir un impact sur la rigidité du noyau. Ils ont remarqué que l'absence de lamine et des protéines SUN empêchait le raidissement de l'enveloppe nucléaire, indiquant que la connexion entre le LINC et la lamine est indispensable à la transmission du signal mécanique. Ils ont alors cherché à déterminer si le signal mécanique pouvait déclencher des voies de signalisation par phosphorylation. Pour cela, ils ont testé la réponse nucléaire aux forces après l'inhibition de protéines Kinases. De manière intéressante, l'absence de certaines Kinases telles que Src, Sfk et Emerin affecte effectivement la réponse du noyau aux forces (Guilluy et al. 2014). Ainsi ce travail a montré que le noyau est

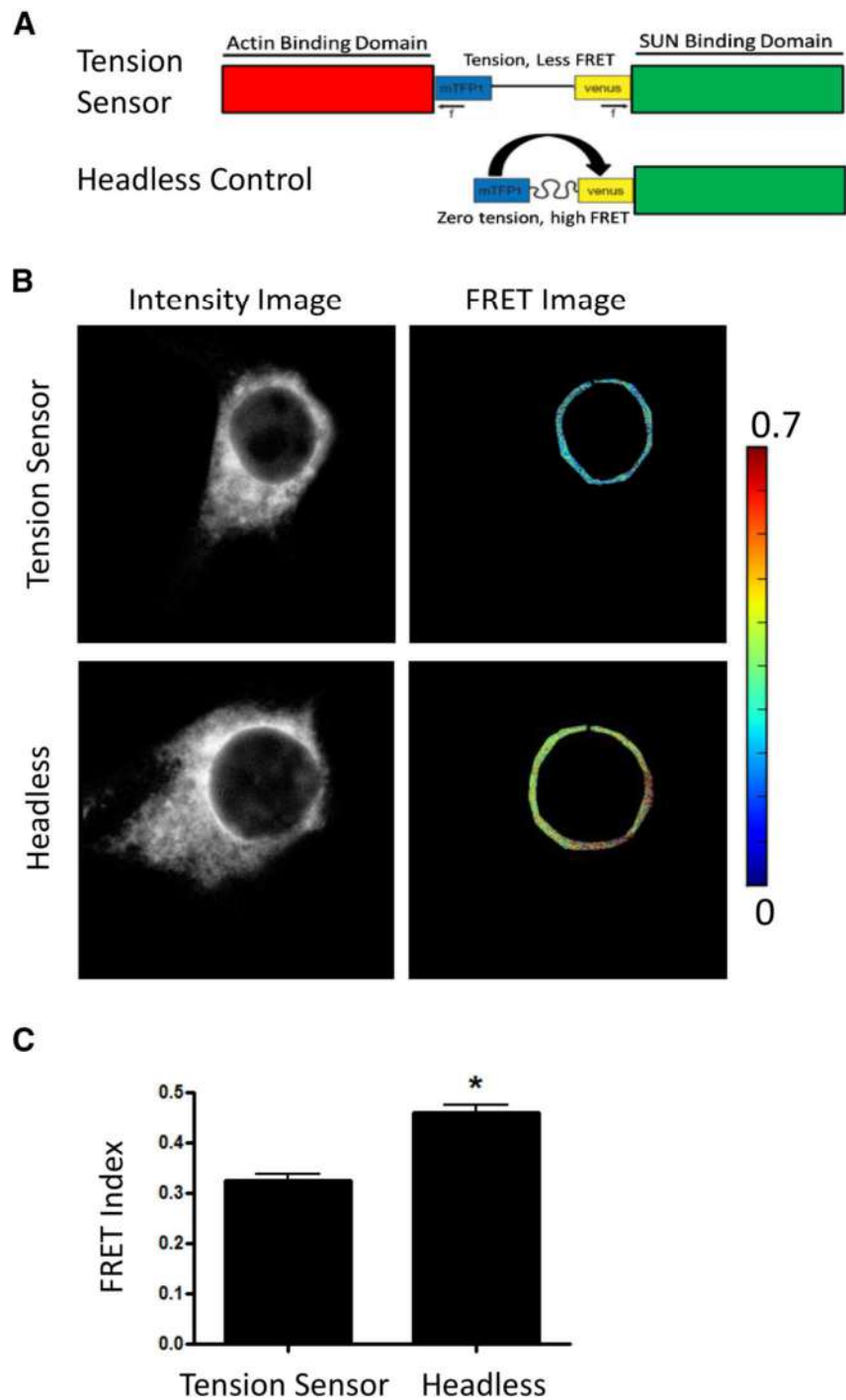


Figure 24. Le mini-Nesprin2G : l'outil pour mesurer la tension transmise au complexe LINC.

(A) Structure du senseur de tension et de son contrôle. **(B)** Test de la fonctionnalité des sondes FRET mini-Nesprine 2G. Le senseur de tension est sous tension (FRET BAS). La construction sans le domaine de liaison à l'actine n'est pas sous tension (FRET élevé). **(C)** Graphique des mesures de FRET de la construction et de son contrôle. Tiré de (Arsenovic et al. 2016).

directement sensible aux forces et qu'il va adapter sa réponse, notamment en augmentant sa rigidité, ce qui est nécessaire au maintien de sa forme par exemple (**Figure 23**).

La deuxième méthode utilisée pour mettre en évidence la transmission de forces à travers l'enveloppe nucléaire consiste en une Nesprine tenso-senseur composée d'une construction FRET artificielle (voir section 2.2.3). Cet outil est composé d'un domaine liant l'actine, du senseur de force (fluorophores CFP et YFP séparés par un lien élastique) et d'un domaine de liaison à la protéine SUN situé dans la membrane nucléaire (**Figure 24**). Après avoir vérifié l'efficacité de l'outil, nommé mini-nesprine2G, les auteurs ont testé l'activité de la myosine sur les Nesprines. L'inhibition de la myosine induit une augmentation du signal FRET montrant que le mini-nesprine2G n'est plus sous tension. En revanche une augmentation de l'activité de la myosine diminue fortement le signal FRET signifiant que l'outil est tendu par la force générée par la myosine. Autrement dit l'acto-myosine cytoplasmique transmet une force au noyau via les Nesprines. Ils ont ensuite voulu savoir si l'étalement des cellules sur un support a un effet sur la mécano-transduction nucléaire. De manière cohérente, lorsque les cellules sont adhérentes à un support, les Nesprines sont sous tension (le signal FRET est bas) contrairement aux Nesprines des cellules non adhérentes qui présentent un signal FRET élevé (Arsenovic et al. 2016). Les Nesprines sont donc sensibles aux variations de forces émises par l'acto-myosine.

Ainsi, la force est directement appliquée sur le noyau par l'intermédiaire des Nesprines. Le noyau va ensuite être capable de répondre à ces forces notamment en se raidissant. Les signaux mécaniques peuvent ainsi potentiellement agir sur l'organisation de la chromatine et l'expression des gènes. En effet, il est connu que la lamine peut réguler l'état de chromatine. La chromatine à proximité de la lamine est condensée réprimant ainsi ces zones du génome (Guerreiro and Kind 2019). La force appliquée sur le noyau va modifier l'état de la chromatine permettant ainsi l'expression de gènes initialement inaccessibles à la transcription (Maurer and Lammerding 2019, Tajik et al. 2016). La force émise sur le noyau peut aussi provoquer un écartement des pores nucléaires, augmentant leur diamètre afin de favoriser l'entrée de facteurs de transcription (Maurer and Lammerding 2019) comme par exemple le couple YAP/TAZ régulant la voie de signalisation Hippo (Elosegui-Artola et al. 2017).

La mécano-transduction nucléaire permet ainsi à la cellule d'adapter son comportement en fonction des forces auxquelles elle est soumise, en modifiant ses propriétés mécaniques et en régulant l'expression des gènes (**Figure 23**).

L'ensemble de ces données révèle de manière très intéressante les propriétés structurales et mécaniques du noyau ainsi que les forces exercées par le cytosquelette sur le noyau, modulant sa forme et sa position. Le noyau se comporte comme un élément élastique capable d'être déformé et de retrouver sa forme initiale. Dans des cas extrêmes, l'enveloppe nucléaire va se rompre mais se répare ensuite.

Ainsi, de nombreuses études s'intéressent à la relation entre les forces mécaniques et le noyau en se focalisant sur l'impact des forces sur les propriétés et la réaction du noyau. Cependant, elles n'abordent pas l'importance que pourrait avoir le noyau dans la génération des forces lors de la morphogenèse. En effet, si la dynamique de localisation du noyau lors d'évènements morphogénétiques est relativement bien caractérisée (comme par exemple lors de la migration nucléaire intercinétique ou de la relocalisation du noyau dans les photorécepteurs), la contribution propre du noyau dans la morphogenèse restait inconnue.

IV. Les forces mécaniques au service de la morphogenèse.

4.1. *Les forces planaires dans la morphogenèse épithéliale.*

Les épithéliums font preuve d'une grande plasticité. Ils vont subir des réarrangements, au cours du développement, afin d'acquérir de nouvelles formes. Les différents éléments décrits précédemment, l'acto-myosine et les complexes d'adhérences sont étroitement liés les uns aux autres. Lors de la morphogenèse, ils vont ainsi être impliqués dans la génération de forces et leur transmission au sein de la cellule afin d'engendrer des changements de forme cellulaire qui aura *in fine* une répercussion sur le forme du tissu. Dans cette sous-partie, je présenterai succinctement deux exemples de changement de forme tissulaire dans lesquels la dynamique de l'acto-myosine joue un rôle important: l'intercalation cellulaire, un processus qui permet l'allongement d'un tissu en deux dimensions (2D) et l'invagination, un processus permettant la création d'une forme en trois dimensions (3D) par la formation de plis dans l'épithélium.

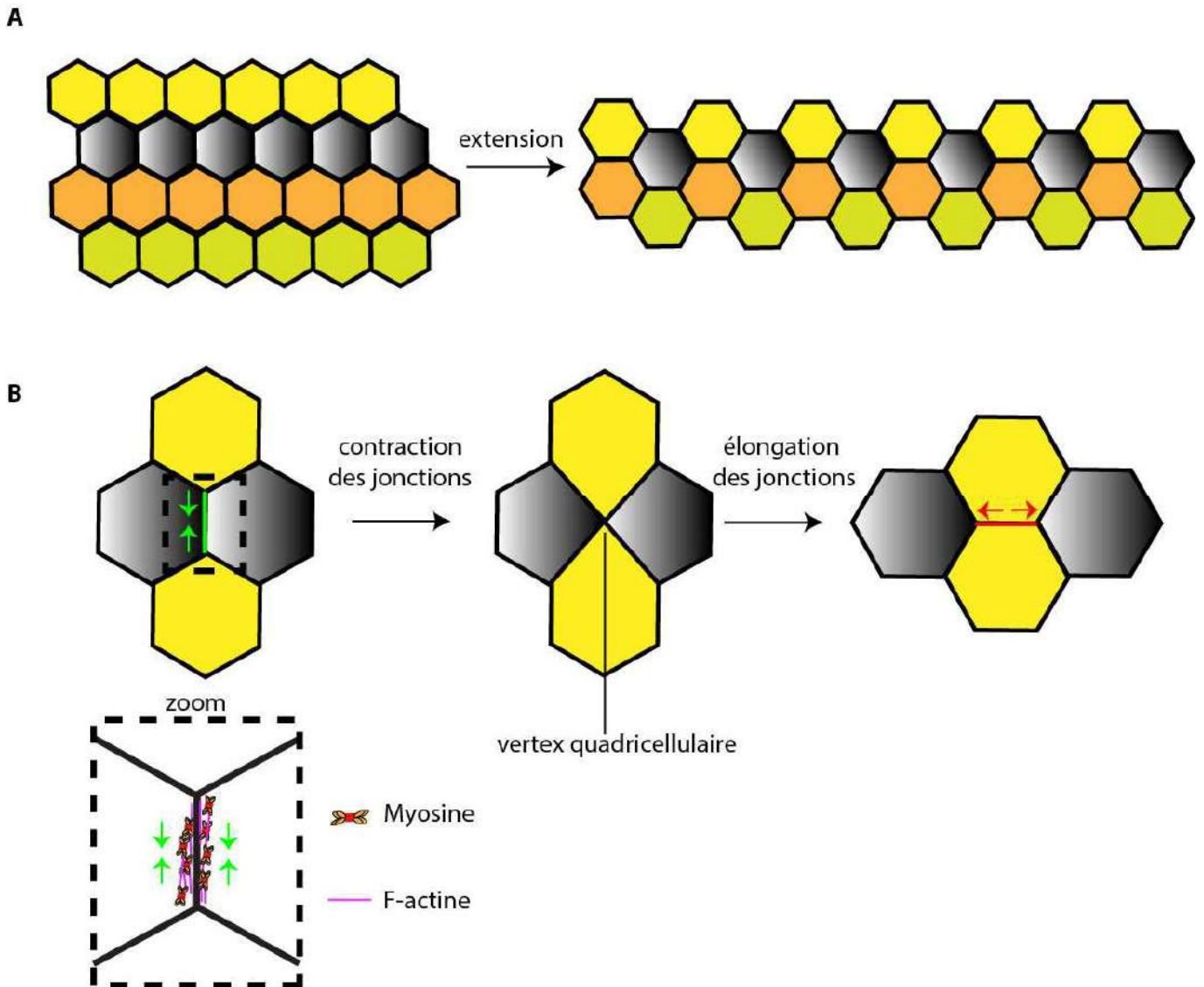


Figure 25. Changement de forme en 2D d'un épithélium causé par l'intercalation cellulaire.

(A) L'intercalation des cellules conduit à l'extension de l'épithélium. **(B)** Deux cellules voisines (cellules noires) vont réduire leur jonction commune (frontière vert), grâce à l'activité de la myosine sur ces jonctions (flèche verte et zoom). La perte de cette jonction conduit à un vertex quadricellulaire à partir duquel se forme d'une nouvelle jonction (rouge).

4.1.1. L'intercalation cellulaire : l'allongement d'un épithélium en 2D grâce à la polarité de la myosine.

L'intercalation cellulaire est un processus par lequel les cellules changent de position (et par conséquent de voisines) au sein d'un tissu et qui, lorsqu'elle est massive peut conduire à un changement de forme de l'épithélium (**Figure 25A**). Par exemple, la convergence-extension est un processus coordonné et polarisé au sein d'un tissu. Il consiste au détachement des cellules qui convergent sur le même plan, provoquant une pression et les forçant à s'intercaler les unes aux autres. Ainsi, la largeur du tissu diminue à mesure que la longueur du tissu augmente (Shindo 2018) (**Figure 25A**). Ce processus a initialement été mis en évidence chez le Xénope lors du développement de la notochorde (Keller et al. 1985, Keller et al. 2000). Il a également été montré récemment chez la souris que l'extension de l'oreille interne et le développement de la plaque neurale que l'épithélium subissent une extension convergente par une intercalation cellulaire (Williams et al. 2014) (Driver, Northrop and Kelley 2017). Il se produit aussi chez les invertébrés comme par exemple lors de l'extension de la bande germinale de l'embryon de drosophile (Bertet, Sulak and Lecuit 2004, Irvine and Wieschaus 1994, Zallen and Wieschaus 2004, Butler et al. 2009) ou encore lors de la formation des trachées et des glandes salivaires (Nishimura, Inoue and Hayashi 2007, Sanchez-Corrales, Blanchard and Röper 2018). Ainsi, l'intercalation cellulaire est un processus très conservé au cours de la morphogenèse des différentes espèces qui permet de remodeler la forme d'un tissu dans un plan 2D.

Le mécanisme cellulaire aboutissant à l'intercalation des cellules nécessite une réorganisation de la myosine et des jonctions adhérentes. En effet, l'acto-myosine va être redistribuée de manière asymétrique au niveau des jonctions adhérentes. Ainsi, elle va être polarisée afin de diriger l'intercalation des cellules dans l'axe de l'allongement de l'épithélium. Par exemple, lors de l'extension de la bande germinale, la myosine va être localisée préférentiellement sur les jonctions cellulaires parallèles à l'axe dorso-ventral. Les jonctions et les complexes adhérences vont être internalisés par endocytose. Ainsi, la contraction de la myosine et l'endocytose entraînent la diminution spécifique de ces jonctions, ce qui mène à l'apparition d'une jonction quadricellulaire instable qui se résout par la formation d'une nouvelle jonction dans l'axe antéro-postérieur entre deux cellules nouvellement voisines (**Figure 25B**) (Guillot and Lecuit 2013, Kong, Wolf and Großhans 2017).

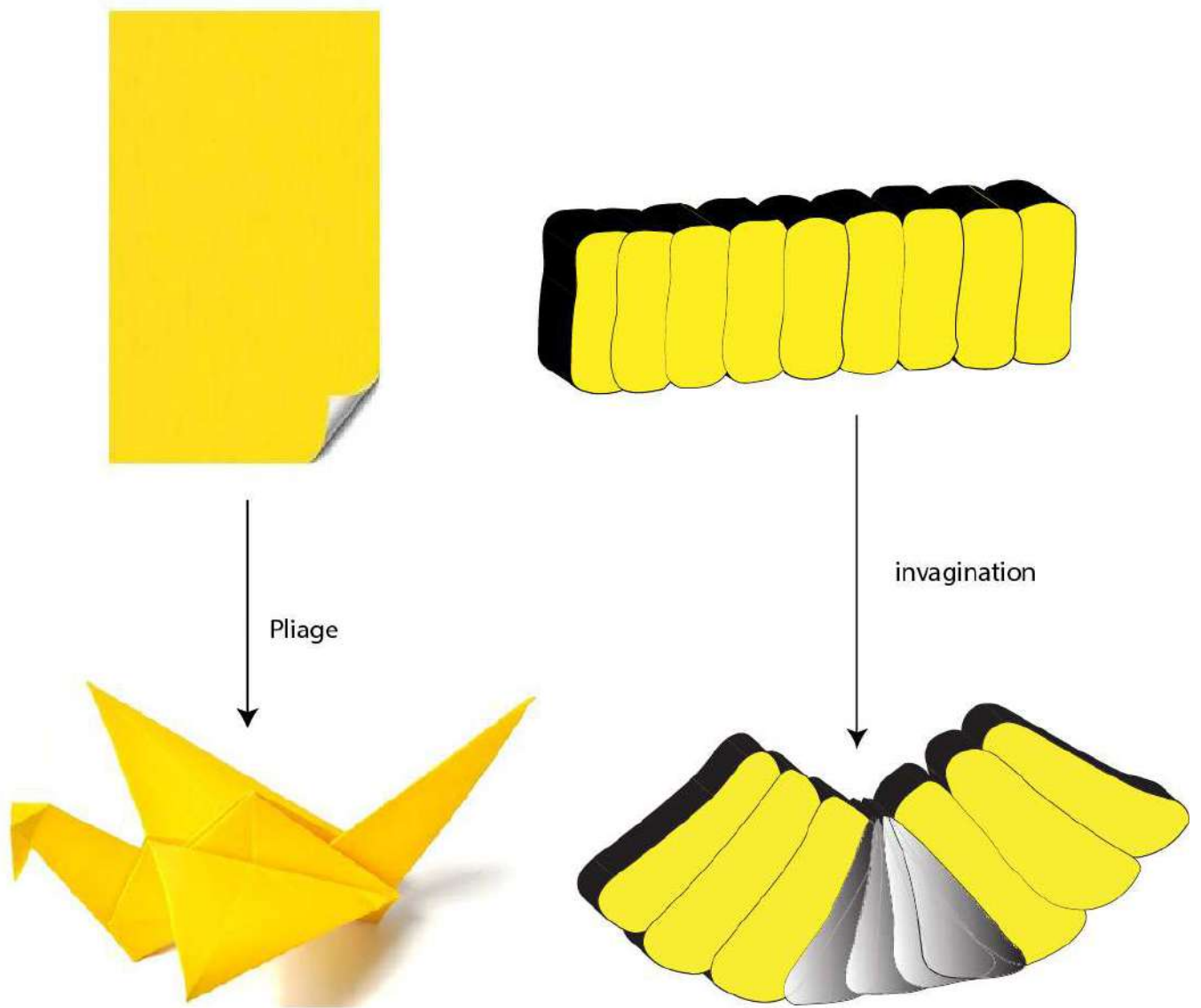


Figure 26. Acquisition d'une forme en 3D.

Parallèle entre l'origami (gauche) et l'invagination d'un épithélium (droite).

4.1.2. L'invagination : la constriction apicale initiatrice d'un changement de forme en 3D.

Cependant, les épithéliums vont aussi créer des formes en 3D, l'un des moyens possibles est la formation de plis dans les tissus épithéliaux (Pearl, Li and Green 2017). L'image de l'origami consistant au pliage d'une feuille plane pour l'acquisition d'une forme 3D est souvent utilisée pour expliquer de manière simple le processus biologique (**Figure 26**). L'un des cas le plus connu est l'invagination des feuillets embryonnaires (mésoderme ou endoderme) lors de la gastrulation de nombreux embryons du règne animal. Ce processus a été extensivement étudié chez l'embryon de la drosophile (Leptin and Grunewald 1990, Rauzi et al. 2013). L'invagination intervient aussi à des étapes de l'organogenèse comme la formation de tubes (Affolter et al. 2003). Ceci est illustré par la formation de glandes telles que les glandes salivaires de la drosophile (Girdler and Röper 2014, Myat and Andrew 2000) ou encore, exemple peut-être le plus frappant, par la formation du tube neural des vertébrés (Nikolopoulou et al. 2017). L'invagination est donc un processus fondamental conduisant à l'acquisition d'une forme en 3D nécessaire à la fonction de l'organe adulte (**Figure 26**).

Ces processus morphogénétiques prennent en fait leur origine dans un changement de forme des cellules épithéliales elles-mêmes. Comment les cellules orchestrent-elles de tels changements de forme ? La dynamique et l'organisation de l'acto-myosine et des jonctions adhérentes sont responsables de ces remaniements (Pearl et al. 2017). La machinerie de génération et de transmission de force va participer activement au remodelage des épithéliums lors de la morphogenèse. L'équipe s'intéressant particulièrement aux remodelages des tissus en 3D, je m'attacherai dans les paragraphes suivants à décrire de manière détaillée les mécanismes d'acquisition d'une forme épithéliale en trois dimensions à l'aide de deux exemples : l'invagination du tube neural chez les vertébrés et du mésoderme chez la drosophile (**Figure 27**).

De manière générale, l'invagination des épithéliums est associée à la constriction apicale des cellules qui le composent (Martin and Goldstein 2014). La constriction apicale est un mécanisme qui consiste à réduire considérablement l'apex d'une cellule. Ainsi, la cellule initialement cubique ou en colonne va prendre une forme conique ou en « bouteille » : la

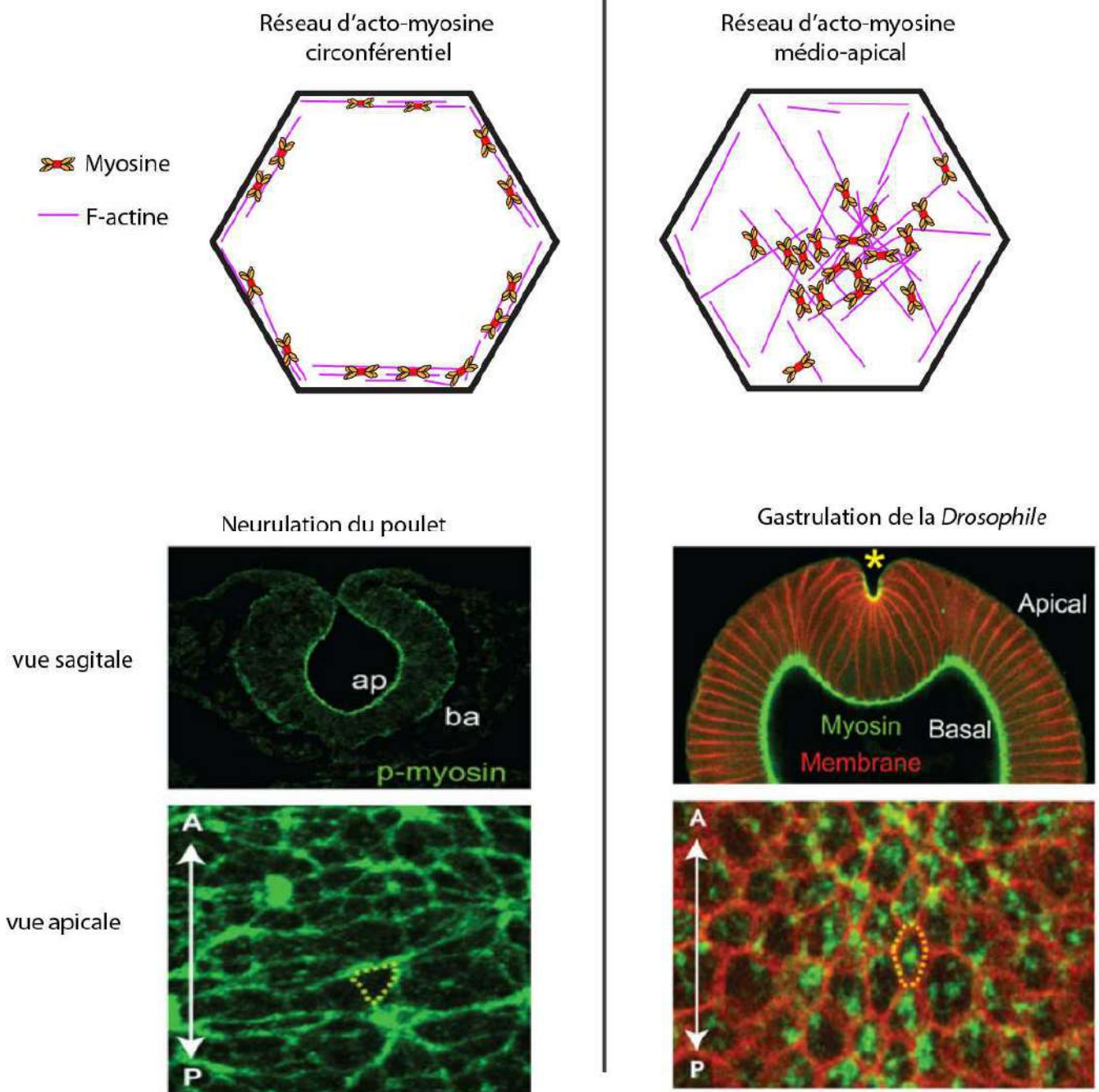


Figure 27. Différents processus de constriction apicale dépendants de l'acto-myosine.

La colonne de gauche décrit le modèle de constriction apicale retrouvé lors de la fermeture du tube neural chez le poulet. La colonne de droite décrit le modèle de constriction apicale mis en jeu lors de la gastrulation de l'embryon de drosophile. Les schémas en haut du haut correspondent à des représentations de la surface apicale, comme visualisé sur les photographies du bas. La myosine est visualisée en vert sur les différentes photographies. Tiré de (Martin and Goldstein 2014).

cellule en colonne a un apex aussi large que sa base, mais lors de la constriction de l'apex, la surface apicale de la cellule devient très petite alors que la taille de la face basale ne change pas ou s'élargit. Les cellules d'un épithélium, connectées entre elles via les jonctions adhérentes, vont tirer sur les cellules voisines lors de la constriction apicale, forçant ainsi le tissu à changer de forme. La constriction apicale, causée par un réseau apical d'actomyosine, génère donc des forces dans le plan des jonctions adhérentes, qui seront transmises au niveau du tissu favorisant l'invagination de l'épithélium.

Il existe différents modèles de constriction apicale, tous nécessitant la liaison de l'actomyosine aux jonctions adhérentes (Martin and Goldstein 2014, Martin 2010). En effet l'actomyosine peut s'organiser différemment en fonction de sa localisation pour mener à la constriction apicale. Par exemple, lors de la fermeture du tube neural chez les vertébrés, quelques cellules dans le neuroépithélium plat vont réduire leur apex grâce à la formation d'un réseau cortical d'acto-myosine connecté aux jonctions adhérentes (Nikolopoulou et al. 2017, Baker and Schroeder 1967, Martin 2010). Ainsi lorsque la myosine se contracte, la surface apicale des cellules diminue entraînant la formation d'un pli dans le neuroépithélium. La perte de fonction de Shroom3, une protéine liée à l'actine et localisée aux jonctions adhérentes, empêche la constriction apicale des cellules du neuroépithélium, entraînant alors l'échec de la fermeture du tube neural (Haigo et al. 2003). En effet, Shroom3 semble réguler l'acto-myosine par le recrutement de Rock au niveau des jonctions adhérentes lors de la constriction apicale (Hildebrand 2005, Nishimura and Takeichi 2008). Ainsi, dans ce cas, la constriction apicale implique la formation d'un réseau d'acto-myosine circonférentiel lié aux jonctions adhérentes pour favoriser l'invagination du neuroépithélium nécessaire à la fermeture du tube neural (**Figure 27**).

L'étude intensive du mésoderme de l'embryon de drosophile a permis de révéler un autre mécanisme de constriction apicale permettant l'initiation de l'invagination (Martin, Kaschube and Wieschaus 2009). Le mésoderme, situé au pôle ventral de l'embryon, constitue l'un des feuilletts embryonnaires. Au cours du développement, le mésoderme va rentrer dans l'embryon par invagination lors de la gastrulation, formant ainsi *in fine* le sillon ventral. L'invagination du mésoderme est favorisée par le changement de forme des cellules initié par une constriction apicale (Leptin and Grunewald 1990). Dans ce cas, les cellules du mésoderme possèdent un réseau d'acto-myosine localisé sur toute la surface de l'apex, contrairement aux cellules du tube neural où ce réseau est localisé au niveau des jonctions (Martin and Goldstein

invagination du mésoderme de l'embryon de *Drosophila*

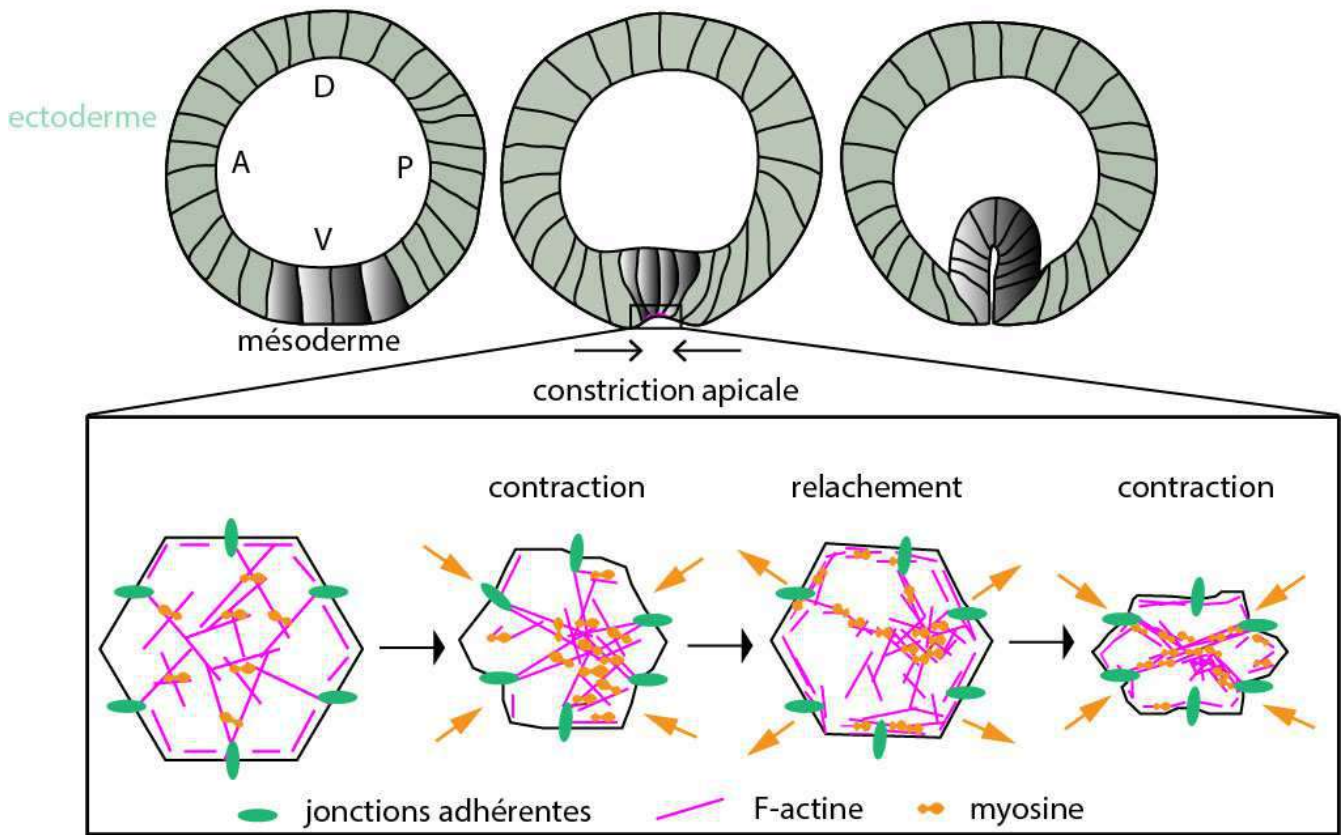


Figure 28. Schéma de l'invagination du mésoderme de l'embryon de drosophile.

D : dorsal, V : ventral, A : antérieur, P : postérieur. Les cellules du mésoderme (noires) vont réduire leur apex grâce à un réseau d'acto-myosine pulsatile connecté aux jonctions adhérentes. Ce processus de constriction apicale ne peut revenir en arrière grâce à un mécanisme de stabilisation mis en jeu à chaque cycle (encadré).

2014) (**Figure 27**). De manière surprenante, ce réseau montre un comportement pulsatile. En effet, il y a dix ans avec le progrès de l'imagerie en temps réel, Adam Martin a pu observer pour la première fois des pulsations d'acto-myosine dans les cellules du mésoderme (Martin et al. 2009). Depuis, ce processus a été finement caractérisé. L'acto-myosine forme un réseau médio-apical au sein duquel les filaments d'actine sont polarisés à la manière d'un sarcomère, leur extrémité (+) étant à la périphérie de l'apex cellulaire (Coravos and Martin 2016) et la myosine se concentrant au centre de la cellule (Martin et al. 2009, Mason, Tworoger and Martin 2013, Coravos and Martin 2016). Le réseau d'acto-myosine médio-apical se contracte rapidement, s'arrête, se stabilise puis se contracte de nouveau et ce jusqu'à la constriction totale de l'apex (**Figure 28**). Ce processus fonctionne comme un mécanisme à cliquet (roue crantée, « ratchet » en anglais), maintenant un système à l'état stable et/ou l'empêchant de revenir en arrière (Martin et al. 2009). Afin de tester le rôle de la localisation médio-apicale de l'acto-myosine dans la génération des pulses, la Cytochalasine D (qui bloque la polymérisation de l'actine) a été injectée dans des embryons. Dans ce contexte, les cellules présentent de la myosine corticale mais gardent leur apex ouvert (Martin et al. 2009). La constriction apicale est affectée lorsque le réseau d'acto-myosine n'est pas central, montrant l'importance de cette organisation médio-apicale (Martin et al. 2009, Mason et al. 2013) et suggérant une régulation polarisée de l'acto-myosine dans les cellules du mésoderme de la drosophile. En effet, ce mode de constriction apicale dépend de deux facteurs de transcription, Snail et Twist, où Snail permet l'initiation de la contraction et Twist permet sa stabilisation. Leur inhibition entraîne la perte de la constriction apicale (Martin et al. 2009). L'action combinée de Snail et Twist induit, via l'activation de RhoA, la localisation de Rock exclusivement au centre de la cellule afin d'y recruter et d'y activer la myosine. Ainsi, la myosine est extrêmement dynamique, elle s'accumule très rapidement au centre de la cellule générant une force efficace entraînant la réduction de l'apex (Martin et al. 2009, Mason et al. 2013). La localisation de l'actine est également finement régulée par cette même voie, via une Formine (mDia), induisant la formation de filaments d'actine corticaux et médio-apicaux (Mason et al. 2013). Enfin, la localisation correcte des jonctions adhérentes dépend également de cette voie (Mason et al. 2013). Le couplage acto-myosine - jonctions adhérentes est suggéré par l'observation d'une déformation de l'apex, là où est concentrée la myosine. L'acto-myosine tire sur les jonctions adhérentes, provoquant des déformations locales de l'apex qui *in fine* conduit à la fermeture de l'apex (Martin et al. 2009). Ainsi, les contractions

répétées du réseau d'acto-myosine vont générer une tension qui sera transmise par les jonctions adhérentes au reste du tissu (Martin et al. 2010). Des expériences d'ablation laser ont permis de confirmer l'existence d'une tension tissulaire au niveau du mésoderme. Les expérimentateurs ont ainsi observé qu'après coupure, le tissu se relâche brusquement traduisant que le tissu est sous tension (Martin et al. 2010). En parallèle, l'utilisation de mutants des jonctions adhérentes, tel que *armadillo* (homologue de la β -caténine) et l'*E-cadhérine* ont permis de mettre en évidence leur importance dans la transmission des forces générées par la constriction apicale lors de l'invagination du mésoderme de la drosophile (Martin et al. 2010).

Ainsi, les pulsations d'acto-myosine couplées aux jonctions adhérentes vont induire la construction apicale initiant l'invagination du mésoderme. Depuis cette découverte, les pulsations d'acto-myosine ont été observées dans de nombreux cas d'invagination, notamment lors de la gastrulation de différents organismes. Par exemple, l'étude de l'invagination de l'endoderme de *C.elegans* a permis d'identifier que l'activité pulsatile du réseau d'acto-myosine médio-apical précédant la constriction apicale. C'est le couplage de l'acto-myosine aux jonctions adhérentes qui va enclencher la constriction apicale. Ainsi, il existe un embrayage moléculaire permettant l'ancrage de l'acto-myosine aux jonctions adhérentes au moment où la constriction de l'apex doit avoir lieu (Roh-Johnson et al. 2012).

Ainsi, la constriction apicale est un mécanisme de génération de force planaire (dans le plan des jonctions adhérentes) très conservé dans divers types cellulaires impliqués dans des processus d'invagination au cours de la morphogenèse, tel que la gastrulation, la formation de tubes (les glandes salivaires (Girdler and Röper 2014) et les trachées) ou encore la formation des villosités de l'intestin (Hartl et al. 2019). Les forces apicales planaires jouent donc un rôle essentiel dans l'acquisition d'une forme en 3D. Toutefois, récemment, il a été mis en évidence de manière surprenante que l'inhibition de la constriction apicale n'empêche pas l'invagination du groupe de cellules formant les futures glandes salivaires (Chung, Kim and Andrew 2017). Ce résultat intéressant suggère la présence d'un mécanisme additionnel nécessaire à la formation d'une invagination au sein d'un tissu. Différents travaux, dont des modèles *in silico*, ont récemment suggéré que la production de forces le long de l'axe apico-basal des cellules pourrait être une autre composante importante pour le bon déroulement de processus d'invagination (Monier et al. 2015, Sherrard et al. 2010, Gracia et al. 2019).

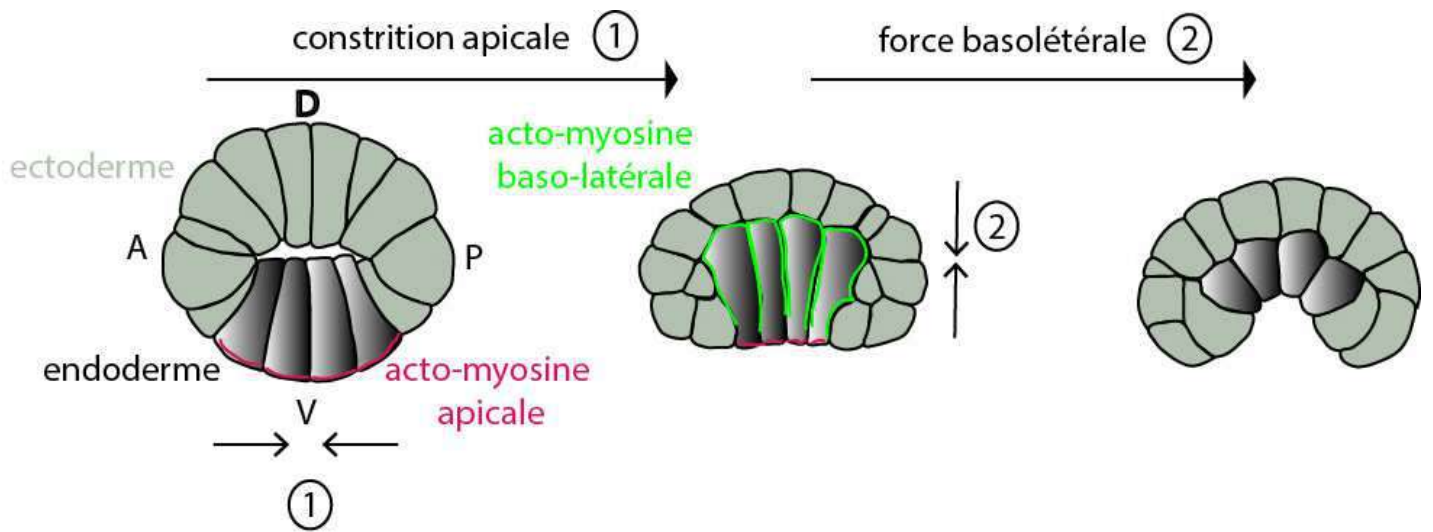


Figure 29. Schéma de l'invagination de l'endoderme de l'embryon d'ascidie.

D : dorsal, V : ventral, A : antérieur, P : postérieur. La surface apicale est localisée vers l'extérieur. L'invagination se fait en deux étapes (1 et 2 sur le schéma). La constriction apicale est maintenue par un réseau d'acto-myosine (rose). Adapté de (Sherrard et al. 2010).

4.2. *Les forces apico-basales.*

En 2010, un article suggère un mécanisme additionnel à la constriction apicale qui pourrait participer au processus d'invagination. Les auteurs étudient la gastrulation de l'ascidie (un petit animal marin, du sous embranchement des tuniciers) et plus particulièrement l'invagination de l'endoderme. Ils montrent que l'invagination de l'endoderme de cette espèce animale se fait en deux étapes distinctes (**Figure 29**): La première consiste en la constriction apicale d'une dizaine de cellules de l'endoderme (Sherrard et al. 2010), comme décrit ci-dessus (Martin and Goldstein 2014). La deuxième étape, nouvellement identifiée, consiste en un raccourcissement latéral des cellules (Sherrard et al. 2010), suggérant la génération d'une force latérale. La myosine va être localisée de manière séquentielle au pôle apical lors de la constriction apicale puis elle va s'accumuler au niveau baso-latéral des cellules de l'endoderme (tout en restant présente au pôle apical). Les auteurs ont donc testé si l'actomyosine joue un rôle dans ces deux étapes de l'invagination. Pour cela, ils ont inhibé l'activité de la myosine grâce à la blebbistatine (un agent chimique bloquant l'activité catalytique de la chaîne lourde de la myosine). Les deux étapes semblent être perturbées par ce traitement, indiquant l'importance de la myosine à la fois pour la constriction apicale et le rétrécissement apico-basal des cellules de l'endoderme. Cependant, elles semblent être régulées de la manière indépendante. En effet, l'inhibition de Rho kinase (Rock) affecte la constriction apicale sans affecter la réduction apico-basale, suggérant que la force latérale serait régulée par une autre voie de signalisation (Sherrard et al. 2010). De plus, ce résultat montre de manière surprenante, qu'en absence de la constriction apicale, la réduction latérale des cellules de l'endoderme induit toujours l'invagination du mésoderme, bien qu'elle soit moins prononcée (Sherrard et al. 2010). Les auteurs ont appuyé leurs conclusions par une modélisation biophysique. Ainsi ce travail fut le premier à constater l'importance d'une force apico-basale au cours d'une invagination. Malgré cette révélation surprenante, le rôle et les mécanismes de la génération d'une telle force dans la formation d'un pli restaient inconnus.

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse travaille sur un modèle de formation de plis dans la patte de drosophile (voir section V). Les plis de la patte de drosophile sont initiés grâce à la présence de cellules apoptotiques, qui vont disparaître par mort programmée (voir section VI). En effet, l'équipe a mis évidence que ces cellules, avant de mourir, participent à la formation d'un pli par la génération d'une force dans l'axe apico-basal.

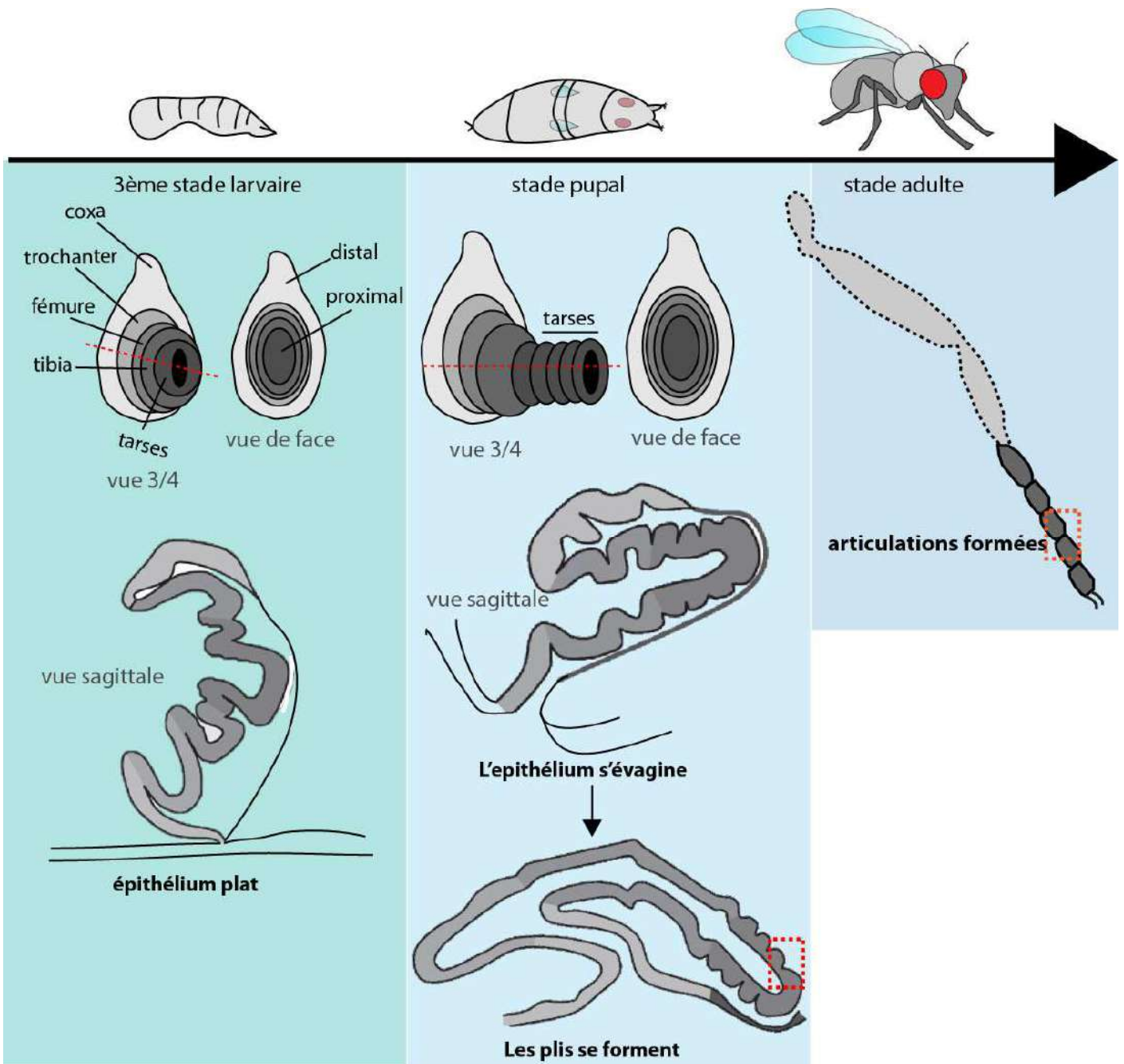


Figure 30. Développement de la patte de drosophile.

Le disque imaginal de patte de la drosophile est un épithélium plat au stade larvaire (vert). Il forme des plis (rectangle en pointillés rouges) et s'évagine (comme une lunette télescopique) au stade pupal (bleu ciel). Au stade adulte (bleu), la patte est formée des différents segments

Ainsi, dans les parties suivantes, j'introduirai des notions sur le modèle de la patte de la drosophile ainsi que sur l'apoptose, afin d'apporter les informations nécessaires pour comprendre la génération de la force apoptotique apico-basale.

V. La patte fait mouche !

La drosophile (*Drosophila melanogaster*) communément appelée « la mouche du vinaigre » est un insecte diptère subissant une métamorphose. En effet, après éclosion de l'œuf, la drosophile évolue en trois stades larvaires avant de former une puppe et de subir la métamorphose. Lors de la métamorphose, les organes larvaires vont disparaître pour laisser place aux organes adultes. De nombreuses structures adultes se forment à partir des disques imaginaux. Ce sont des groupes de cellules composés de cellules indifférenciées qui s'individualisent en fin d'embryogenèse et restent accrochés à l'épiderme larvaire. Ces cellules prolifèrent intensément pendant les stades larvaires. Au cours de la métamorphose, les disques imaginaux s'évaginent, changent de forme et les cellules se différencient afin de former un organe adulte. Le développement des disques imaginaux est complexe, il est régulé précisément dans le temps et l'espace par la mise en place de patrons d'expression de plusieurs gènes formant des territoires géniques. Ce mode de régulation permet de déterminer les différents axes et les différentes parties du futur organe. La larve possède plusieurs disques imaginaux à l'origine de différents organes, notamment six disques imaginaux de pattes qui sont à l'origine des futures pattes de l'individu adulte (Fristrom and Fristrom 1993).

Mon modèle d'étude (et celui de l'équipe) étant le disque imaginal de patte, je vais me focaliser sur le développement de cette structure. La patte de la drosophile est composée de neuf segments distincts le long de l'axe proximo-distal : le coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et cinq tarsi, le dernier étant muni de griffes. Nous travaillons, plus exactement sur la partie distale de la patte, c'est-à-dire sur les tarsi qui sont des segments séparés par des articulations. Alors que le disque de patte est relativement plat jusqu'au troisième stade larvaire, il s'évagine dès l'initiation de la pupaison, c'est-à-dire qu'il se déplie et s'allonge afin de former un organe long et mince. Durant les stades larvaires et le début du stade pupal, la partie distale du disque imaginal de patte, composée d'une monocouche épithéliale de

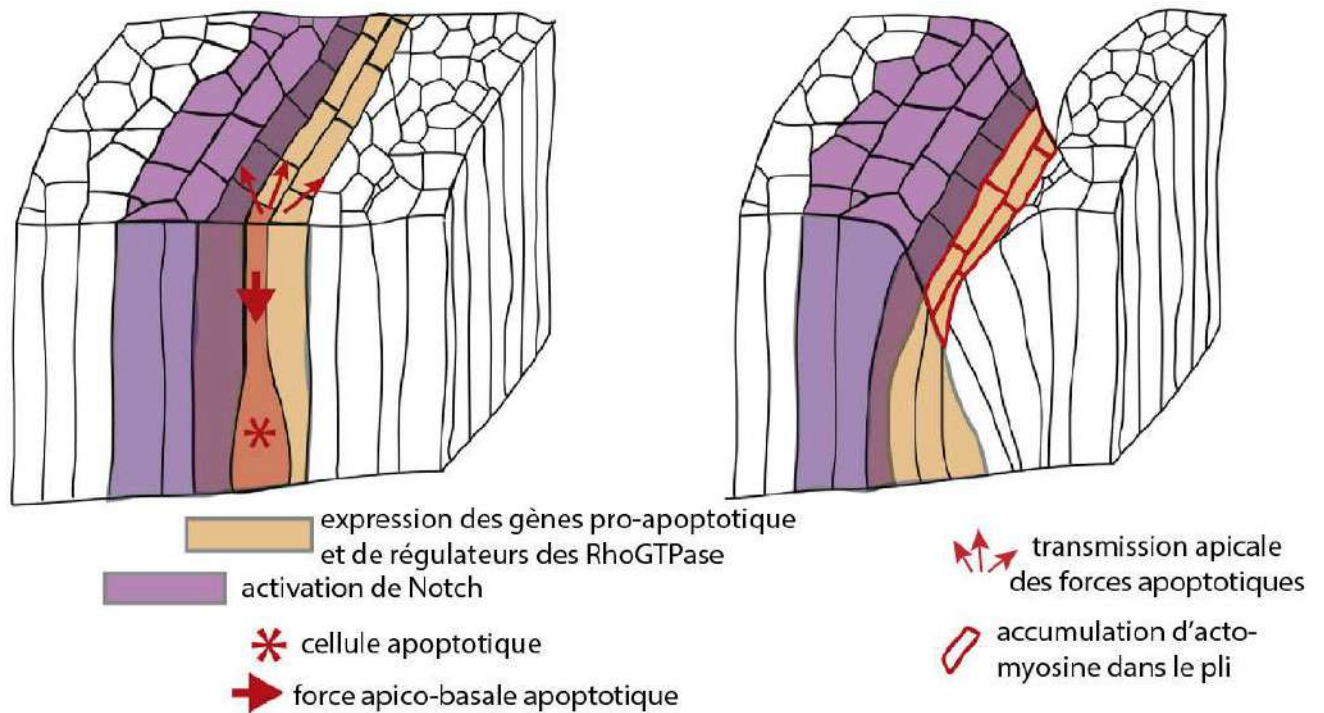


Figure 31. Modèle de régulation de la formation des plis des tarse.

L'activation de voie Notch (violet) conduit à l'expression de régulateurs des RhoGTPases et à l'induction d'apoptose dans le domaine adjacent (beige). L'apoptose (orange) génère des forces qui seront transmises aux voisines afin de former le pli. Tiré de (Suzanne 2016).

cellules en colonne, forme progressivement des plis (Kojima 2017). Ces plis préfigurent les futures articulations de la patte adulte (**Figure 30**).

Comment les plis se forment-ils au cours de la morphogenèse ? L'activation de la voie Notch régit la formation des plis de la patte. La voie Notch est activée de manière segmentale, juste proximale aux domaines de formation des plis. Le mutant *Notch* perd toutes ses articulations et, inversement, l'expression ectopique de *Notch* résulte en la formation d'articulations ectopiques. Notch est donc un facteur clé du développement de la patte de drosophile (Suzanne 2016). Il va notamment activer l'expression du gène *dysfusion* dans les *tarses*, qui entrainera à son tour l'activation spécifiquement dans le territoire des plis de gènes codant pour des régulateurs des Rho-GTPase et de gènes pro-apoptiques (Córdoba and Estella 2014). De manière surprenante, toutes les cellules du futur pli semble exprimer les gènes pro-apoptotique mais seules 20% d'entre elles environ meurent en réponse à un signal qui reste encore inconnu (Suzanne 2016). Par ailleurs, l'inhibition des gènes pro-apoptotiques conduit à un défaut de formation des plis ainsi qu'à la perte de l'articulation (Manjón, Sánchez-Herrero and Suzanne 2007). De plus, il a récemment été mis en évidence que les cellules apoptotiques peuvent générer un signal mécanique conduisant à la formation des plis (Monier et al. 2015). Ainsi, la morphogenèse de la patte repose sur une succession d'évènements: Notch active un certain nombre de gènes cible dont *dysfusion* qui active les gènes pro-apoptotiques et des voies de signalisation régulant le cytosquelette (RhoGTPase). Ceci conduit à une apoptose localisée, la génération d'une force apico-basale dans les cellules mourantes et, *in fine*, à un changement de forme des cellules voisines et à la formation d'un pli (Suzanne 2016) (**Figure 31**). Dans ce modèle de morphogenèse, l'apoptose joue un rôle crucial par la génération de forces mécaniques qui initient le changement de forme tissulaire.

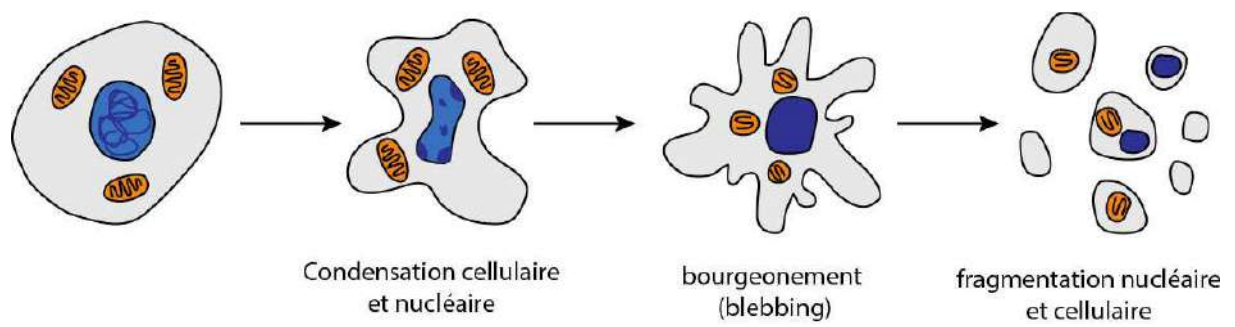


Figure 32. Les changements morphologiques de la cellule apoptotique.

D'après (Kerr, Wyllie and Currie 1972).

VI. La mort au service de la morphogenèse.

6.1. *L'apoptose, c'est quoi ?*

Le rôle principal de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est de garantir un nombre constant de cellules chez un individu et de le protéger contre d'éventuelles agressions internes ou externes. En effet, le nombre de cellules est contrôlé par un équilibre entre la division et la mort cellulaire, si bien qu'un déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies graves. Un excès d'apoptose entrainera des maladies dégénératives telles que l'Alzheimer et une diminution d'apoptose pourra participer à l'apparition de cancers (Favaloro et al. 2012). L'apoptose protège également l'intégrité du tissu en éliminant les cellules dangereuses (mutation ou cassure dans l'ADN). Ainsi, le contrôle de la cascade apoptotique est essentiel à l'homéostasie des tissus. L'apoptose, en plus de son rôle dans l'homéostasie et de son rôle de prévention, joue également un rôle très important au cours du développement des individus, notamment lors de la morphogenèse.

6.1.1. La découverte de l'apoptose.

Étymologiquement, le mot apoptose vient du grec, *apo* qui veut dire « au loin » et *ptosis* qui signifie la « chute ». Historiquement, ce mot désignait la chute programmée des feuilles à l'automne. Ainsi, John Kerr et ses collaborateurs choisirent ce mot pour définir la mort cellulaire programmée naturelle. Ils ont, en effet, découvert en 1972 que les cellules peuvent s'autodétruire en réponse à un signal. La microscopie électronique leur a permis de décrire les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose : l'isolement de la cellule (détachement du support et des voisines), la condensation nucléaire et cytoplasmique ainsi que la fragmentation nucléaire et cellulaire (Kerr, Wyllie and Currie 1972) (**Figure 32**). Ces étapes conduisent donc à la destruction de la cellule afin qu'elle disparaisse proprement du tissu. Les fragments ou corps apoptotiques générés lors de la fragmentation vont en effet être éliminés par phagocytose (Kerr et al. 1972). En comparaison, la nécrose est une mort cellulaire brutale, accidentelle, provoquant le gonflement et l'éclatement de la cellule. Le contenu cytoplasmique se retrouvant dans le milieu extérieur va déclencher une réaction inflammatoire. Par opposition, les cellules apoptotiques meurent « proprement » en formant

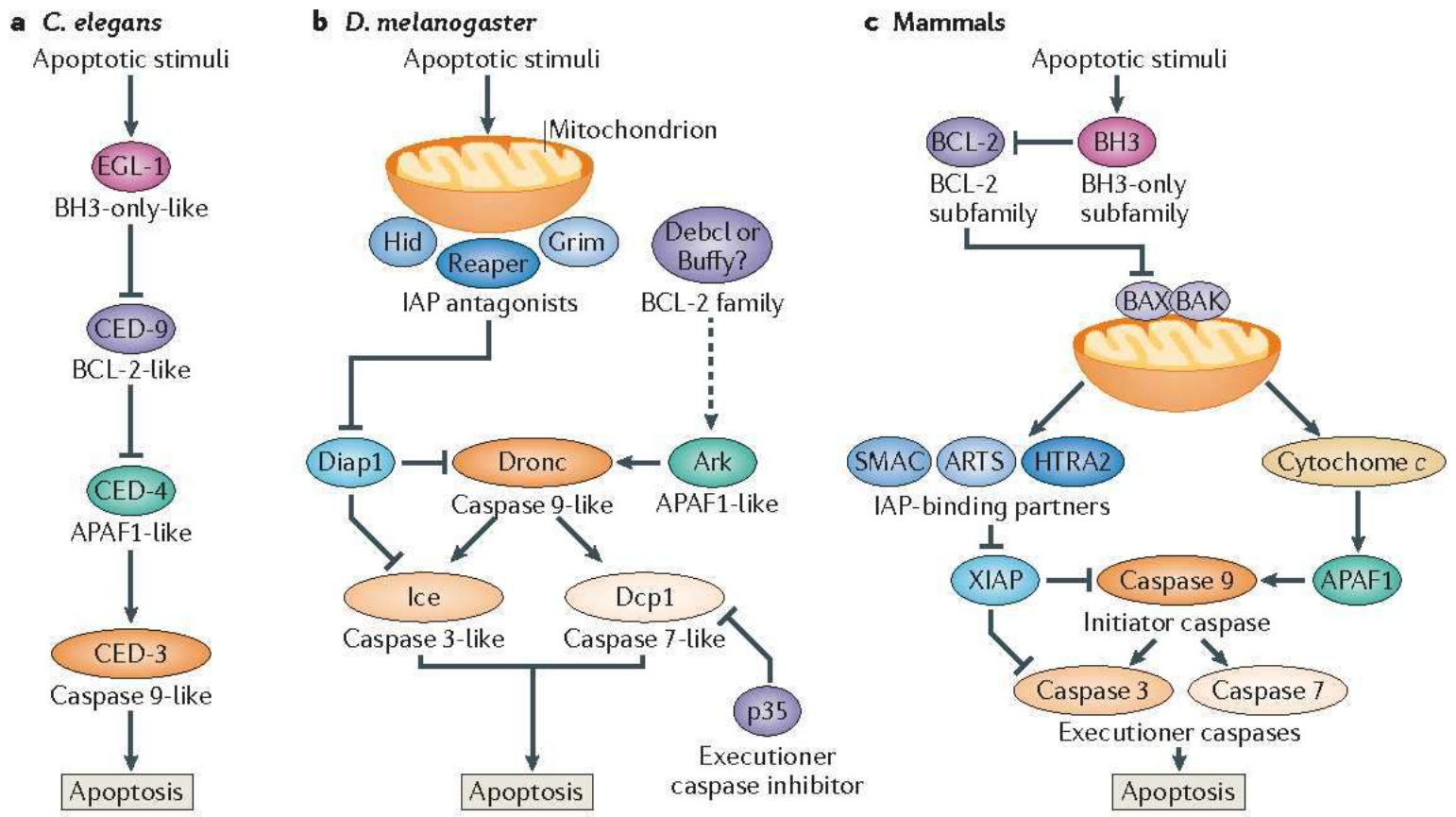


Figure 33. La cascade apoptotique, un processus conservé entre différentes espèces.

Tiré de (Fuchs and Steller 2015) orange : mitochondrie, bleu : noyau.

des fragments hermétiques, bien délimités par une membrane plasmique qui sera spécifiquement reconnue par les macrophages ou les cellules voisines grâce à sa nature biochimique modifiée (Fuchs and Steller 2015, Alberlts et al. 2019).

Le programme apoptotique a été initialement caractérisé chez *C.elegans*, notamment grâce à l'identification des gènes impliqués dans l'exécution de la cellule (Ellis and Horvitz 1986, Metzstein, Stanfield and Horvitz 1998). Ces gènes sont retrouvés dans différentes espèces telles que la souris et la drosophile (Fuchs and Steller 2015, Fuchs and Steller 2011). Le programme apoptotique est, en effet, un processus très conservé au cours de l'évolution, bien que chez les mammifères la cascade apoptotique soit nettement plus complexe (**Figure 33**).

6.1.2. La cascade apoptotique

L'apoptose est un suicide cellulaire strictement contrôlé en réponse à un signal interne ou externe dit de « mort ». Les signaux de mort internes émanent de l'intérieur de la cellule, suite à un stress intracellulaire tel que des dommages à l'ADN ou une infection par un microorganisme, déclenchant l'activation de la cascade apoptotique (Kiraz et al. 2016). Au contraire, les signaux externes viennent du milieu extérieur. Par exemple le TNF (« tumor necrosis factor ») est une cytokine qui va se fixer sur un récepteur présent à la surface de la cellule, notamment le récepteur FAS, conduisant à l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose (Robaye et al. 1991). L'intégration de ces signaux par la cellule va déclencher la cascade apoptotique via l'activation des caspases (Kiraz et al. 2016).

Les caspases (« cysteine aspartic specific proteases ») sont des pro-enzymes à cystéine présentes sous forme inactives dans le cytoplasme de toutes les cellules. Elles sont maintenues inactives, afin de pouvoir entraîner rapidement la mort de la cellule en cas de stress. L'intégration d'un signal de mort va entraîner le clivage et l'activation en cascade des caspases. Il y a deux catégories de caspases : les caspases initiatrices (notamment les caspases 2, 8, 9 et 10 chez les mammifères) et les caspases effectrices (telles que 3, 6, 7, 14 chez les mammifères) (**Figure 33**). Les caspases initiatrices présentent, en N-terminal, un pro-domaine long (CARD ou DED) alors que celui des caspases effectrices est court. C'est ce pro-domaine qui sera clivé en cas d'apoptose pour les activer. Elles sont également composées d'un long

domaine catalytique (P20) suivi d'un deuxième domaine catalytique plus petit (P10). Lors du clivage du pro-domaine les caspases vont former un tétramère de deux hétéro-dimère P20 et P10. Les caspases initiatrices vont être les premières à être activées par clivage, et vont ainsi déclencher le clivage des caspases effectrices (Green and Llambi 2015).

Chez les mammifères, la voie extrinsèque permet l'activation de la pro-caspases 8 initiatrice qui va soit directement cliver la caspase-3 soit cliver la protéine pro-apoptotique Bid provoquant le relargage du cytochrome C, normalement séquestré dans la mitochondrie. Bid fait partie de la famille des Bcl2 qui regroupe des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques contrôlant la perméabilité de la mitochondrie. En absence de signal apoptotique, Bcl2 garanti l'imperméabilité de la mitochondrie et donc la séquestration du cytochrome C. En revanche, lors de l'activation de l'apoptose, Bax, Bac et Bid, normalement inhibés, vont perméabiliser la membrane de la mitochondrie, entraînant la fuite du cytochrome C. La présence du cytochrome C va favoriser la formation de l'apoptosome (APAF, cytochrome C et caspase 9 initiatrice), entraînant l'activation de la pro-caspase 9 qui va aller activer la caspase 3 effectrice. D'autres protéines maintenues normalement à l'intérieur de la mitochondrie sont relarguées dans le cytoplasme au cours de l'apoptose, comme Smac et Diablo qui permettent l'inhibition des inhibiteurs apoptotiques (IAP). La voie intrinsèque implique le relargage du cytochrome C, notamment par l'intermédiaire de p53 qui déclenche l'activité Bax et donc augmente la perméabilité de la mitochondrie (Kiraz et al. 2016).

Chez la drosophile le programme apoptotique est similaire à celui des mammifères mais moins complexe (**Figure 33**). Reaper, Hid et Grim sont les trois facteurs pro-apototiques principaux permettant l'activation des caspases initiatrices (Dronc, Dredd et Strica) en levant l'inhibition induite par DIAP1, l'inhibiteur d'apoptose de la drosophile. Ark est un homologue d'APAF qui va former avec Dronc un complexe ressemblant à un apoptosome (Fuchs and Steller 2011, Denton, Aung-Htut and Kumar 2013). Dronc activé va activer les caspases effectrices (Drice, Dcp-1, Damm et Decay).

6.1.3. Les changements morphologiques des cellules mourantes.

Une fois les caspases effectrices opérationnelles, elles vont pouvoir cliver les nombreux éléments cellulaires cibles aboutissant aux grands changements morphologiques entraînant la mort de la cellule (Fischer, Jänicke and Schulze-Osthoff 2003). En effet, les caspases vont

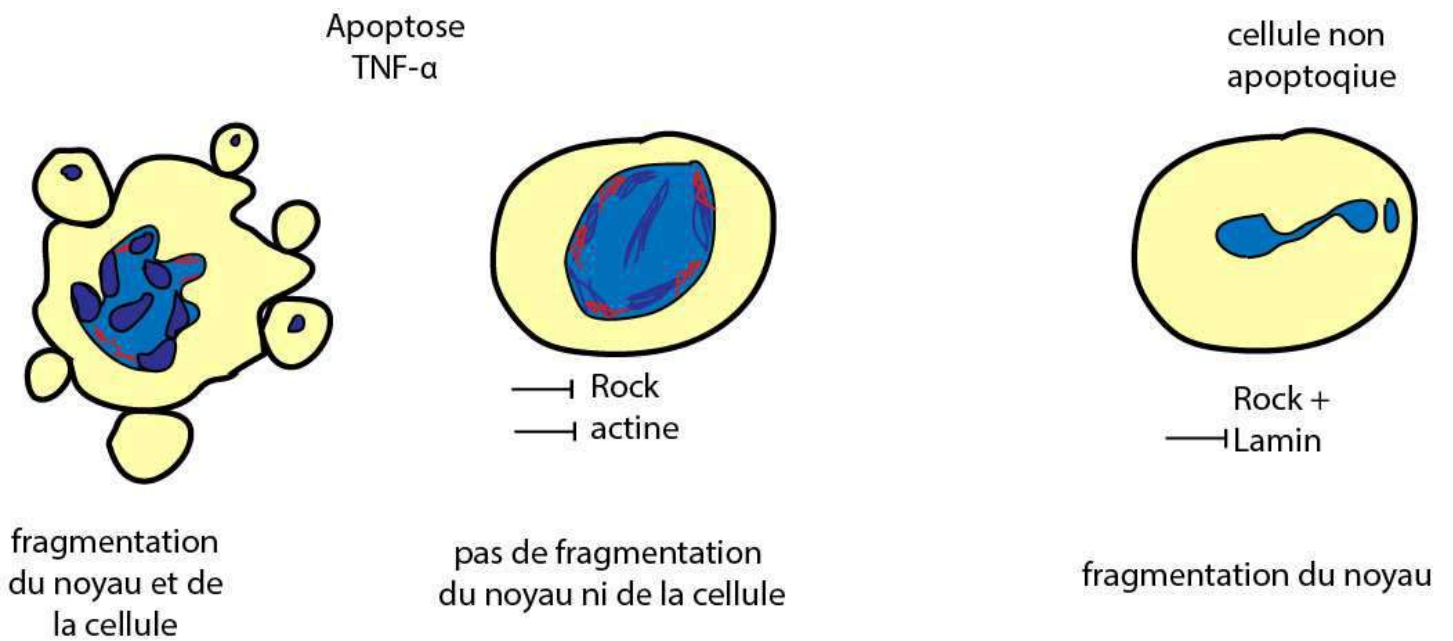


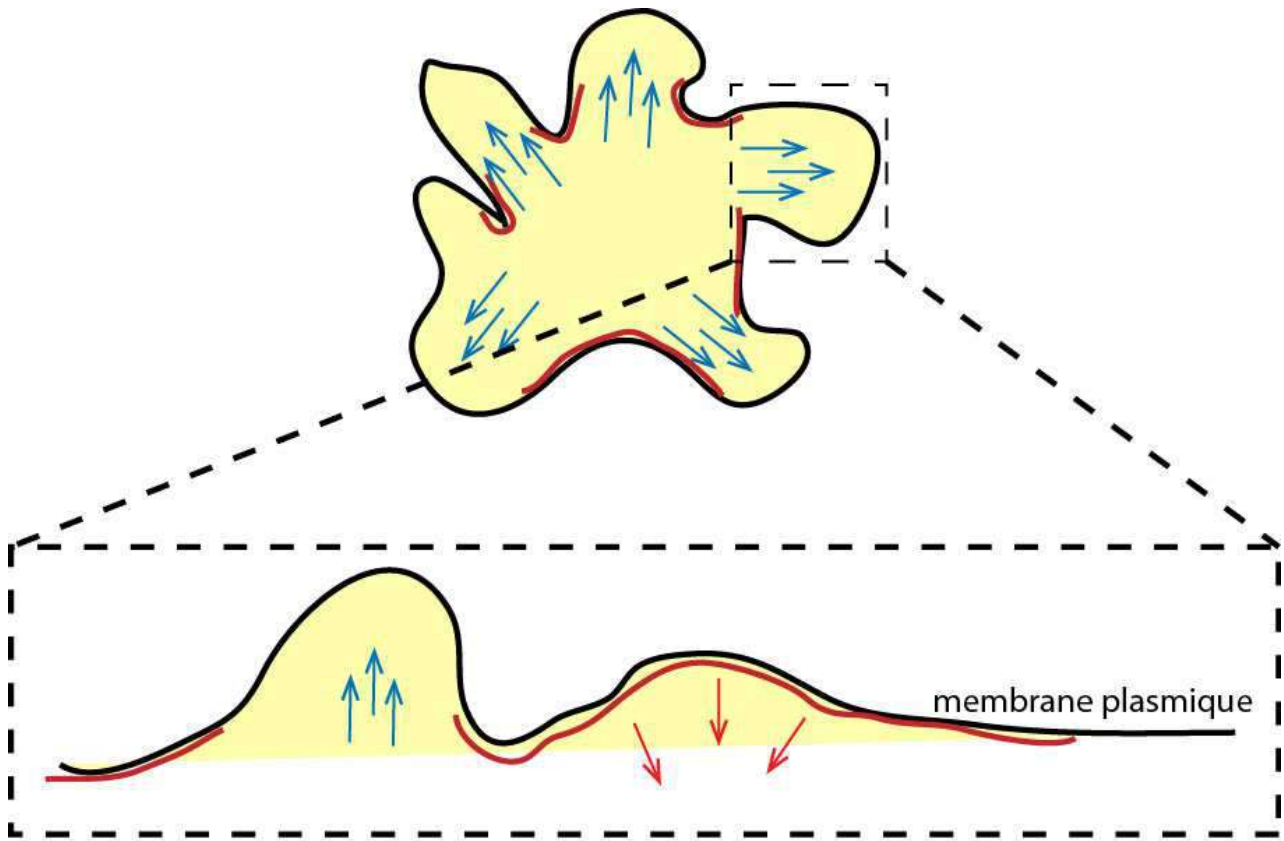
Figure 34. Mécanisme de fragmentation nucléaire en culture cellulaire.

Schématisation des résultats de (Croft et al. 2005). L'apoptose est induite par le TNF- α . A gauche, cas normal de fragmentation par apoptose. Au milieu, en absence de Rock ou d'actine, la cellule apoptotique ne se fragmente pas, elle reste intacte. A droite, l'absence de Lamine dans une cellule non mourante dans laquelle Rock est suractivé entraîne une déformation et une fragmentation du noyau.

avoir pour cible les pores nucléaires (Buendia, Santa-Maria and Courvalin 1999, Kihlmark, Imreh and Hallberg 2001) et les lamines (Broers et al. 2002, Rao, Perez and White 1996) qui vont être dégradés afin de faciliter l'entrée dans le noyau des endonucléases, activées par les caspases, afin de dégrader et de condenser l'ADN, stoppant la machinerie transcriptionnelle (Kiraz et al. 2016, Fischer et al. 2003, Enari et al. 1998). La diminution de la lamine est également importante pour la désintégration du noyau. Cependant ce n'est pas suffisant pour fragmenter le noyau (Croft et al. 2005). Daniel Croft et ses coéquipiers ont cherché à comprendre comment le noyau d'une cellule apoptotique se fragmente. Rock, après clivage par les caspases, devient constitutivement actif, induisant en permanence la phosphorylation de la myosine qui est donc très active lors de l'apoptose (Sebbagh et al. 2001, Mills et al. 1998). Il a été mis en évidence que la suractivité de Rock conduit à la fragmentation de la cellule (Orlando, Stone and Pittman 2006). L'inhibition de Rock, au contraire, entraîne un défaut de fragmentation. Dans ce contexte, très peu de fragments sont générés (Orlando et al. 2006). La suractivité de Rock serait-elle aussi impliquée dans la fragmentation nucléaire ? L'induction de l'apoptose par l'ajout de TNF α et l'inhibition de Rock abolit la fragmentation du noyau qui reste intact. De plus, il a été montré dans des cellules non-apoptotiques que l'activité seule de Rock ne suffit pas à induire un effet sur le noyau. En revanche, dans un mutant nul de lamine A/C, l'activité de Rock et donc de l'acto-myosine, est suffisante pour induire une déformation du noyau. Ainsi, la fragmentation nucléaire dépend de la force générée par l'activité de Rock et d'un affaiblissement des lamines médiés par un clivage par les caspases dans les cellules apoptotiques (Croft et al. 2005) (**Figure 34**). Cependant, le processus de fragmentation exact orchestré par l'acto-myosine reste encore inconnu.

Dans les mêmes conditions d'induction de mort, ils ont testé le rôle du cytosquelette à ce stade de l'apoptose et montré que seule l'absence d'F-actine conduit à un défaut de fragmentation. Les microtubules, eux, ne sont pas impliqués dans la fragmentation du noyau (Croft et al. 2005).

En effet, le cytosquelette est réorganisé au cours des différentes phases de l'apoptose, afin d'aboutir à la destruction de la cellule. Durant la phase d'exécution, la cellule va former des bourgeons, plus communément appelés « blebs », (« blebbling » désigne les mécanismes permettant la formation des bourgeons). *In fine*, lors de l'apoptose, le bourgeonnement semble contribuer à la formation des corps apoptotiques. En effet, les bourgeons seraient



↑↑↑ Bourgeonnement causé par la pression hydrostatique

↓ Retour de l'état initial de la membrane par la ré-association de l'acto-myosine à la membrane plasmique.

— l'acto-myosine

Figure 35. Le bourgeonnement cellulaire au cours de l'apoptose.

La rupture locale du cortex favorise la formation de bourgeons par la pression hydrostatique. Puis l'acto-myosine colonise le bourgeon pour ramener la membrane plasmique à son état initial.

vraisemblablement dissociés du corps cellulaire afin de former des fragments bien délimités (Atkin-Smith and Poon 2017). Ce processus de « blebbing » n'est pas exclusivement une caractéristique de l'apoptose, il est également présent lors de la migration et de la division de certaines cellules (Fackler and Grosse 2008, Sedzinski et al. 2011). Le bourgeonnement est un processus très dynamique qui consiste à un relâchement local de la membrane plasmique, suivi d'une rétraction de celle-ci. La formation d'un bourgeon est donc due soit à la pression hydrostatique au niveau d'une rupture locale du cortex cellulaire d'actine, soit à une augmentation locale de la tension par l'acto-myosine sur la membrane plasmique (Charras et al. 2005, Charras 2008, Atkin-Smith and Poon 2017). Le bourgeon se rétracte ensuite grâce à la colonisation rapide de l'acto-myosine dans le bourgeon dont la contraction permet à la membrane plasmique de revenir à son état initial (Charras 2008, Atkin-Smith and Poon 2017) (**Figure 35**). Dans les cellules apoptotiques, l'activation constitutive de Rock par les caspases favorise la contraction de l'acto-myosine lors du bourgeonnement (Mills et al. 1998, Coleman et al. 2001, Coleman and Olson 2002, Sebbagh et al. 2001). Ainsi l'acto-myosine est considérée comme le principal acteur du bourgeonnement lors de l'apoptose.

Bien que connus pour être démantelés dans les phases précoces de l'apoptose, les microtubules semblent aussi jouer un rôle lors des phases plus tardives (Moss and Lane 2006, Oropesa Ávila et al. 2015). Un réseau de microtubules va se reformer sous la membrane plasmique afin de la protéger contre d'éventuelles ruptures de la membrane plasmique. Ils jouent donc ici un rôle protecteur (Moss et al. 2006, Sánchez-Alcázar et al. 2007). De plus, la présence de microtubules à proximité de fragments de chromatine compacte a été observée. En effet, les microtubules vont pousser les fragments de chromatine dans les bourgeons afin que la chromatine se retrouve enfermée dans les futurs corps apoptotiques (Lane, Allan and Woodman 2005, Moss et al. 2006, Moss and Lane 2006) (**Figure 36**). Lorsque les microtubules sont dépolymérisés par le Nocodazole, un agent chimique, les fragments de chromatine se retrouvent au centre la cellule qui meurt (Moss et al. 2006). Ainsi, le cytosquelette d'actine et des microtubules sont essentiels pour le bon déroulement des événements apoptotiques (Monier and Suzanne 2015).

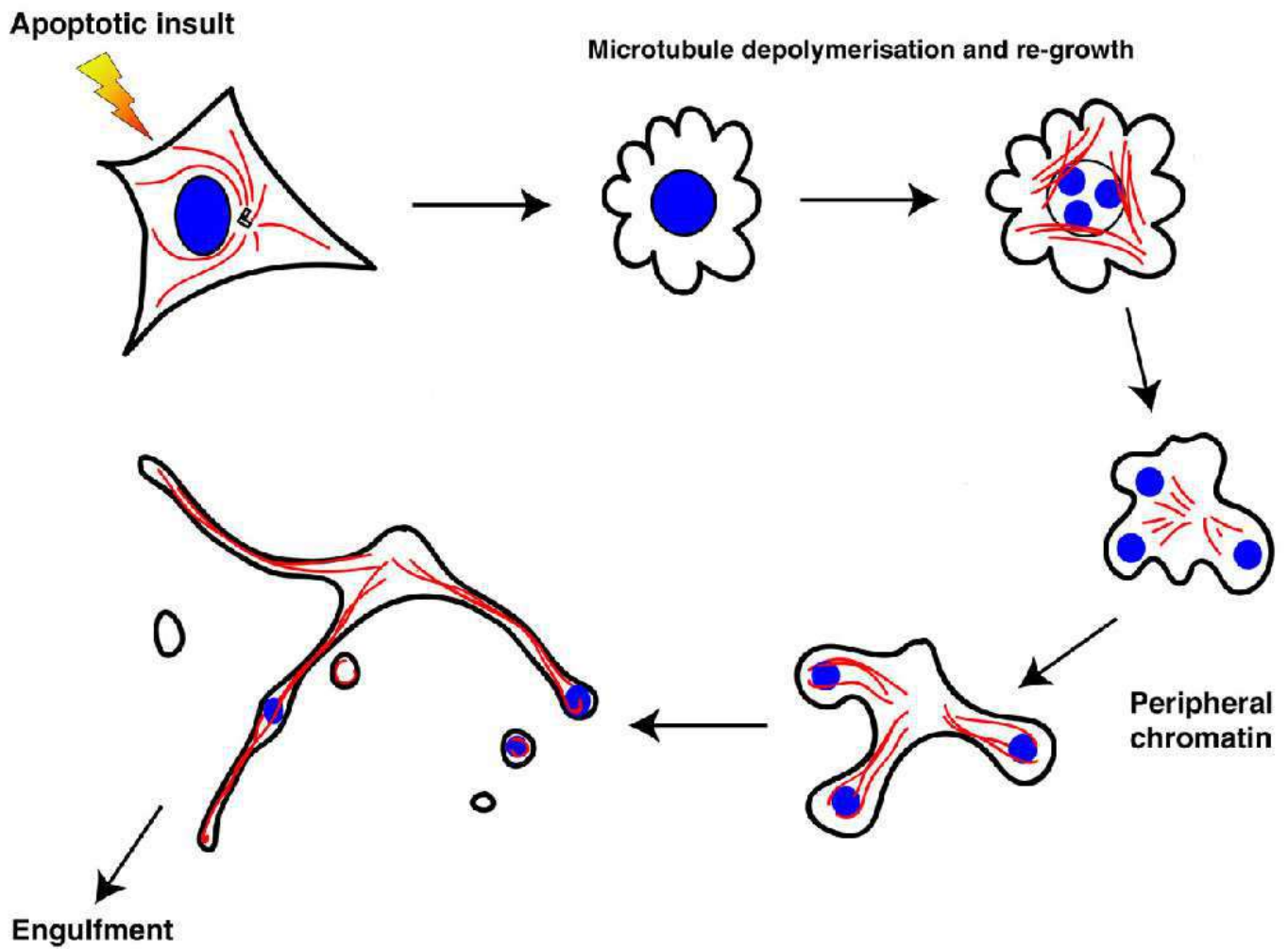


Figure 36. Dynamique des microtubules lors de l'apoptose.

En culture de cellule, les microtubules sont démantelés tôt dans le processus d'apoptose puis reformés dans les phases tardives. Ils poussent la chromatine condensée dans les bourgeonnements. Adapté de (Moss et al. 2006).

6.1.4. L'extrusion des cellules apoptotiques.

Les évènements apoptotiques ont surtout été étudiés en culture de cellules isolées, mais récemment des outils ont permis d'analyser *in vivo*, au sein d'un épithélium les différentes phases apoptotiques, comme par exemple l'extrusion des cellules apoptotiques (Monier and Suzanne 2015). En effet, éliminer une cellule apoptotique d'un tissu s'avère être un défi. Les cellules doivent disparaître proprement, sans endommager la couche cellulaire épithéliale et sans entraver la perméabilité du tissu. L'extrusion est donc un mécanisme devant être finement contrôlé. L'imagerie en temps réel a permis aux expérimentateurs de découvrir et de mieux comprendre comment les cellules mourantes quittent le tissu et comment les cellules environnantes réagissent face à leur voisin mourant. La première analyse a mis en évidence que les cellules apoptotiques vont subir une constriction apicale, aboutissant à la formation d'une « rosette » transitoire. La cellule, en réduisant son apex, va tirer sur ses voisines, leur signalant ainsi qu'elle va mourir (Rosenblatt, Raff and Cramer 2001). Ce mécanisme repose sur l'activité de l'acto-myosine car l'inhibition de la myosine entraîne un défaut d'extrusion des cellules (Rosenblatt et al. 2001). Les cellules apoptotiques forment un anneau apical de myosine conduisant à la réduction de leur apex (Rosenblatt et al. 2001, Kuipers et al. 2014) (**Figure 37A**). Cependant, la constriction apicale de la cellule apoptotique n'est pas suffisante à son expulsion du tissu et le processus va mettre en jeu les cellules voisines. Initialement, l'extrusion de la cellule apoptotique était uniquement associée un signal était biochimique (Gu et al. 2011). Toutefois, des expériences d'ablation laser conduisent aussi à la formation d'un anneau de myosine dans les cellules voisines (**Figure 37A**), suggérant, au moins dans certains contextes, l'intervention d'un signal mécanique (Tamada et al. 2007). Finalement, en réponse à la constriction apicale de la cellule mourante, les cellules environnantes vont former un anneau contractile d'acto-myosine autour de la cellule apoptotique (Michael et al. 2016). Ainsi la cellule apoptotique se retrouve comprimée par ses voisines et est contrainte de sortir du tissu (Rosenblatt et al. 2001, Kuipers et al. 2014). Dans ce modèle de monocouche épithéliale, l'expulsion de la cellule se fait donc en deux phases : (1) la constriction apicale de la cellule mourante, tôt dans le processus d'apoptose, avant l'activation des caspases effectrices (Rosenblatt et al. 2001) ; (2) la compression par les cellules environnantes (**Figure 37**).

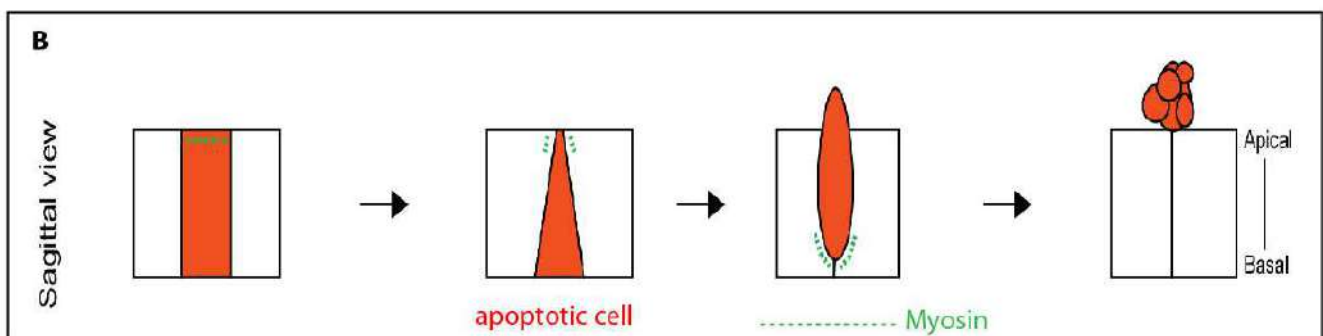
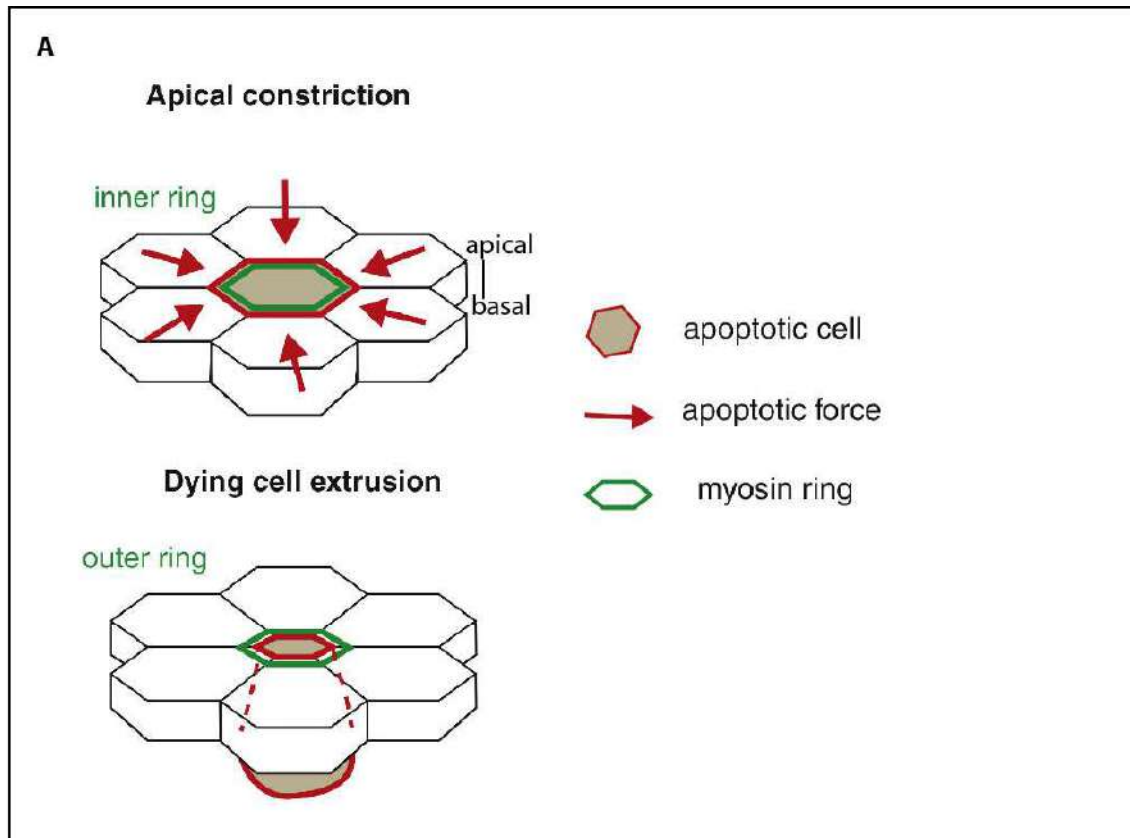


Figure 37. L'extrusion des cellules apoptotiques de l'épithélium.

(A) Dans un épithélium squameux, la constriction apicale de la cellule apoptotique génère une force en tirant les cellules voisines grâce à un anneau de myosine. Les cellules voisines forment un anneau de myosine en réponse à la force planaire générée par la cellule mourante. Tiré de (Ambrosini et al. 2016). **(B)** Dans un épithélium en colonne, la cellule mourante est éliminée par la contraction de l'anneau de myosine des cellules voisines. Chez les vertébrés la cellule apoptotique est généralement extrudée vers l'apicale. Tiré de (Monier and Suzanne 2015).

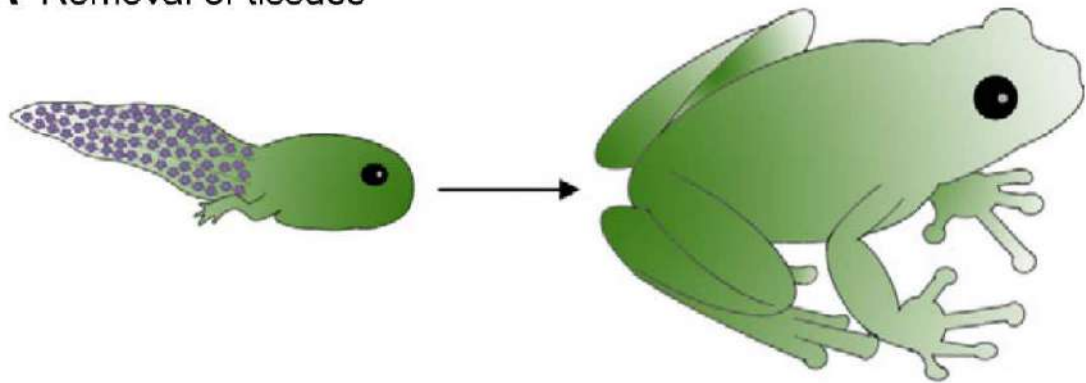
Les cellules apoptotiques, chez les vertébrés, sont le plus souvent expulsées vers le pôle apical de l'épithélium mais elles peuvent aussi être éliminées vers le pôle basal (**Figure 37B**), comme c'est le cas chez la drosophile (Gu and Rosenblatt 2012). La cellule mourante et ses voisines collaborent ensemble afin de ne pas léser le tissu, et de garantir ainsi le rôle de barrière lors de l'élimination de la cellule apoptotique. Ainsi, contrairement à ce qui a été montré en culture cellulaire, *in vivo* les cellules apoptotiques doivent conserver leurs attaches apicales avec leurs voisines afin de garantir l'homéostasie du tissu pendant l'extrusion. En effet, l'absence de lien entre la cellule mourante et ses voisines, par exemple suite à une diminution des niveaux de l'E-Cadhérine, affecte la formation d'une rosette et l'extrusion de la cellule apoptotique mettant en péril l'intégrité du tissu (Lubkov and Bar-Sagi 2014, Michael et al. 2016). De plus, de manière intéressante, les cellules apoptotiques présentes dans la patte de drosophile, forment une accumulation de molécules des complexes d'adhésion (E-Cadhérine, α -caténine et β -caténine) sous l'apex lorsque celui-ci est finalement totalement fermé. Cette accumulation, ou « pic d'adhésion », a été suivie en temps réel : elle se détache du reste de l'épithélium lors des phases tardives de l'apoptose, lorsque la cellule se fragmente (Monier et al. 2015).

Ainsi, *in vivo*, la cellule apoptotique semble interagir avec son environnement via la constriction apicale qui induit la formation d'une « rosette » en tirant sur ses voisines. Est-ce que cette interaction pourrait avoir un impact sur l'ensemble de l'épithélium, notamment au cours du développement ?

6.2. *Morphogenèse apoptose-dépendante.*

L'apoptose est requise pour divers évènements morphogénétiques et dans diverses espèces (Fuchs and Steller 2011, Pérez-Garijo and Steller 2015). La mort participe à la création de nouvelles formes dans certains épithéliums soit par une simple élimination de cellules, soit grâce à un rôle non-autonome émergent (Pérez-Garijo and Steller 2015).

A Removal of tissues



B Organ sculpting

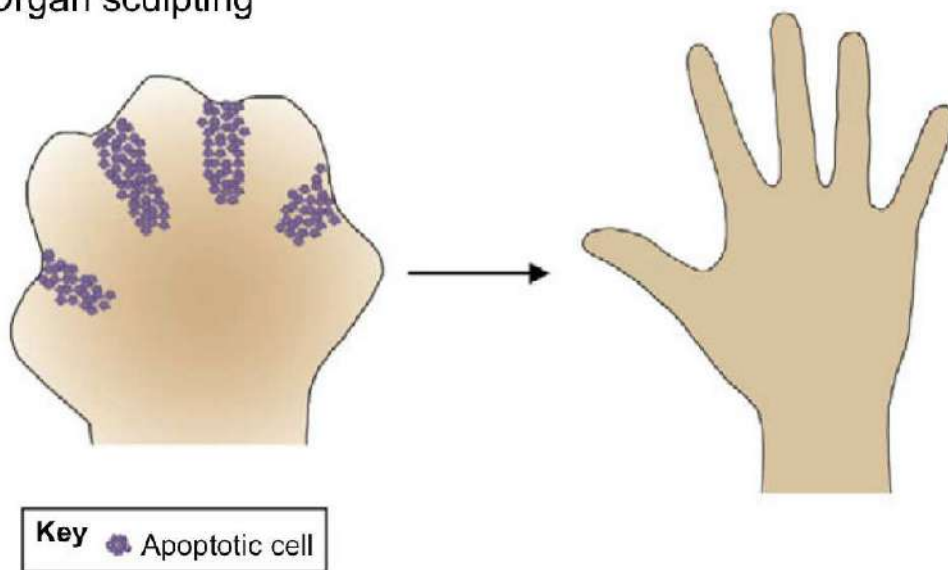


Figure 38. L'apoptose « silencieuse » sculpte le vivant grâce à la simple élimination simple de cellules ou tissus par apoptose.

(A) Perte de la queue du têtard du *Xenopus* au cours de son développement grâce à l'élimination des cellules par apoptose. (B) Suppression du tissu interdigital via la mort des cellules par apoptose lors de la formation de la main. Tiré de (Pérez-Garijo and Steller 2015).

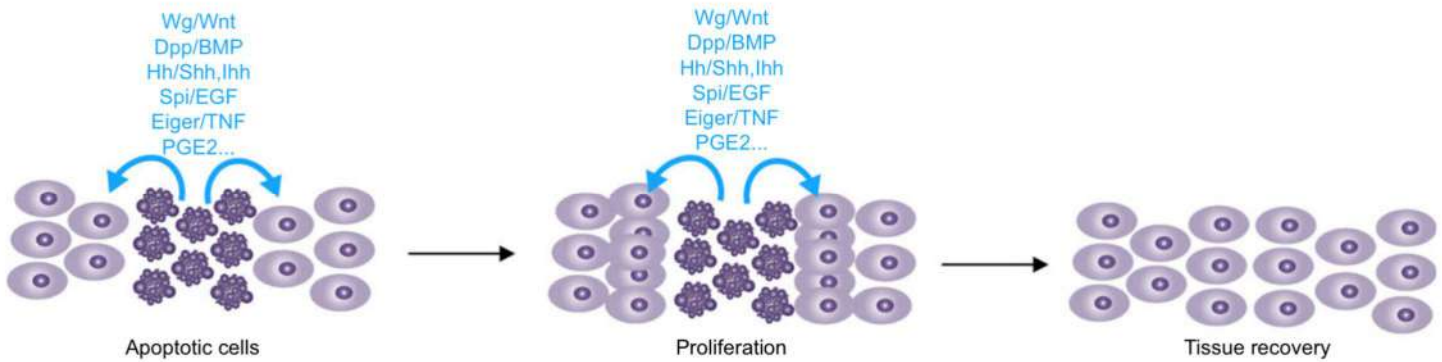
6.2.1. Une mort parfois silencieuse : créer une forme en éliminant les cellules en excès.

Depuis longtemps, l'apoptose est associée au développement, notamment à l'élimination de structures embryonnaires ou larvaires devenues inutiles, comme par exemple l'élimination de la queue du têtard qui ne lui sera pas utile une fois devenu adulte (Pérez-Garijo and Steller 2015) (**Figure 38A**). L'exemple le plus connu et le plus étudié est la formation des doigts. Avant la naissance, les doigts sont liés les uns aux autres par un tissu interdigital formé de cellules mésenchymateuses. Ce tissu va disparaître au cours du développement par l'élimination simple des cellules par apoptose (**Figure 38B**). En effet, une mutation dans les gènes pro-apoptotiques, empêche l'élimination des cellules interdigitales qui conduit à la fusion des doigts à la naissance de l'individu (Montero and Hurlé 2010). Ces exemples illustrent le rôle essentiel de l'apoptose lors du développement. Ici, l'apoptose consiste en une élimination simple de cellules en excès, sans influencer le tissu alentour.

6.2.2. Le dernier mot avant la mort : l'apoptose influence son environnement.

Ces dernières années, à travers différentes études, le dogme selon lequel l'apoptose jouerait un rôle essentiellement « passif », sans influence sur son environnement, a été bousculé et reconsidéré. L'apoptose s'avère, en effet, particulièrement « active », c'est-à-dire que des cellules mourantes vont directement influencer leurs voisines et induire un remodelage de leur environnement (Pérez-Garijo and Steller 2015, Ambrosini et al. 2016). Aujourd'hui, il est donc clair que l'apoptose joue un rôle non-autonome, plus complexe que prévu. Il a été découvert, de manière insoupçonnée, que la mort par apoptose peut influencer son environnement grâce à la libération de signaux diffusibles (Fuchs and Steller 2015, Pérez-Garijo and Steller 2015). Ces signaux peuvent être de différentes natures, ayant un effet prolifératif ou, au contraire, servant de signal de mort (Pérez-Garijo and Steller 2015). En effet, la mort peut entraîner la mort. Dans ce cas, la cellule mourante, avant de disparaître de l'épithélium, va libérer un signal tel qu'Eiger (l'orthologue du TNF α chez la drosophile), induisant la mort par apoptose des cellules voisines (**Figure 39B**). L'inhibition d'Eiger dans les cellules mourantes primaires suffit à empêcher la mort des cellules vivantes à proximité. Ce suicide cellulaire collectif a aussi été observé chez la souris, lors de la dégradation des poils

A Apoptosis-induced proliferation (AIP)



B Apoptosis-induced apoptosis (AiA)

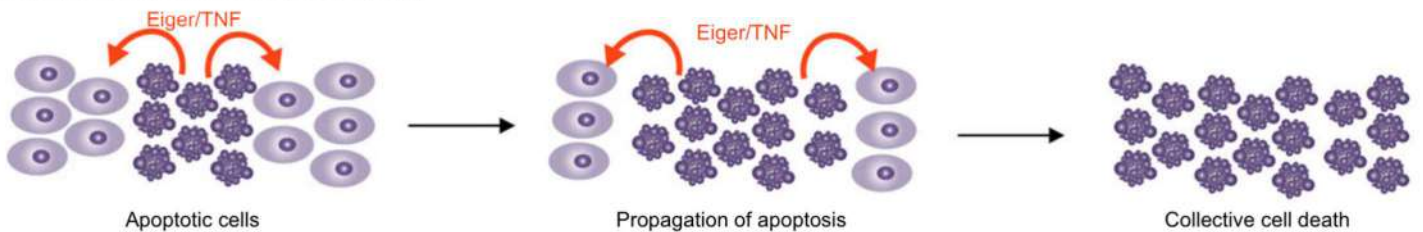


Figure 39. L'apoptose influence son environnement par la libération de molécules biochimiques.

(A) Les cellules apoptotiques peuvent libérer des signaux mitogéniques afin d'induire la prolifération locale et compenser leur élimination. (B) Dans certains contextes les cellules apoptotiques peuvent libérer Eiger (TNF- α chez la drosophile). Celui-ci va induire l'apoptose des cellules voisines, propageant la mort au sein du tissu. Tiré de (Pérez-Garijo and Steller 2015)

induite par la libération de TNF α via les cellules apoptotiques, ce phénomène disparaît lorsque le TNF α est inhibé (Pérez-Garijo, Fuchs and Steller 2013).

A l'inverse, l'apoptose peut entraîner la prolifération des cellules dans un épithélium (**Figure 39A**), par exemple pour compenser une perte massive de cellules induite dans les disques imaginaux. Des expériences d'induction ectopique d'apoptose réalisées dans le disque imaginal d'aile ont mis en évidence que les cellules apoptotiques sécrètent des agents mitogènes tel que Wingless (l'orthologue de Wnt) et Dpp, entraînant la division des cellules voisines (Huh, Guo and Hay 2004, Pérez-Garijo, Martín and Morata 2004, Ryoo, Gorenc and Steller 2004). L'induction en masse de l'apoptose, tout en bloquant les étapes finales de la mort cellulaire (génération de cellule « non-mortes »), était nécessaire pour identifier les signaux diffusibles qu'elles sécrètent. En effet, les événements d'apoptose étant sporadiques et transitoires dans les tissus utilisés, il n'est pas évident de détecter les signaux mis en jeu par les cellules apoptotiques endogènes. Ainsi, afin de déterminer l'impact des cellules mourantes sur leur environnement, l'apoptose est arrêtée au cours de son processus grâce à l'expression de P35, une protéine de baculovirus qui inhibe spécifiquement les caspases effectrices mais pas les initiateuses (Hay, Wassarman and Rubin 1995) (Pérez-Garijo et al. 2004). Bien que de manière artificielle, ces expériences ont permis de mettre en évidence l'influence de l'apoptose sur son environnement par la libération de signaux prolifératifs. Cependant, ces résultats supposent que, de manière naturelle, les cellules apoptotiques signalent aux cellules d'à côté qu'elles vont bientôt disparaître et qu'il va falloir compenser leur perte en engendrant de nouvelles cellules. D'autres données montrent également que malgré le fait que la cellule va mourir, la cellule reste active et capable d'activer la voie de signalisation JNK via la caspase activatrice Dronc (Ryoo et al. 2004, Kondo et al. 2006). Cette stratégie compensative induite par les cellules apoptotiques a également été observée lors de la régénération d'organes lésés. En effet, en cas de blessures, des cellules vont mourir par apoptose et provoquer l'activation de la voie Hippo dans les cellules voisines (Pérez-Garijo and Steller 2015, Grusche et al. 2011, Sun and Irvine 2011). Cette voie est connue pour être déclenchée par des signaux mécaniques, suggérant de manière intéressante la possibilité de la diffusion de messages apoptotiques non seulement biochimiques mais aussi potentiellement mécaniques (Pérez-Garijo and Steller 2015, Rauskolb et al. 2014).

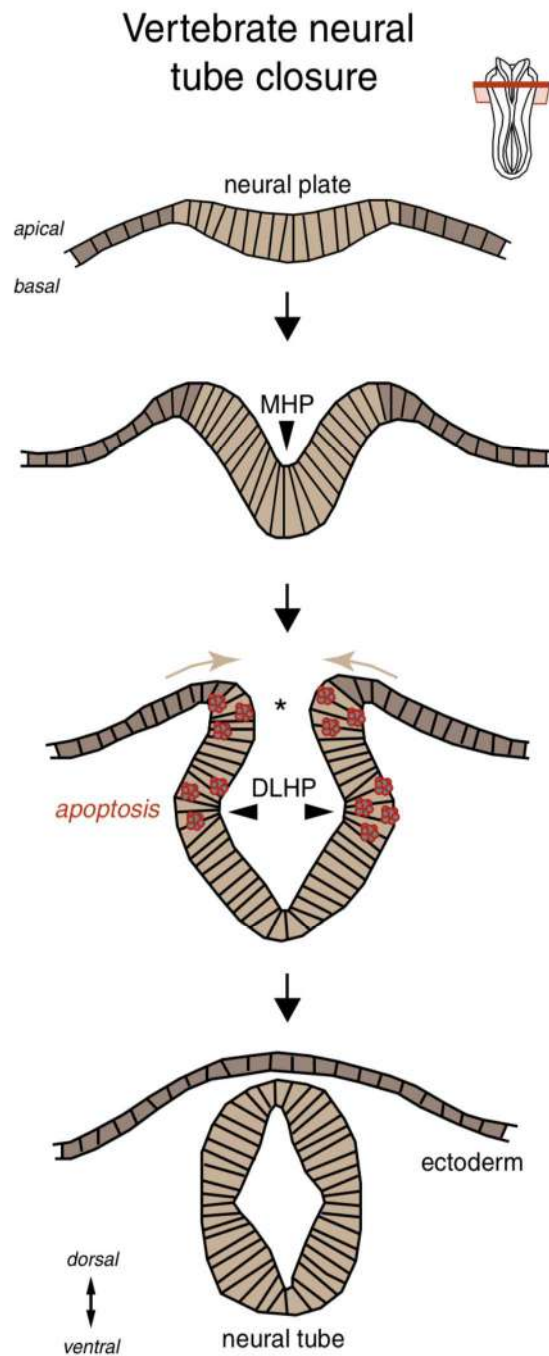


Figure 40. L'apoptose participe à l'invagination de tube neural.

MHP: Medial Hinge Point; DLHP: Dorso-Latéral Hinge point.

L'apoptose s'accumule au niveau des sites dorso-latéral de pliure du tube (DLHP) ainsi qu'au niveau où fusionnent les deux bords du tissu neural (*) afin de former le tube neural. Tiré de (Ambrosini et al. 2016).

6.2.3. La force de la mort : l'apoptose influence son environnement par la force.

Lors de la morphogenèse, l'apoptose a été définie comme requise pour le mouvement de certains tissus ou pour l'acquisition d'une nouvelle forme. Par exemple, il a été observé chez la drosophile mâle que la rotation des organes génitaux lors du développement corrèle avec la présence de cellules apoptotiques là où le mouvement de rotation est initié (Suzanne et al. 2010). En absence d'apoptose la rotation du genitalia échoue (Abbott and Lengyel 1991, Grether et al. 1995), suggérant donc un rôle actif de la mort cellulaire sur ce processus morphogénétique (Suzanne et al. 2010). On peut supposer que l'apoptose pourrait être à l'origine d'un signal mécanique permettant le mouvement de rotation.

Chez les vertébrés, l'apoptose est associée à la fermeture complète du tube neural (**Figure 40**). En effet, l'inhibition par agent chimique des caspases ou par inhibition génétique de gènes pro-apoptotiques tel que *apaf* provoque un défaut de fermeture du tube neural chez le poulet mais conduit à des résultats plus complexes chez la souris (Weil, Jacobson and Raff 1997, Massa et al. 2009, Yamaguchi et al. 2011). La fermeture du tube neural repose sur la courbure de la plaque neurale initialement plate, à des endroits bien définis afin d'aboutir à la fusion du tissu qui formera *in fine* le tube neural. La constriction apicale des cellules situées au niveau de la ligne médiale du neuroectoderme va initier l'invagination du tissu. Ensuite le neuroectoderme va subir une deuxième série de pliures au niveau dorso-latéral du tissu (Figure 40) (Yamaguchi and Miura 2013). C'est au cours de cette deuxième étape que la présence d'apoptose a été détectée au niveau latéral, ainsi qu'au niveau de la fusion du tube neural (Yamaguchi and Miura 2013, Ambrosini et al. 2016). L'imagerie en temps réel a permis de suivre la fermeture dorsale en présence ou en absence d'apoptose dans l'embryon de souris. L'absence de l'apoptose entraîne un retard de fermeture mais ne l'empêche pas, indiquant que l'apoptose est nécessaire mais pas essentielle. L'apoptose influence son environnement en augmentant la vitesse de la fermeture du tube neural (Yamaguchi et al. 2011). Cependant les mécanismes apoptotiques mis en jeu dans ce processus sont totalement inconnus. Malgré le peu d'information sur l'organisation exacte de la cellule apoptotique dans les deux exemples décrits au-dessus, ils montrent que l'apoptose influence son environnement en induisant des mouvements tissulaires et la formation de plis.

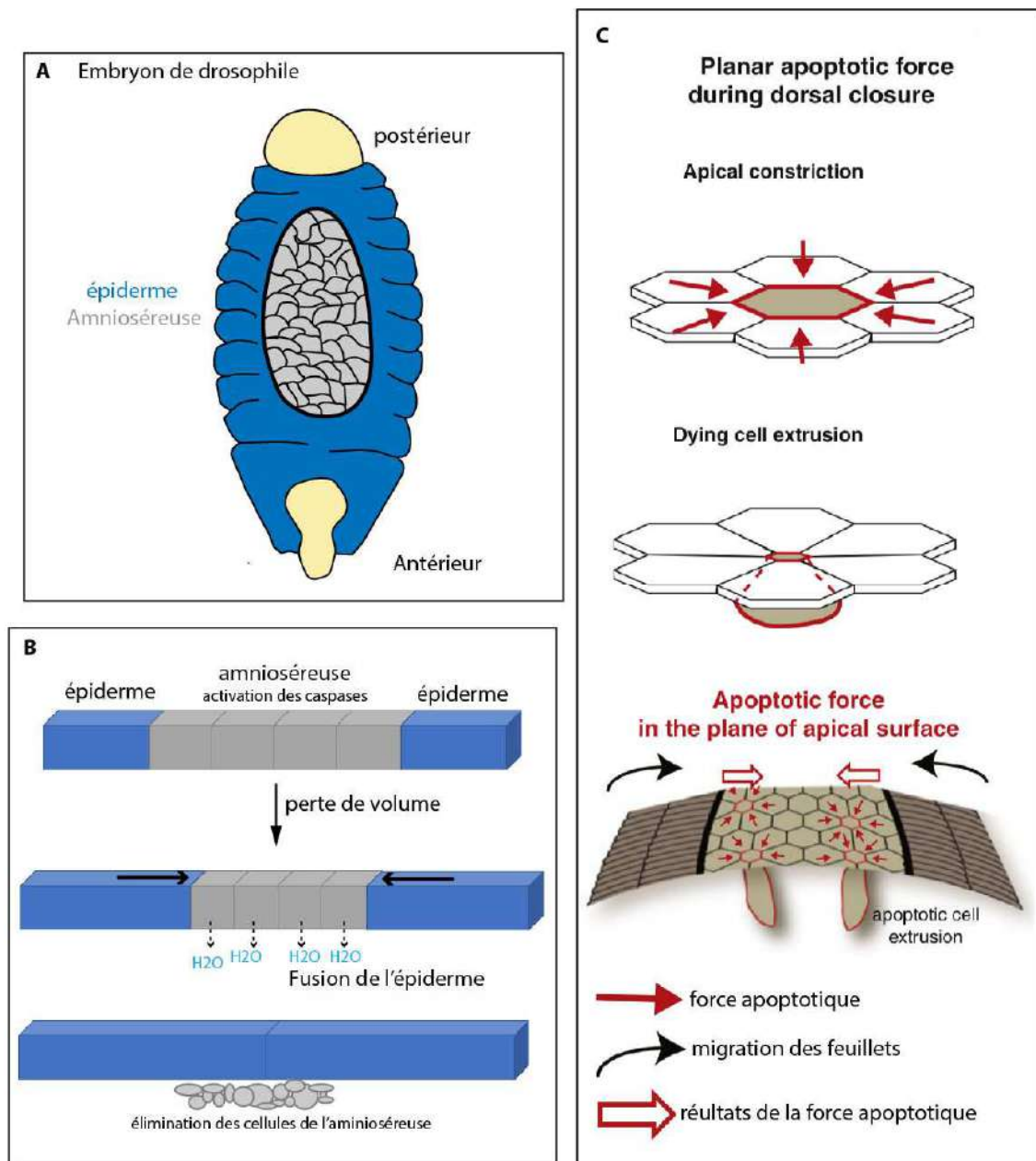


Figure 41. L'apoptose participe à la fermeture dorsale en créant des forces planaires.

(A) Schéma d'un embryon de drosophile dont la face dorsale est couverte par l'amnioséreuse. **(B)** Les cellules de l'amnioséreuse entrent en apoptose et perdent de l'eau aboutissant à la diminution de leur volume. Ceci génère une force de traction sur les feuilletts de l'épiderme. Adapté de (Saias et al. 2015) **(C)** Des cellules apoptotiques de l'amnioséreuse (vont être extrudées avant les autres. La constriction de leur apex génère une force dans le plan accélérant la fermeture dorsale. Adapté de (Ambrosini et al. 2016).

Lors d'évènements morphogénétiques indépendants de l'apoptose, nous avons vu que dans certains cas le remodelage d'un épithélium peut faire intervenir la génération de forces mécaniques planaires, notamment la constriction apicale des cellules (voir section 4.1.2). Nous avons également vu que la cellule apoptotique, afin d'être éliminée de l'épithélium, va réduire son apex ce qui va générer, de manière similaire aux cellules non-apoptotiques subissant une constriction apicale, une force transmise aux voisines provoquant la formation d'une rosette (voir section 6.1.4.). En effet, la cellule apoptotique génère une force locale grâce à la formation d'un anneau d'acto-myosine apical créant une tension localement transmise aux voisines via les jonctions adhérentes (Rosenblatt et al. 2001, Gu and Rosenblatt 2012, Lubkov and Bar-Sagi 2014). La force apoptotique va induire dans les cellules voisines le recrutement de Coronine 1B à leur surface conduisant à la formation de filaments d'acto-myosine au niveau du cortex apical, qui sera affecté par l'inhibition d'E-cadhérine (Michael et al. 2016). Ainsi, la cellule est capable de générer une force planaire et de la transmettre à ces voisines, suggérant fortement la possibilité d'un impact de la force apoptotique à plus grande échelle (Ambrosini et al. 2016). Les cellules apoptotiques pourraient comme les cellules non-apoptotiques induire un changement de forme tissulaire grâce à la génération de forces mécaniques.

En effet, la force générée et transmise par la constriction apicale de cellules apoptotiques crée une force planaire participant à la fermeture dorsale des embryons de drosophile. La fermeture dorsale consiste en la migration de deux feuillets épithéliaux latéraux séparés par l'amnioséreuse, un tissu extra-embryonnaire, qui recouvre temporairement l'ouverture de la face dorsale de l'embryon (**Figure 41A**). La première rangée de cellules de l'épiderme, au contact de l'amnioséreuse, forme un câble supra-cellulaire d'acto-myosine (ou « *purse-string* ») qui génère une tension, suggérant que cette structure participerait à la fermeture dorsale (Kiehart et al. 2000). Cependant, des études récentes montrent qu'une absence de cette structure n'empêche pas la fermeture dorsale, suggérant que le câble supra-cellulaire d'acto-myosine est dispensable lors de la fermeture dorsale (Ducuing and Vincent 2016, Pasakarnis et al. 2016). Ainsi la fermeture dorsale serait contrôlée par d'autres mécanismes.

L'amnioséreuse est composée d'une fine couche de cellules amenées à disparaître par apoptose à la fin du processus de fermeture dorsale de l'embryon (Abrams et al. 1993, Reed

et al. 2004, Toyama et al. 2008, Hayes and Solon 2017). Toutefois, il a été observé que quelques cellules de l'amnioséreuse délaminent puis se fragmentent avant les autres (Toyama et al. 2008, Sokolow et al. 2012). Ces cellules vont réduire leur apex par le processus classique de constriction apicale, c'est-à-dire via la contraction d'un réseau d'acto-myosine. Ainsi, ces cellules mourant précocement génèrent une force transmise aux voisines visible par la formation d'une rosette (Toyama et al. 2008, Rosenblatt et al. 2001) (**Figure 41C**). Des expériences d'ablation ont fourni la preuve que la force générée dans l'amnioséreuse est dépendante de l'apoptose. Ainsi cette élimination sporadique de cellules apoptotiques de l'amnioséreuse contribue à générer une force planaire, ce qui joue sur la vitesse de migration des feuilletts de l'épiderme (Toyama et al. 2008). Ce modèle est supporté par diverses expériences. Notamment, une inhibition de l'apoptose par l'expression de p35 (un inhibiteur des caspases effectrices) dans les cellules de l'amnioséreuse diminue la vitesse de la fermeture dorsale. Inversement, une augmentation d'apoptose par la surexpression de *grim* (un gène pro-apoptotique) accélère la vitesse de la fermeture dorsale (Toyama et al. 2008).

Plus récemment, il a été montré que toutes les cellules de l'amnioséreuse activent les caspases au début du processus de fermeture dorsale même si elles disparaissent, pour la majorité, à la fin du processus. L'activation des caspases induit, tôt dans le processus, une perte d'eau entraînant une diminution du volume des cellules, comme montré en culture de cellule. Cette diminution de volume est associée à la progression des feuilletts de l'épiderme. En effet, la perte du volume de ces cellules entraîne une réduction de leur surface apicale (indépendamment de l'acto-myosine) générant une force de traction (Saias et al. 2015) (**Figure 41B**). Ainsi les cellules apoptotiques génèrent des forces planaires qui vont promouvoir la progression des feuilletts l'un vers l'autre, jusqu'à fermeture totale de la face dorsale de l'embryon. Ces résultats montrent donc que l'apoptose influence la migration des feuilletts de l'épiderme l'un vers l'autre afin de fusionner rapidement.

C'est la combinaison de ces forces, provoquant une augmentation de la tension sur la face dorsale de l'embryon, qui va permettre la migration et la fusion des feuilletts latéraux afin de fermer l'ouverture dorsale (Hayes and Solon 2017, Saias et al. 2015). Ainsi, l'apoptose montre encore son rôle non-autonome à travers ce processus de migration de tissus lors de la morphogénèse. Les cellules mourantes sont donc capables de générer des forces dans le plan de l'épithélium lors d'évènements morphogénétiques.

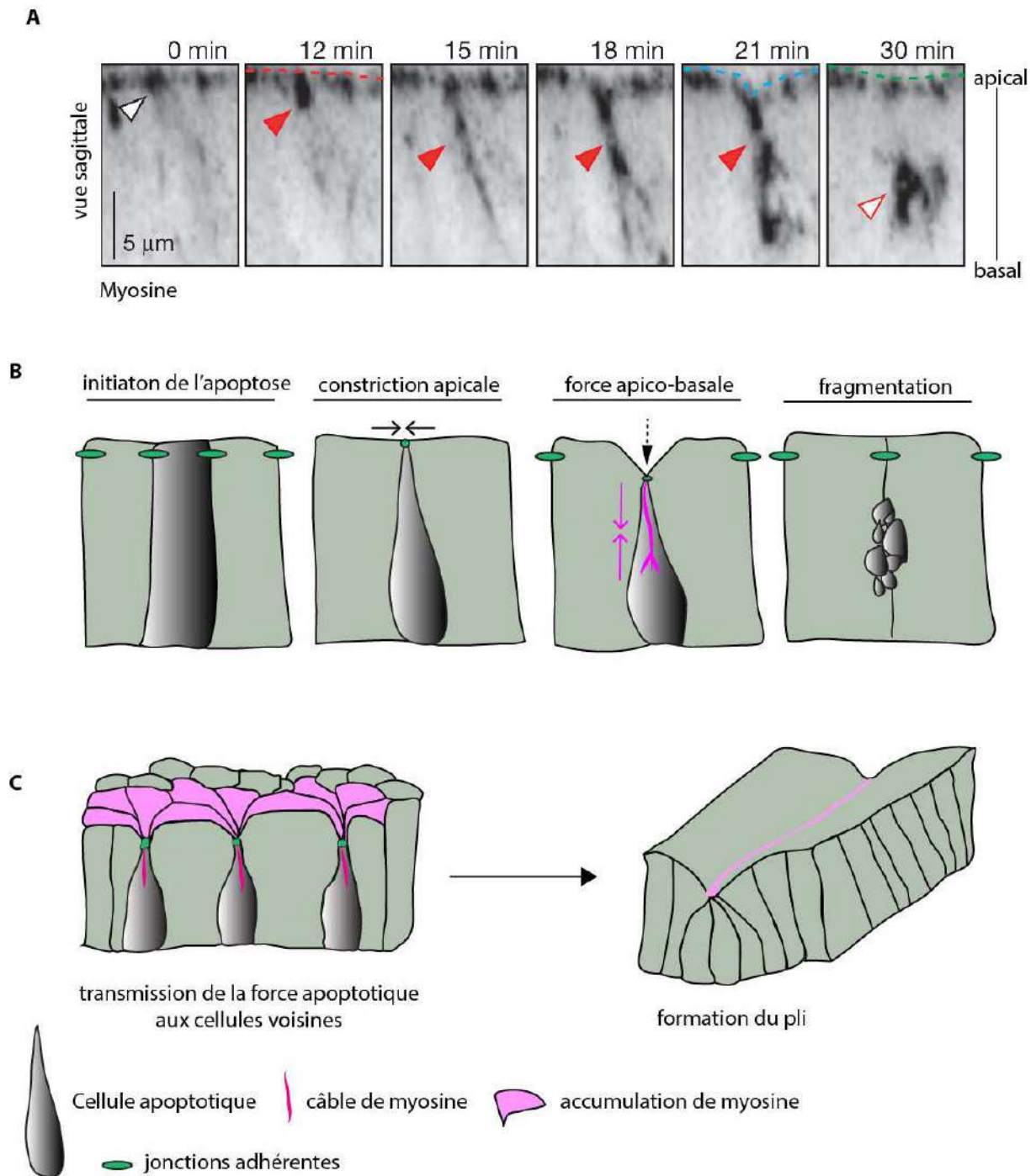


Figure 42. L'apoptose génère une force apico-basale conduisant à la formation d'un pli.

(A) Film de la dynamique du câble de myosine dans une cellule apoptotique non marquée. Le câble crée une force apico-basale déformant localement et transitoirement la surface apicale. Film de (Monier et al. 2015). (B) Schéma montrant la formation d'un câble de myosine dans les cellules apoptotiques, dont la contraction déforme la surface apicale (flèche pointillée vers le bas). (C) Le nombre des événements apoptotiques déclenche l'accumulation de myosine dans les cellules voisines, aboutissant à la formation d'un pli.

En outre, une étude réalisée par mon équipe d'accueil a révélé de manière surprenante que les cellules apoptotiques sont aussi capables d'induire une force au cours de la morphogenèse du disque de patte de la drosophile (Monier et al. 2015). Comme mentionné précédemment, lors de la formation des plis de la patte de la drosophile, des cellules vont mourir dans un anneau qui préfigure les articulations (Manjón et al. 2007). Cependant, toutes les cellules de l'anneau ne vont pas entrer en apoptose, et seulement 20% environ des cellules vont mourir selon un patron spatio-temporel bien déterminé. Les cellules commencent à mourir au pôle ventral puis en latéral et enfin en dorsal (Monier et al. 2015). La formation des plis dans la future patte de la drosophile dépend de l'apoptose, ainsi le pli se forme progressivement du ventral vers le dorsal (Monier et al. 2015, Manjón et al. 2007, Suzanne 2016). Lorsque l'apoptose est inhibée, les plis disparaissent, ce qui conduit à une patte adulte dépourvue d'articulations (Manjón et al. 2007). Dans ce modèle, l'équipe a caractérisé comment des cellules destinées à mourir pouvaient être à l'origine de la formation des plis. Ils ont observé de manière étonnante, la formation d'une structure de myosine ressemblant à un câble le long de l'axe apico-basal des cellules mourantes qui va croître depuis les jonctions adhérentes (Monier et al. 2015). L'imagerie en temps réel montre que la dynamique de ce câble corrèle avec une déformation apicale transitoire de l'épithélium (**Figure 42A**). Afin de confirmer que le câble de myosine est responsable de la déformation apicale, ils ont forcé génétiquement des cellules à mourir dans l'aile, un tissu naïf, exempt de pli. Dans le cas contrôle, les cellules apoptotiques ectopiques forment un câble de myosine apico-basal capable d'induire une déformation apicale transitoire du tissu. En revanche, l'inhibition spécifique de la myosine dans les cellules apoptotiques ectopiques les rend incapables de déformer la surface apicale de l'épithélium. Ainsi ces expériences, fournissent l'évidence que la myosine permet la génération d'une force apico-basale induisant une déformation de la surface apicale. Comment une force transitoire peut-elle induire la formation d'un pli dans l'épithélium ? Ils ont montré que la force apoptotique induite par le câble de myosine conduit à une accumulation de myosine à la surface apicale des cellules voisines. Les cellules apoptotiques ectopiques sont aussi capables de transmettre la force apico-basale aux cellules voisines de l'aile car elles accumulent de la myosine et *in fine* forment un petit pli dans cet épithélium naturellement plat. En revanche, lorsque la myosine est inhibée spécifiquement dans les cellules apoptotiques, les cellules voisines n'accumulent plus de myosine à leur

surface et l'épithélium d'aile reste plat. Ce résultat démontre que la force générée par la cellule apoptotique est transmise aux cellules voisines (Monier et al. 2015).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats amène au modèle suivant : les cellules apoptotiques forment un câble de myosine apico-basal, capable de tirer sur la surface apicale, et d'y induire une déformation locale et transitoire (**Figure 42B**). Cette force apico-basale constitue un signal mécanique qui est transmis aux voisines qui répondent en accumulant de la myosine à leur surface. C'est donc la répétition des événements apoptotiques dans la zone des futurs plis qui, en entraînant l'accumulation de myosine dans les voisines, va aboutir à la formation d'un pli bien formé (**Figure 42C**).

En plus de confirmer le rôle non autonome de l'apoptose au cours de la morphogenèse, ces travaux mettent en évidence le rôle d'une force apico-basale dans la génération d'un pli. Cependant le mécanisme cellulaire responsable de la génération de cette force apico-basale était encore inconnu.

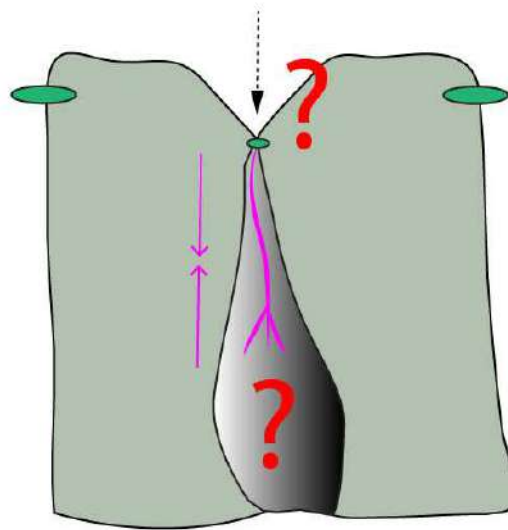
PROBLEMATIQUES

ET OBJECTIFS DE

LA THESE.

1

force apico-basale



2

initiation de l'apoptose

constriction apicale

force apico-basale

fragmentation

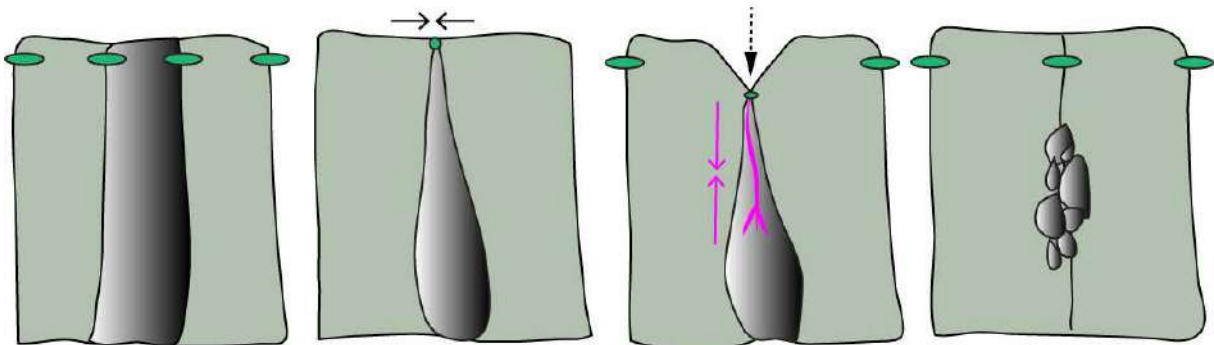


Figure 43. Problématique.

1. Quels sont les mécanismes exacts mis en jeu lors de la force apico-basale ? Quels sont les points d'ancrage du câble de myosine ?
2. Quel est le comportement de la cellule apoptotique dans un milieu intégré ?

Ces dernières années, les biologistes se sont beaucoup intéressés à ce que l'on appelle la biophysique. Cela correspond à l'étude des forces physiques générées par les cellules ayant une influence non négligeable sur le monde du vivant. Notamment, en biologie du développement où de nombreuses études ont montré l'importance des forces mécaniques dans l'évolution d'un individu. Récemment, *in vivo*, il a été montré que des forces mécaniques autres que planaires pouvaient être requises lors de la morphogenèse (Sherrard et al. 2010, Monier et al. 2015). C'est notamment le cas lors du développement de la patte de la drosophile où il a été montré par l'équipe que les cellules apoptotiques sont capables de générer des forces dans l'axe apico-basal de l'épithélium. Cependant, nous savons encore très peu de choses sur les mécanismes exacts qui permettent la génération des forces apico-basales. Il paraît donc essentiel d'étudier ces forces afin d'affiner la connaissance des phénomènes de morphogenèse indispensables au développement d'un individu.

De plus, les nombreuses études disponibles sur l'apoptose ont principalement été réalisées *in vitro*. Aujourd'hui, l'émergence de nouveaux outils nous permet d'observer plus finement le comportement de l'apoptose dans un milieu intégré. Ainsi, il a été découvert que la cellule entrant en apoptose ne fait pas que subir un processus de destruction ordonnée mais se montre très active au sein de son environnement, jusqu'à sa fragmentation. Il est donc important d'étudier avec plus de précision la dynamique de ces cellules mourantes en temps réel afin de caractériser le comportement individuel des cellules apoptotiques et de déterminer comment il est intégré dans son environnement. Une analyse fine pourrait aussi nous permettre d'identifier d'éventuelles nouvelles étapes non soupçonnées à ce jour dans ce processus de destruction coordonnée de la cellule, comme, par exemple, la dynamique du noyau et sa fragmentation, dont les mécanismes sont mal connus.

Ainsi ma thèse s'est articulée autour de deux objectifs principaux (**Figure 43**) :

- (1) Caractériser avec précision le mécanisme cellulaire permettant la génération de la force apico-basale.**
- (2) Analyser la dynamique de la cellule apoptotique dans un système intégré.**

RESULTATS

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la force apico-basale générée par les cellules apoptotiques. Cette étude a pu être réalisée grâce à l'élaboration préalable d'un nouvel outil. Dans une première partie je m'attache à vous présenter mes résultats publiés sous forme de deux articles précédés par une brève introduction :

Le premier article présente l'élaboration d'un nouvel outil important pour la visualisation des cellules apoptotiques. Ce travail est le fruit d'un travail collectif de toute l'équipe.

Le deuxième article présente les résultats principaux obtenus durant mes années de thèse. Ce travail a été réalisé en collaboration avec un autre étudiant en thèse, Arnaud Ambrosini.

En plus d'avoir mis en évidence un mécanisme de force apico-basale novateur, mon travail pose d'autres questions. Dans une seconde partie, j'exposerai mes résultats préliminaires concernant deux thématiques.

Premièrement, quel est le mécanisme permettant la relocalisation du noyau dans les cellules apoptotiques ? J'ai montré que Klarsicht intervient dans ce processus mais quel rôle joue-t-il ? Les microtubules, avec lesquels il interagit (Long et al. 2013), sont-ils importants pour la relocalisation du noyau apoptotique ? L'étude des mécanismes de relocalisation du noyau pourrait mettre en avant un nouveau processus de positionnement nucléaire associé à un processus développemental et un rôle précoce des microtubules lors de l'apoptose.

Deuxièmement, la découverte de la génération d'une force dans la cellule qui meurt amène à se demander si elle est générée seulement pour induire un changement de forme du tissu ou si elle est aussi générée à des fins de destruction. Par ailleurs, peu de choses sont décrites sur les mécanismes de fragmentation *in vivo*. Etudier la dynamique de la phase tardive de l'apoptose pourrait aider à identifier la machinerie nécessaire à la fragmentation de son noyau.

I. Observer la mort en direct !

Visualiser les cellules apoptotiques n'était pas si facile ! L'apoptose est un phénomène transitoire conduisant à la disparition des cellules, ce qui rend son analyse en temps réel complexe. Les outils disponibles lorsque j'ai débuté ma thèse ne permettaient pas l'observation de la totalité des événements apoptotiques. Ils permettaient l'analyse des phases tardives de l'apoptose sur du tissu fixé. Par exemple, le TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) détecte spécifiquement l'ADN fragmenté (Negoescu et al. 1996, Negoescu et al. 1998). Une large gamme d'anticorps est également disponible dans le commerce. Ces différentes techniques sont très efficaces pour repérer les cellules mourantes sur du tissu fixé (Sarkissian et al. 2014). Or, l'équipe s'intéresse plus particulièrement aux étapes très précoces de l'apoptose et souhaite les observer avec une grande précision non seulement sur des tissus fixés mais également sur des tissus vivants. Bien que des outils plus récents aient été développés, ceux-ci ne permettaient pas de répondre à nos questions. C'est notamment le cas de la sonde FRET clivable par les caspases (Takemoto et al. 2003). Cet outil demande une analyse post-acquisition lourde. Les cellules mourantes sont repérables par un signal négatif ne pouvant être repéré qu'après l'acquisition des images grâce un traitement adapté. Or, notre but n'est pas simplement de repérer les cellules qui meurent mais de suivre en détail leur comportement.

En effet, comprendre le remodelage subcellulaire de la cellule apoptotique conduisant à la formation des plis nécessite une détection précoce et directe des cellules apoptotiques. C'est pour cela que l'équipe a voulu adapter chez la drosophile un outil développé chez les mammifères, révélant en temps réel la dynamique apoptotique à travers l'activité des caspases (Zhang et al. 2013). J'ai activement participé à la conception de ces nouveaux outils nommés GC3Ai, VC3Ai et CC3Ai. En effet, j'ai aidé à la réalisation des clonages et j'ai effectué la caractérisation de la fonctionnalité de l'un de ces outils, CC3Ai.

Ces outils sont des bio-sensor protéiques cycliques composés d'un fluorochrome (GFP, Venus, CFP) et d'un site clivable par les caspases effectrices. La construction est dans une conformation non fluorescente dans les cellules saines. Mais lorsque les caspases effectrices sont actives, elles vont cliver le site DEVD, site clivable par les caspases effectrices chez la

drosophile. Ce clivage va donc entraîner un changement de conformation de la protéine qui devient alors fluorescente. Ces outils nous ont permis de détecter et observer avec aisance les cellules mourantes dans des tissus vivants en temps réel et en trois dimensions permettant de suivre leur évolution dès les tout premiers stades du déclenchement de la cascade apoptotique.

L'obtention de tels outils dans l'équipe a permis de répondre à de nombreuses questions des différents projets de l'équipe. Notamment, son utilisation m'a permis de dévoiler les mécanismes nécessaires à la génération d'une force apico-basale par les cellules apoptotiques, sujet du deuxième article.

A FLUORESCENT TOOLKIT
FOR SPATIOTEMPORAL
TRACKING OF APOPTOTIC
CELLS IN LIVING
DROSOPHILA TISSUES

A fluorescent toolkit for spatiotemporal tracking of apoptotic cells in living *Drosophila* tissues

Sonia Schott, Arnaud Ambrosini*, Audrey Barbaste*, Corinne Benassayag*, Mélanie Gracia*, Amscha Proag*, Mégane Rayer*, Bruno Monier[‡] and Magali Suzanne[‡]

ABSTRACT

Far from being passive, apoptotic cells influence their environment. For example, they promote tissue folding, myoblast fusion and modulate tumor growth. Understanding the role of apoptotic cells necessitates their efficient tracking within living tissues, a task that is currently challenging. In order to easily spot apoptotic cells in developing *Drosophila* tissues, we generated a series of fly lines expressing different fluorescent sensors of caspase activity. We show that three of these reporters (GFP-, Cerulean- and Venus-derived molecules) are detected specifically in apoptotic cells and throughout the whole process of programmed cell death. These reporters allow the specific visualization of apoptotic cells directly within living tissues, without any post-acquisition processing. They overcome the limitations of other apoptosis detection methods developed so far and, notably, they can be combined with any kind of fluorophore.

KEY WORDS: Apoptosis, Caspase-activity sensor, *Drosophila*, Live imaging

INTRODUCTION

The main function of epithelia is to form and maintain a physical barrier between different compartments of the body. Within epithelia, cells are highly polarized and organized in monolayers. They are connected by adhesive complexes such as apical tight junctions and adherens junctions, as well as basal focal adhesions. This organization ensures tissue integrity, a characteristic that needs to be maintained but is constantly challenged by cell division, cell death or cell intercalation. An epithelium has to deal constantly with the plasticity required to allow tissue growth and remodeling on the one hand and the maintenance of tissue cohesiveness on the other. In recent years, live imaging has become a crucial tool with which to identify cellular mechanisms involved in tissue plasticity.

Recent work has revealed that cells dying through programmed cell death (or apoptosis) can influence their environment either through biochemical communication or through the generation of mechanical forces (for reviews see Ambrosini et al., 2016; Pérez-Garijo and Steller, 2015; Suzanne and Steller, 2013). For example, apoptotic cells play an important role in the remodeling of epithelia, such as during *Drosophila* dorsal closure, histoblast expansion or mouse neural closure (Teng et al., 2017; Toyama et al., 2008;

Yamaguchi et al., 2011). More recently, we have provided evidence that apoptotic cells of a columnar epithelium produce an apicobasal force that leads to tissue folding in the fly developing leg (Monier et al., 2015). Apoptotic cells also play a key role in vertebrate myoblast fusion and promote the growth of some tumors (Ford et al., 2015; Hochreiter-Hufford et al., 2013; Huang et al., 2011). Altogether, it is becoming clear that apoptotic cells communicate with their surroundings, which highlights the importance of studying apoptosis in an integrated model system. Understanding the role of apoptotic cells during developmental events makes it necessary to identify them easily and unambiguously, as well as to finely characterize their dynamics. Such a task has been particularly challenging so far because epithelial cells within living tissues are tightly packed. Furthermore, cells undergoing apoptosis progressively disappear, which narrows the window of observation.


Apoptosis is orchestrated by the hierarchical activation of cysteine proteases known as caspases that promote the sequential dismantling of doomed cells (Crawford and Wells, 2011). In *Drosophila*, death signals, such as expression of the proapoptotic genes *reaper* (*rpr*), *hid* or *grim*, trigger the degradation of the anti-apoptotic molecule Diap1, therefore promoting activation of upstream caspases (such as Dronc), which in turn activates effector caspases such as Dcp1 or Drice that usually cleave DEVD sequences (Fuchs and Steller, 2015). *Drosophila* is a model of choice for studying both the role and dynamics of apoptotic cells, yet available tools to track apoptosis in living tissues remain scarce. Doomed cells can be spotted using TUNEL staining or antibodies specific to activated caspases or to caspase targets, but this approach restricts the analysis to fixed tissues (Sarkissian et al., 2014; Williams et al., 2006). Additional methods have been developed to follow caspase activation (Arama and Steller, 2006; Bardet et al., 2008; Ding et al., 2016; Koto et al., 2009; Takemoto et al., 2003; Tang et al., 2015; To et al., 2015), yet all of them have limitations. So far, they provide only limited access to apoptotic cell dynamics either because they require post-acquisition image processing, such as FRET analysis, because they only detect late apoptotic cells or because they are activated in all cells that experience caspase activation whether they die or not (see Fig. S1). This prompted us to investigate whether alternative methods of detection of caspase activity could be implemented in *Drosophila* to easily follow the dynamics of dying cells in living tissues.

Interestingly, Li and co-workers (Zhang et al., 2013) recently generated four cyclized chimera proteins containing a caspase 3 cleavage site that behave as switch-on fluorescent-based indicators of apoptosis in cultured mammalian cells. When cleaved by a caspase3-like protease, the non-fluorescent indicator becomes rapidly fluorescent and thus detects the activation of such caspases (DEVDases) in real-time (Fig. 1A; Fig. S2). We have adapted these constructs to the *Drosophila* model. Here, we show that three of these fluorescent-based constructs allow efficient

LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS/UPS, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

*These authors contributed equally to this work

[‡]Authors for correspondence (magali.suzanne@univ-tlse3.fr; bruno.monier@univ-tlse3.fr)

 B.M., 0000-0002-3553-6396; M.S., 0000-0003-0801-3706

Received 31 January 2017; Accepted 29 August 2017

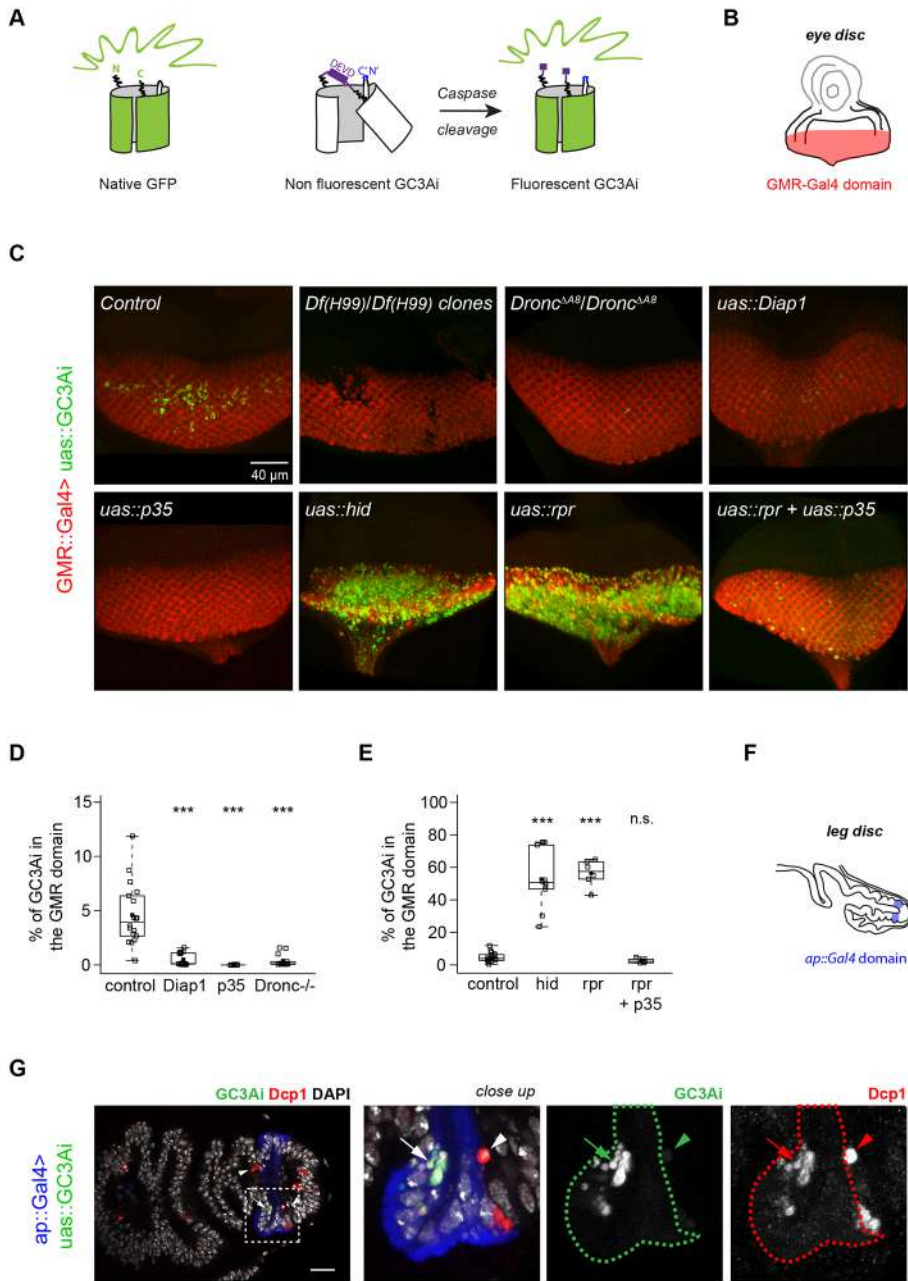


Fig. 1. GC3Ai, a GFP sensor responding to the apoptotic pathway in *Drosophila*. (A) Scheme of the GFP sensor caspase-3-like protease activity indicator (GC3Ai): the C and N termini of the GFP have been linked by a fragment containing a DEVD caspase cleavage site in such a way that DEVD needs to be cleaved in order for the GFP to fluoresce (see Fig. S2 or Zhang et al., 2013 for a more detailed description). (B) Scheme of the L3 eye-antennal disc showing the GMR-Gal4 expression domain. (C) Fixed eye discs from L3 larvae showing the pattern of GC3Ai fluorescence (green) in the GMR::Gal4 expression domain. In all the indicated genetic contexts, the whole GMR domain is labeled in red by the detection of GC3Ai expression with an anti-GFP antibody (detecting both the active and inactive conformations of GC3Ai), except in the H99 mutant context, in which GC3Ai is expressed only in the mutant clones. (D,E) Quantification of GC3Ai fluorescence within the GMR expression domain in the different genotypes illustrated in C. Individual eye discs (open squares) as well as the mean (closed square) are shown on the box plots. ****P*<0.005; n.s., non-significant. In C, D and E, the number of discs analyzed was: control (18); *uas::Diap1* (14); *uas::p35* (16); *uas::hid* (10); *uas::rpr* (6); *uas::rpr+uas::p35* (6); *DroncΔA8/DroncΔA8* (14); and *Df(H99) /Df(H99)* (8). (F) Scheme of a pupal leg disc showing the *ap::Gal4* expression pattern in blue. (G) A fixed pupal leg disc (*n*=10 legs) showing the pattern of GC3Ai fluorescence (green and white) in the *ap* domain and Dcp1 activity in the whole leg (red and white). Anti-GFP antibody is in blue. Apoptotic cells located in the *ap* domain show both GC3Ai and Dcp1 activity (arrows), whereas only Dcp1 is detected in those located outside the *ap* domain (arrowheads).

detection of apoptotic cells within a whole tissue (fixed or live), both in normal developmental conditions or after apoptosis induction. We therefore introduce new tools that allow easy visualization of the whole apoptotic process within living *Drosophila* tissues, from the very beginning of the apoptotic process to cell fragmentation and formation of apoptotic bodies. Moreover, the possibility to combine apoptosis detection with any other fluorescent fusion protein makes these sensors particularly useful.

RESULTS AND DISCUSSION

A new tool to detect the activity of caspases in *Drosophila*: the GFP sensor GC3Ai

In order to determine whether the GFP-based variant of caspase 3-like proteases activity indicator (GC3Ai, Fig. 1A) is an efficient reporter of the activation of the apoptotic pathway in *Drosophila*, as it is in mammalian cells in culture, we generated stable transgenic *UAS::GC3Ai* fly lines. First, we asked whether the expression of this

construct per se leads to potential side effects. We could show that its ubiquitous expression has little impact on viability (see Fig. S3A). Furthermore, comparison of the level of apoptosis in presence or in absence of *UAS::GC3Ai* demonstrates that this molecule has little effect, if any, on the rate of apoptosis (see Fig. S3B,C). We next characterized the pattern of GC3Ai fluorescence (hereafter called the activation pattern) by expressing GC3Ai in the eye using the *GMR::Gal4* driver (Fig. 1B). GC3Ai is detected in a small number of cells within the eye disc (Fig. 1C, control), a pattern reminiscent of the apoptotic pattern in this tissue (White et al., 1996). As expected, GC3Ai activation is abolished in cells that are homozygous mutant for the H99 deficiency (which removes the three pro-apoptotic genes *hid*, *rpr* and *grim*) or for the activator caspase *Dronc* (Fig. 1C,D). GC3Ai activation also disappears if apoptosis is blocked either by the expression of the anti-apoptotic factor Diap1 [which suppresses apoptosis by blocking both activator and effector caspases (Hay et al., 1994)] or p35 [which

blocks only effector caspases (Hay et al., 1995)] (Fig. 1C,D). Conversely, expression of the pro-apoptotic genes *rpr* or *hid* greatly increases the activation domain of GC3Ai, reaching around 50 to 60% of the whole GMR domain (Fig. 1C,E). Finally, if p35 is co-expressed with Rpr, the activation of GCA3i diminishes drastically (Fig. 1C,E). Altogether, these results indicate that GC3Ai activity responds to the apoptotic machinery in the fly, as it does in mammalian cells (Zhang et al., 2013). Furthermore, the fact that GC3Ai activity is fully suppressed by p35 (Fig. 1C,D,E), which does not inhibit activator caspases (Hay et al., 1995), suggests that the GC3Ai biosensor reports essentially, if not only, the activity of effector caspases.

As the experiments presented above suggest that the GC3Ai apoptosensor is activated by effector caspases, we hypothesized that GC3Ai staining should colocalize with staining of activated effector caspases in fixed tissues. We therefore expressed GC3Ai in the leg disc at the onset of metamorphosis using the *ap::Gal4* driver (Fig. 1F), a tissue in which the pattern and morphology of dying cells have previously been described (Monier et al., 2015). We counterstained with an antibody against the active form of the effector caspase Dcp1 (Sarkissian et al., 2014) and found that 99% ($\pm 1\%$) of Dcp1-positive cells are also GC3Ai positive (Fig. 1G, quantifications detailed in the

Materials and Methods). Furthermore, we show that GC3Ai and the active form of Dcp1 are both detected in the same population of cells in a variety of tissues at distinct developmental stages, ranging from the embryonic ectoderm to larval tissues (imaginal discs and brain) and the pupal notum (Fig. S4). Altogether, our results indicate that GC3Ai efficiently detects apoptotic cells, thus validating the construct as a GFP apoptosensor in *Drosophila*.

GC3Ai is an efficient tool with which to follow apoptotic cell dynamics

In order to assess the suitability of GC3Ai for live imaging, we expressed and imaged it in the developing leg, a tissue in which apoptotic dynamics has been previously characterized using a FRET probe (Monier et al., 2015). Importantly, we found that the signal-to-noise ratio was high, even at low laser power, indicating that GC3Ai is adequate for good quality detection of apoptotic cells *in vivo* in optimal conditions for tissue culture. We therefore followed apoptotic cell dynamics *in vivo* and found that fluorescent GC3Ai is strongly and specifically detected in apoptotic cells, from a very early stage until cell fragmentation (Fig. 2A,B, Movie 1). Interestingly, the strong cytoplasmic signal obtained with GC3Ai makes it possible to follow the whole process of apoptotic cell

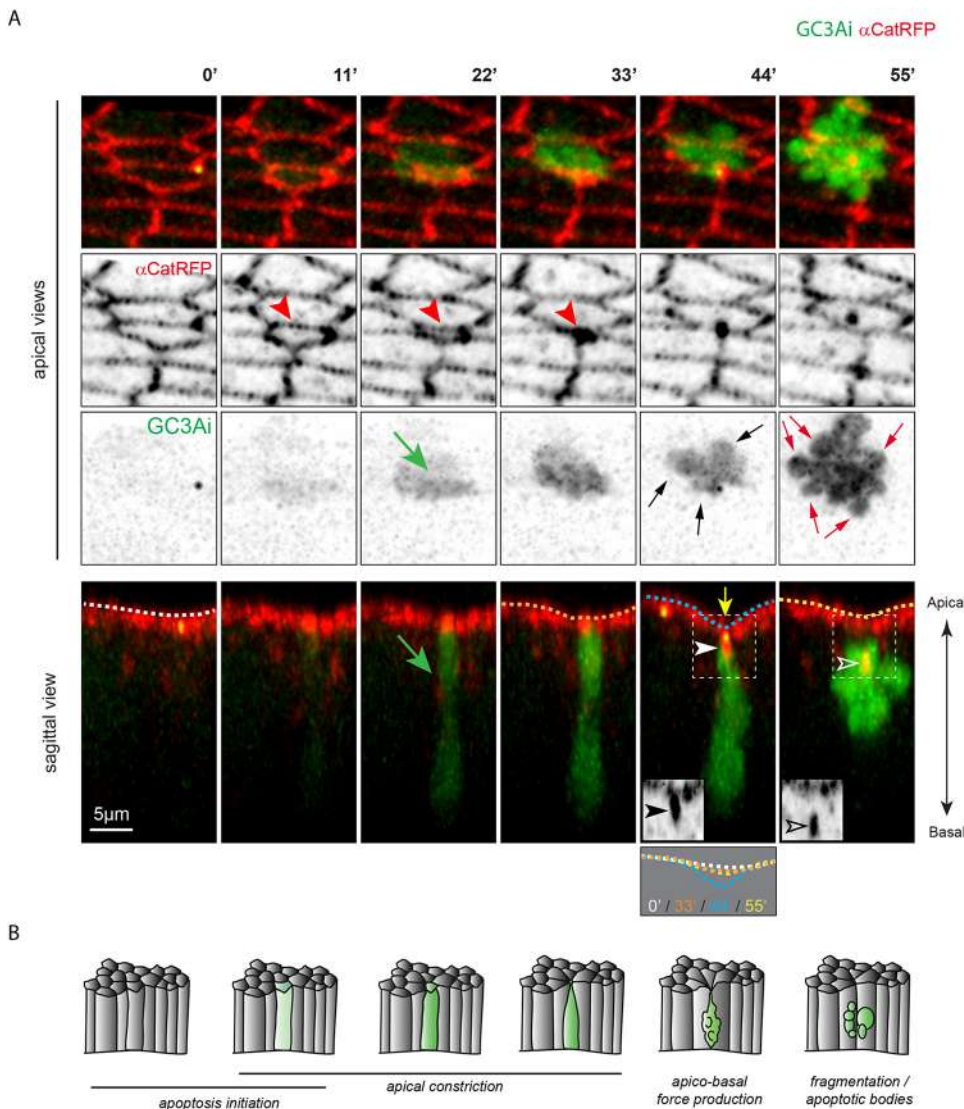


Fig. 2. Dynamics of GC3Ai pattern of fluorescence in a living tissue. (A) Confocal images extracted from Movie 1 showing the dynamics of GC3Ai fluorescence (green or black) and alpha-catenin-TagRFP (red or black) in one apoptotic cell of a pupal leg disc ($n=11$). Apical views are presented in the upper panels and the corresponding sagittal sections below. GC3Ai activation (green arrows) is detected before the completion of apical constriction (red arrowheads). Black and red arrows indicate, respectively, blebs and apoptotic bodies. In sagittal sections, arrowheads indicate apoptotic adherens junction accumulation, before (closed) and after (open) detachment. Apical deformation is highlighted with a yellow arrow and apical surface drawings (dashed lines). (B) Schemes of the apoptotic stages visualized in A, summarizing the dynamics of the GC3Ai activation pattern *in vivo*.

morphological changes in detail. This includes a first step of apical constriction of the apoptotic cell (Fig. 2A, red arrowheads, 11' to 33'), which culminates with adherens junction accumulation in the dying cell underneath yet in continuity with the adherens junctions of neighboring living cells (Fig. 2A, black and white arrowheads, 44'). At the same timepoint, apoptotic cell blebbing (Coleman et al., 2001) is visualized as round unfragmented protrusions (Fig. 2A, black arrows, 44') while apical surface deformation of living neighboring cells (Fig. 2A, yellow arrow, superposition of dashed lines) reveals the generation of a transient apico-basal apoptotic force (Monier et al., 2015). The GC3Ai signal perdures right up to cell fragmentation (red arrows) which occurs concomitantly with detachment of the apoptotic adherens junctions (Fig. 2A, open arrowheads, 55'). Hence, apoptotic cell tracking through GC3Ai recapitulates the known morphological behavior of apoptotic cells in the leg disc, which has been initially visualized using the FRET sensor of caspase activity (Monier et al., 2015; Takemoto et al., 2003). Interestingly, both GC3Ai and the FRET sensor detect early events of the apoptotic process (detection of the apoptotic cells during apical constriction); however, GC3Ai surpasses the FRET probe in several aspects. First, it provides the ability to directly visualize an apoptotic cell under the microscope, whereas the FRET probe requires post-acquisition treatment to spot a dying cell. GC3Ai also allows 3D rendering of the cellular morphology of dying cells. Supporting this, individual apoptotic fragments can be counted and quantified using GC3Ai, which is extremely difficult or even impossible solely on the basis of the FRET probe (Fig. S5).

We next characterized the pattern of GC3Ai in fixed tissues. Interestingly, GC3Ai can be detected early during the apoptotic process, as shown by its detection in columnar cells, before the completion of apical constriction, a stage at which it is not possible

to detect apoptotic cells using conventional tools such as anti-activated Dcp1 staining (Fig. 3, 'apoptosis initiation'). We further demonstrated that more apoptotic fragments can be detected with GC3Ai than with Dcp1 staining, showing that GC3Ai allows detection of late apoptotic stages that cannot be analyzed using conventional strategies (Fig. 3, 'apoptotic bodies'). Altogether, these results reveal that the GC3Ai pattern of activation is similar in both fixed and living tissues. GC3Ai is an efficient sensor of apoptosis that possesses an even higher sensitivity than Dcp1 in fixed tissues and allows real-time *in vivo* analysis, making GC3Ai a versatile tool with which to study apoptotic cell dynamics in the fly.

Additional fluorophores implement the aptosensor toolkit

To further implement the aptosensor toolkit, we generated UAS lines with three other fluorescent versions of the aptosensor initially developed by Li and colleagues (mCherry-, Cerulean- and Venus-derived constructs, respectively RC3Ai, CC3Ai and VC3Ai) (Zhang et al., 2013). We tested these different lines by expressing them in the developing leg. Expression of the *UAS-RC3Ai* transgene leads to the formation of aggregates in all cell types (apoptotic or not), indicating that this C3Ai variant is inadequate to report apoptosis in the fly (data not shown). Alternative strategies, such as the one recently developed by To and colleagues (To et al., 2016) to label apoptotic cells in zebrafish could be considered in the future to engineer a red aptosensor in *Drosophila*.

To characterize CC3Ai and VC3Ai constructs, we first combined them with GC3Ai and expressed them in the leg disc. Sequential detection of each one of these constructs with specific filters show that they are suitable for live imaging (good quality detection with low laser power). As expected, CC3Ai and VC3Ai are detected in apoptotic cells, as shown by their co-detection with GC3Ai (Fig. 4A,B).

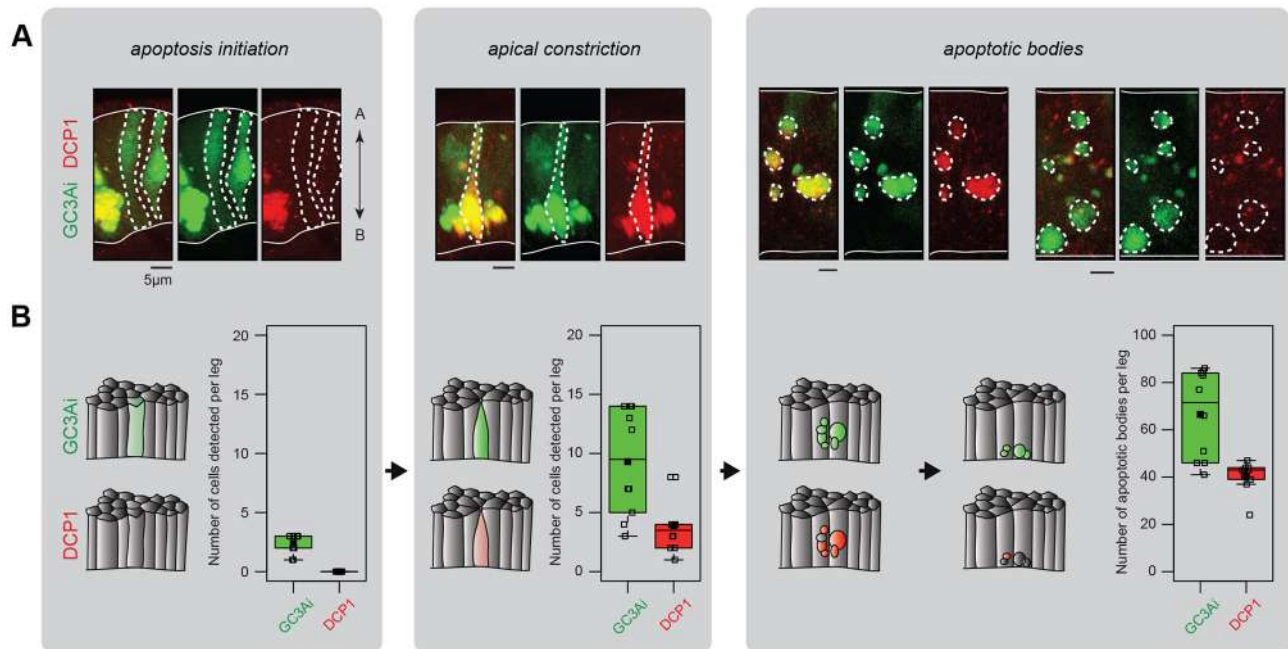


Fig. 3. GC3Ai is specifically detected in apoptotic cells. (A,B) GC3Ai (green) and Dcp1 (red) activation patterns are compared in fixed pupal leg discs at successive stages of the apoptotic process (left to right) using confocal images (A) or quantifications (B). In A, apoptotic cells or fragments are surrounded by white dotted lines, and apical and basal surfaces of the epithelium are represented by a white line. (B) Quantification of the number of GC3Ai- and Dcp1-positive apoptotic cells or apoptotic bodies per leg disc ($n=10$ legs). Individual leg discs (open squares) as well as the mean (closed square) are shown on the box plots. Schemes of the different apoptotic stages recapitulating the activation pattern of GC3Ai and Dcp1 are presented on the left.

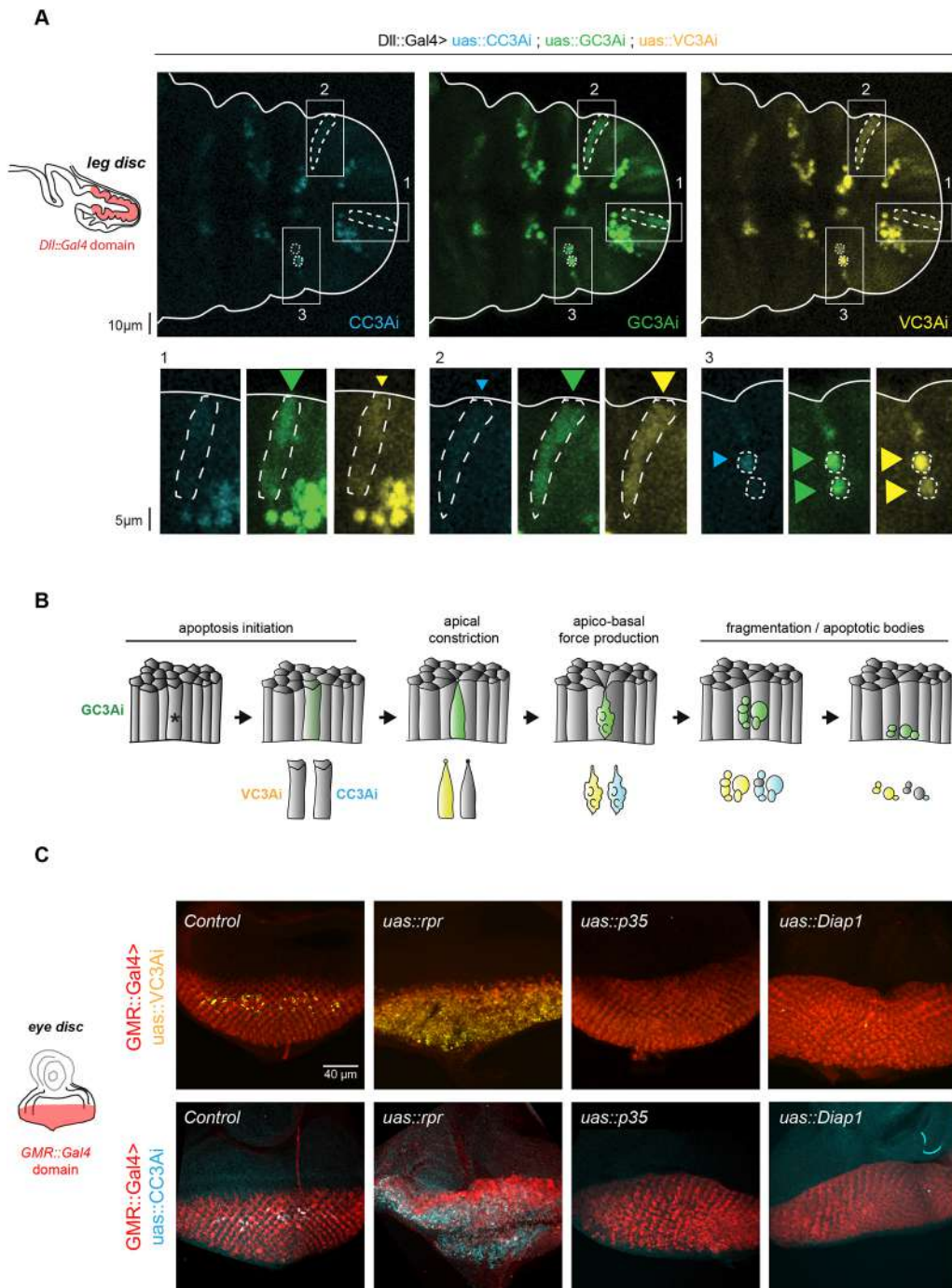


Fig. 4. Characterization of Cerulean and Venus apoptosensors in *Drosophila* tissues. (A) Comparison of GC3Ai, VC3Ai and CC3Ai patterns of fluorescence in the same living leg disc ($n=8$ legs). Different filters were used to detect the different fluorophores in optimal conditions. Areas 1, 2 and 3 correspond to different apoptotic stages and show the temporal shift in the detection of each sensor, GC3Ai being detected first at an early stage (1, green arrowhead), while VC3Ai is barely detectable (1, yellow arrowhead) and CC3Ai is absent; then VC3Ai is detected (2, yellow arrowhead), while CC3Ai is barely detectable. Finally, GC3Ai and VC3Ai are strongly detected in apoptotic bodies, while CC3Ai is only visible in some fragments (3). (B) The dynamics of GC3Ai, VC3Ai and CC3Ai patterns of fluorescence in living tissues. (C) Fixed eye discs from L3 larvae showing the pattern of CC3Ai and VC3Ai fluorescence (cyan and yellow, respectively) in the *GMR::Gal4* expression domain in the indicated genetic contexts. The number of discs analyzed was: control (10 and 8); *uas::Diap1* (8 and 11); *uas::p35* (9 and 10); *uas::rpr* (7 and 7), respectively, for VC3Ai and CC3Ai.

We noted, however, that VC3Ai appears to be detected earlier (during the completion of apical constriction) than CC3Ai, which is weakly or not detected in early apoptotic cells (Fig. 4A,B). We further checked that CC3Ai and VC3Ai are co-detected in Dcp1-positive cells in fixed tissues and quantified the proportion of VC3Ai- and CC3Ai-positive cells at different apoptotic stages (Fig. S6). In summary, the three constructs differ slightly in their temporal detection, appearing successively during the apoptotic process: first GC3Ai, then VC3Ai followed by CC3Ai. Finally, we tested their sensitivity to the apoptotic pathway by analyzing their activation pattern in the imaginal eye disc in different genetic contexts. Similarly to GC3Ai, ectopic expression of *rpr* leads to strong activation of CC3Ai and VC3Ai, while blocking apoptosis using *Diap1* or *p35* expression abolishes their activation

(Fig. 4C). These results validate the use of CC3Ai or VC3Ai as alternative apoptosis reporters to GC3Ai.

To conclude, the apoptosensors described here offer the opportunity to recognize caspase activity and apoptotic cells directly within *Drosophila* tissues. These tools do not require post-acquisition processing and can be used either in fixed or living samples, bypassing the potential limitation of antibodies. These constructs detect a wide range of apoptotic stages and constitute excellent tools for following apoptotic cell dynamics within living tissues, particularly GC3Ai, which surpasses the detection range of Dcp1. Finally, the possibility of combining these apoptosensors with any other fluorescent marker provides a considerable stepping stone for analyzing the dynamics of tagged cellular components in apoptotic cells.

MATERIALS AND METHODS

Cloning

CC3Ai, GC3Ai, VC3Ai and RC3Ai cDNAs (a gift from Binghui Li's Lab, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, China) were individually cloned into the *EcoRI* site of pUAST *Drosophila* expression vector (a gift from C. Iampietro, LBCMCP, CBI, France) using the In-Fusion HD Cloning System (Clontech). The forward primer used to amplify the CC3Ai, GC3Ai, VC3Ai and RC3Ai cDNAs (including HA tag) was AG-GGAATTGGGAATTCGCCACCATGTACCCCTACGACGTG. The reverse primer used to amplify CC3Ai, GC3Ai and VC3Ai (including Myc tag) was ATCTGTTAACGAATTCGGCTTACAGGTCCTCCTCGCTGATC. The reverse primer used to amplify RC3Ai was ATCTGTTAACGAATTC-GCGGCCGCTTACACATTAATACTA.

Genetics

pUAST-CC3Ai, pUAST-GC3Ai, pUAST-VC3Ai and pUAST-RC3Ai were generated in this study. P-element transformations were performed by the CBMSO *Drosophila* Transgenesis Service (Madrid, Spain) using random insertion in a *white* background. Insertions were recovered on each chromosome.

Apoptosensor expression was achieved using the following Gal4 lines from Bloomington: *ap::Gal4[md544]*, *Dll::Gal4[EM212]*, *act5c::Gal4*, *hh::Gal4*, *en::Gal4*, *Tub::Gal4* and *GMR::Gal4*. Manipulation of apoptosis was performed using *uas::rpr*, *uas::p35*, *uas::Diap1-H*, *uas::Diap1-P*, *uas::hid[4]* and *uas::rpr; uas::p35* (a gift from H. Steller, Rockefeller University, USA). *UAS::Histone2Av-mKO* was crossed to *GMR::Gal4* and used as a control in the experiments reported in Fig. 1. *UAS::alphaCatenin-TagRFP* was a gift from K. Sugimura (iCeMS, Japan). Unless noted, stocks were obtained from Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC). *ubi::mCD8-DQVD-Gal4* and *G-TRACE* flies were obtained from M. Hardwick and D. Montell (Johns Hopkins Medicine, USA; UC Santa Barbara, USA) (Ding et al., 2016; Tang et al., 2015). *Dronc^{Δ48}* and *Drice^{Δ2C8}* mutants (Kondo et al., 2006) were gifts from M. Miura (University of Tokyo, Japan). Analysis of GC3Ai expression in absence of *hid*, *rpr* and *grim* was achieved by crossing *GMR::Gal4*, *uas::GC3Ai*; *Df(3L)H99*, *FRT2A* flies with *ey::Flp*; *tub::Gal80*, *FRT2A* flies. In this context, *GMR::Gal4* is expressed only in *Df(H99)^{-/-}* clones, which can be labeled positively by anti-GFP staining.

Imaging

Leg discs dissection, immunostaining and *ex vivo* cultures were performed as previously described (Monier et al., 2015). Embryo staining was performed as described previously (Monier et al., 2010). Confocal images were acquired using a Zeiss LSM880 confocal using 25×/0.8 immersion and 40×/1.3 immersion objectives.

Antibodies and probes used were: rabbit anti-cleaved Dcp1 #9578 (1/200, Cell Signaling Technologies); rabbit anti-GFP #ab290 (1/500, Abcam); chicken anti-GFP #1020 (1/1000, Avès lab); phalloidin-rhodamine (1/200, Invitrogen); and phalloidin-Alexa647 (1/100, Interchim). Secondary antibodies coupled to Cy5 were obtained from Jackson Laboratories and diluted 1/50.

Endogenous fluorescence of CC3Ai, GC3Ai and VC3Ai is detected directly following excitation at 405 nm or 458 nm to visualize Cerulean, 488 nm for superfolderGFP or 514 nm for Venus. Non-fluorescent GC3Ai (i.e. GC3Ai in non apoptotic cells) can be detected in fixed tissues using rabbit or chicken polyclonal antibody against GFP. FRET and FM4-64 membrane stainings were performed and analyzed as described previously (Monier et al., 2015).

Quantifications

To quantify the number of apoptotic cells and fragments in pupal leg discs, 3D image stacks were reconstructed using Imaris software (Bitplane) and smoothed using a 3 voxel-large median filter. Fluorescent objects (cells and apoptotic bodies) were segmented on each channel separately (Dcp1, CC3Ai, VC3Ai and GC3Ai, respectively) using the Imaris Surface tool with a manual threshold. Only objects larger than 4 μm³ were included in the count. To quantify the number of GC3Ai-positive apoptotic cells and fragments within the Dcp1-positive population, we considered objects with at least a 50% overlap over the Dcp1 and GC3Ai channels.

To quantify the response of GC3Ai to the apoptotic machinery in the imaginal eye (Fig. 1), discs were stained with rabbit anti-GFP to reveal the domain of GMR expression. 3D image stacks were reconstructed using Imaris software (Bitplane). Channels corresponding to endogenous GC3Ai fluorescence and the *GMR::Gal4* domain were segmented separately, as indicated above. The overall volume of GC3Ai endogenous fluorescence was normalized by the overall volume of the domain for each eye disc.

Statistics

On all graphs, data are presented as box plots with median, lower and upper quartiles, whiskers extending to 1.5 times the interquartile range, mean and individual measurements. Statistical comparison of GC3Ai fluorescence in the *GMR::Gal4* domain across conditions (Fig. 1D,E) or Dcp1 staining in *en::Gal4* domain across conditions (Fig. S3C) were assessed using the Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test. Asterisks indicate statistical significance: *** *P*<0.005.

Acknowledgements

We thank Binghui Li for sharing the sensor constructs; M. Hardwick, M. Miura, D. Montell and H. Steller for sharing stocks; E. Martin for comments on the manuscript; and the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) for numerous stocks used in this study.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: B.M., M.S.; Methodology: B.M., M.S.; Validation: A.A., A.B., C.B., M.G., A.P., M.R., B.M., M.S.; Formal analysis: A.P.; Investigation: S.S., A.A., A.B., C.B., M.G., A.P., M.R., B.M., M.S.; Writing - original draft: B.M., M.S.; Writing - review & editing: A.P., B.M., M.S.; Supervision: S.S., B.M., M.S.; Funding acquisition: M.S.

Funding

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union Horizon 2020 research and innovation program (grant number EPAF: 648001), from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (CA 09-12-2014) and from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Plan Cancer 2014-2019).

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.149807.supplemental>

References

- Ambrosini, A., Gracia, M., Proag, A., Rayer, M., Monier, B. and Suzanne, M. (2016). Apoptotic forces in tissue morphogenesis. *Mech. Dev.* **144**, 33-42.
- Arama, E. and Steller, H. (2006). Detection of apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling and acridine orange in *Drosophila* embryos and adult male gonads. *Nat. Protoc.* **1**, 1725-1731.
- Bardet, P.-L., Kolahgar, G., Mynett, A., Miguel-Aliaga, I., Briscoe, J., Meier, P. and Vincent, J.-P. (2008). A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13901-13905.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339-345.
- Crawford, E. D. and Wells, J. A. (2011). Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 1055-1087.
- Ding, A. X., Sun, G., Argaw, Y. G., Wong, J. O., Easwaran, S. and Montell, D. J. (2016). CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo. *Elife* **5**, e10936.
- Ford, C. A., Petrova, S., Pound, J. D., Voss, J. J. L. P., Melville, L., Paterson, M., Farnworth, S. L., Gallimore, A. M., Cuff, S., Wheadon, H. et al. (2015). Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma. *Curr. Biol.* **25**, 577-588.
- Fuchs, Y. and Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 329-344.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-2129.
- Hay, B. A., Wassarman, D. A. and Rubin, G. M. (1995). *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* **83**, 1253-1262.

- Hochreiter-Hufford, A. E., Lee, C. S., Kinchen, J. M., Sokolowski, J. D., Arandjelovic, S., Call, J. A., Klivanov, A. L., Yan, Z., Mandell, J. W. and Ravichandran, K. S. (2013). Phosphatidyserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature* **497**, 263-267.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.-F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.-C. et al. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* **17**, 860-866.
- Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y. and Miura, M. (2006). DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7258-7268.
- Koto, A., Kuranaga, E. and Miura, M. (2009). Temporal regulation of Drosophila IAP1 determines caspase functions in sensory organ development. *J. Cell Biol.* **187**, 219-231.
- Monier, B., Pélissier-Monier, A., Brand, A. H. and Sanson, B. (2010). An actomyosin-based barrier inhibits cell mixing at compartmental boundaries in Drosophila embryos. *Nat. Cell Biol.* **12**, 60-65; sup pp 61-69.
- 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.
- Pérez-Garijo, A. and Steller, H. (2015). Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development* **142**, 3253-3262.
- Sarkissian, T., Timmons, A., Arya, R., Abdelwahid, E. and White, K. (2014). Detecting apoptosis in Drosophila tissues and cells. *Methods* **68**, 89-96.
- Suzanne, M. and Steller, H. (2013). Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.* **20**, 669-675.
- Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. and Miura, M. (2003). Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* **160**, 235-243.
- Tang, H. L., Tang, H. M., Fung, M. C. and Hardwick, J. M. (2015). In vivo CaspaseTracker biosensor system for detecting anastasis and non-apoptotic caspase activity. *Sci. Rep.* **5**, 9015.
- Teng, X., Qin, L., Le Borgne, R. and Toyama, Y. (2017). Remodeling of adhesion and modulation of mechanical tensile forces during apoptosis in Drosophila epithelium. *Development* **144**, 95-105.
- To, T.-L., Piggott, B. J., Makhijani, K., Yu, D., Jan, Y. N. and Shu, X. (2015). Rationally designed fluorogenic protease reporter visualizes spatiotemporal dynamics of apoptosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 3338-3343.
- To, T.-L., Schepis, A., Ruiz-González, R., Zhang, Q., Yu, D., Dong, Z., Coughlin, S. R. and Shu, X. (2016). Rational design of a GFP-based fluorogenic caspase reporter for imaging apoptosis in vivo. *Cell Chem. Biol.* **23**, 875-882.
- 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.
- White, K., Tahaoglu, E. and Steller, H. (1996). Cell killing by the Drosophila gene reaper. *Science* **271**, 805-807.
- Williams, D. W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y. and Truman, J. W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* **9**, 1234-1236.
- 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, J., Wang, X., Cui, W., Wang, W., Zhang, H., Liu, L., Zhang, Z., Li, Z., Ying, G., Zhang, N. et al. (2013). Visualization of caspase-3-like activity in cells using a genetically encoded fluorescent biosensor activated by protein cleavage. *Nat. Commun.* **4**, 2157.

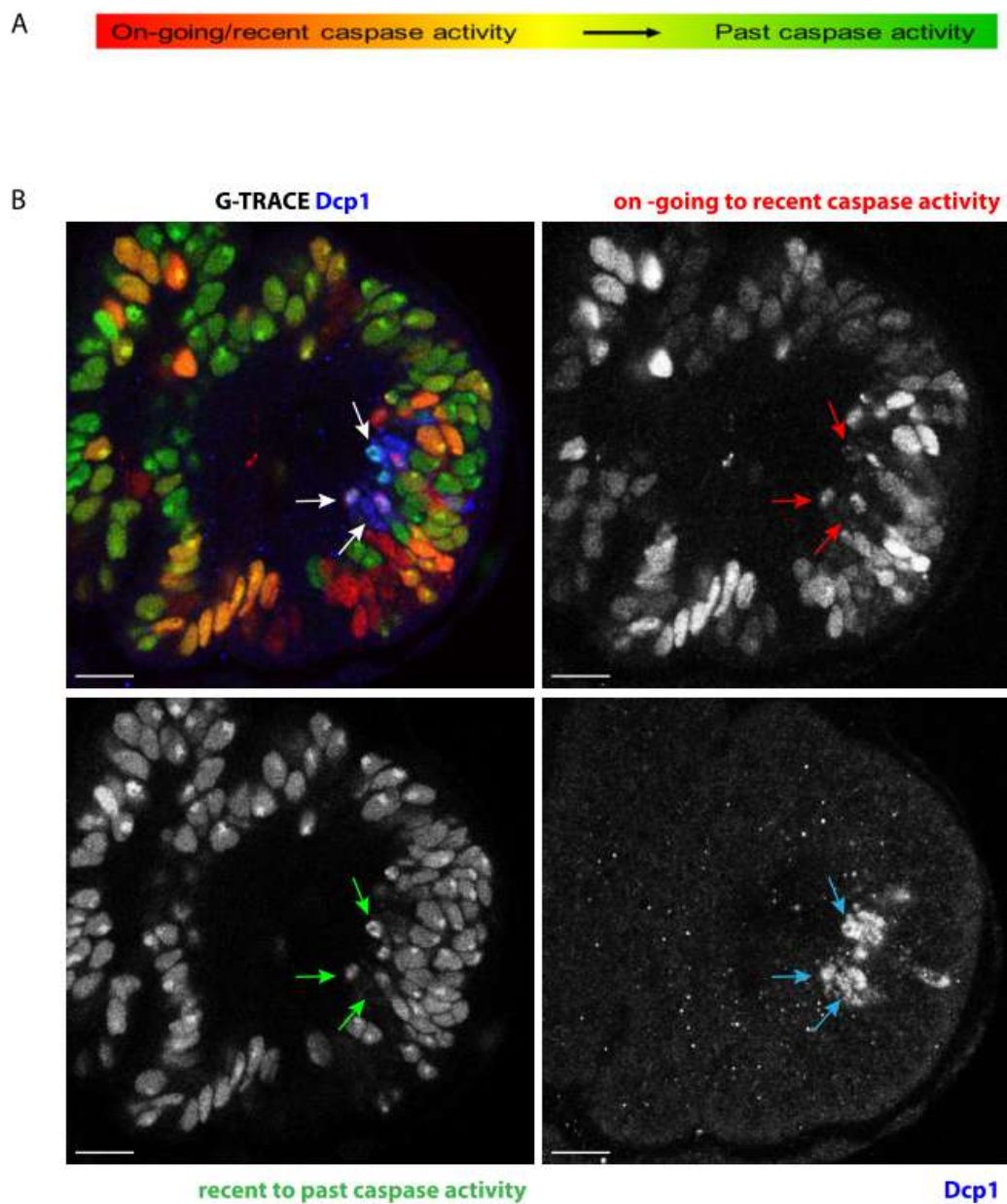


Figure S1: Activity of the caspase sensitive Gal4 sensor in the leg. A) Frieze representing the time scale labelling of caspase activity according to (Tang et al., 2015). (B) Pupal leg disc showing a wide expression of both nuclear GFP and RFP under the control of the caspase sensitive Gal4 sensor, while very few cells are positive for Dcp1 (arrows), suggesting that this caspase sensitive Gal4 can detect very low level of caspase activity, not always associated with death. Scale bar 10 μ m, N=10.

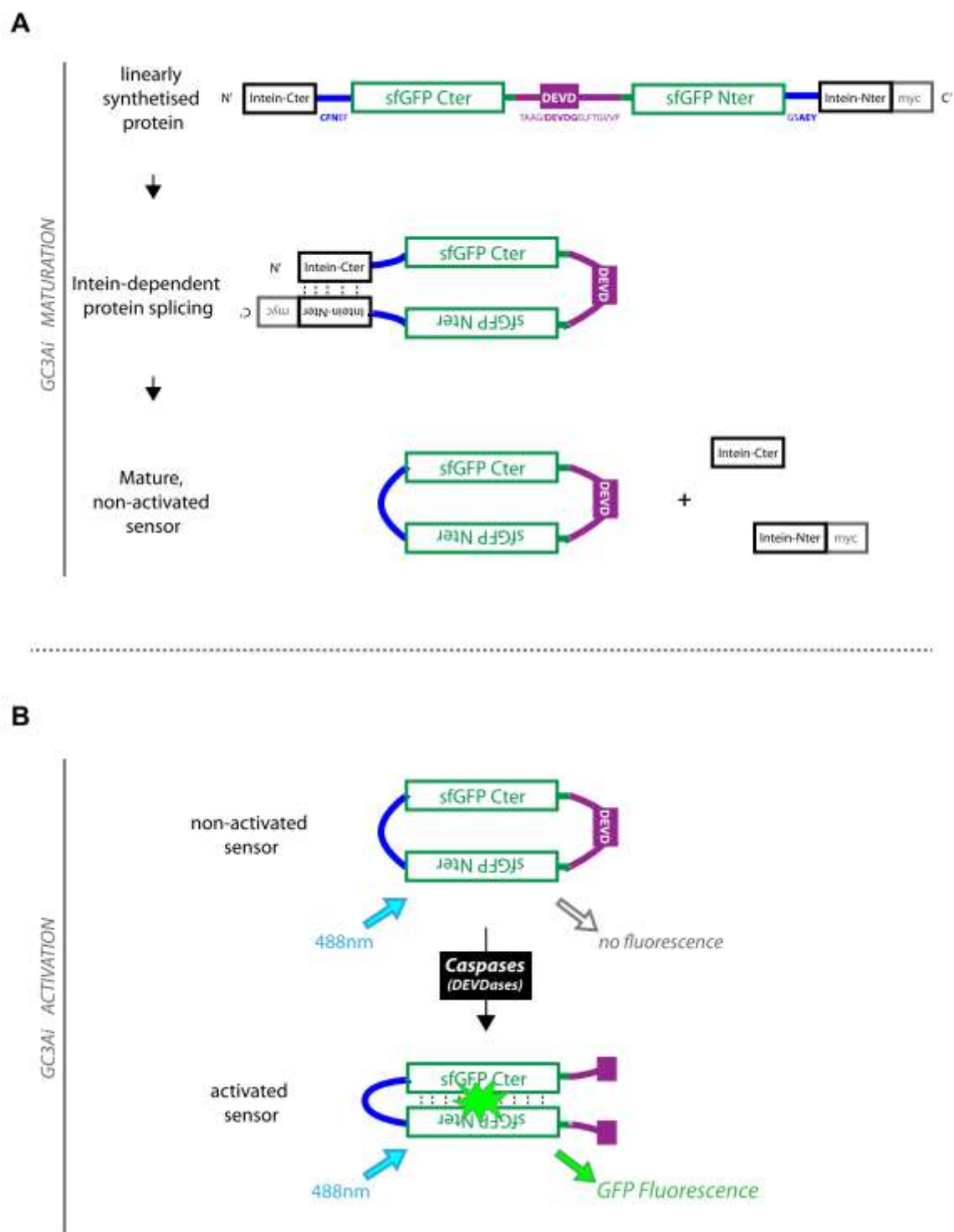


Figure S2. GC3Ai apoptosensor maturation and activation modes. Detailed scheme of the GFP sensor Caspase-3-like protease Activity Indicator (GC3Ai): the C and N termini of the GFP have been linked by a fragment containing a DEVD caspase cleavage site in such a way that DEVD needs to be cleaved in order for the GFP to fluoresce; while intein domains have been added at the new N' and C'

termini of the molecule, allowing the molecule to be circularized after intein dependent protein splicing (see (Zhang et al., 2013)).

Schott et al. FigS3

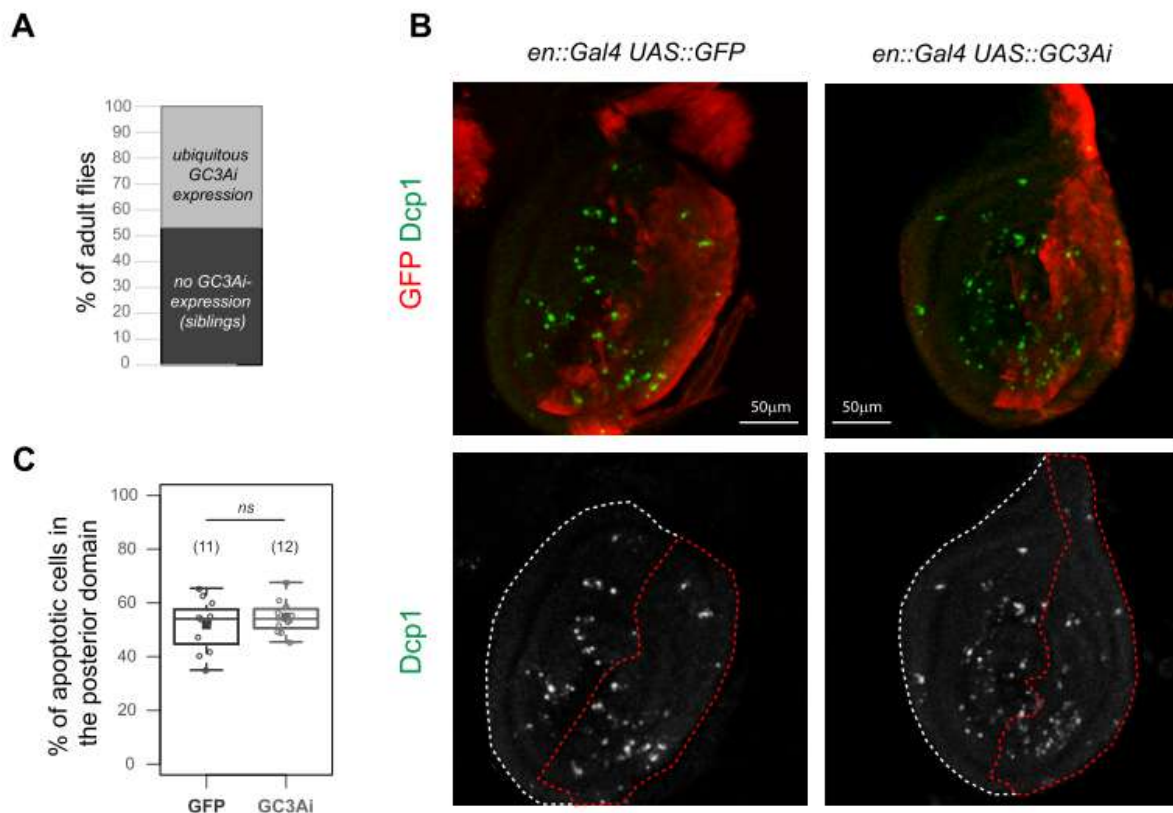


Figure S3. Effects of GC3Ai expression on viability and apoptotic pattern. (A) Comparison of the number of adult flies issued from the same cross between *act::Gal4 / CyO* and *uas::GC3Ai / uas::GC3Ai* flies (n=256 individuals in total). (B) Apoptotic pattern visualized by an anti-activated Dcp1 staining (green or white) in *en::Gal4>uas::GFP* (control) and *en::Gal4>uas::GC3Ai* leg discs. (C) Quantifications of apoptotic cells in the posterior domain (see M&M, n=11 and 12 respectively).

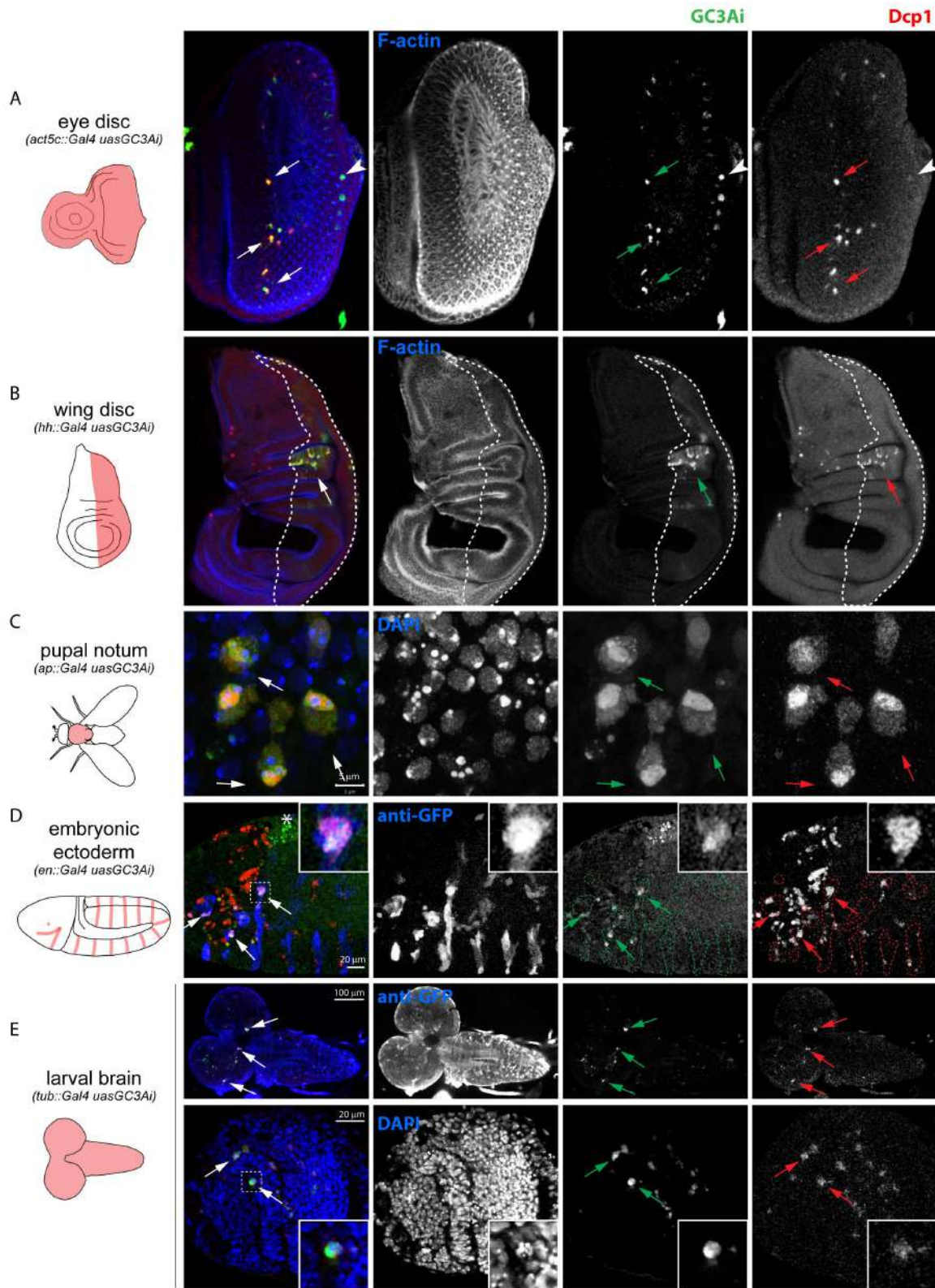


Figure S4. Pattern of GC3Ai fluorescence in various *Drosophila* tissues. (A-E) On the left are presented schemes of the different tissues showing the domain in which GC3Ai has been expressed. On the right, the GC3Ai activation pattern and activated Dcp1 antibody staining is shown. (A) Fixed eye discs (n=6) from *act::Gal4>uas::GC3Ai* L3 larvae. Note the presence of some GC3Ai positive

cells in which Dcp1 is not detectable yet, that could correspond to early apoptotic cells as shown in Fig3 (arrowhead). (B) Fixed wing imaginal discs from *hh::Gal4>uas::GC3Ai* L3 larvae (n=6). (C) Pupal notum from *ap::Gal4>uas::GC3Ai* (n=60 cells). (D) Ectoderm from *en::Gal4>uas::GC3Ai* embryos (n=8). (E) Larval central nervous system from *tub::Gal4>uas::GC3Ai* (n=7). Note the co-detection of GC3Ai and Dcp1 activation in each of these tissues (arrows).

Schott et al. FigS5

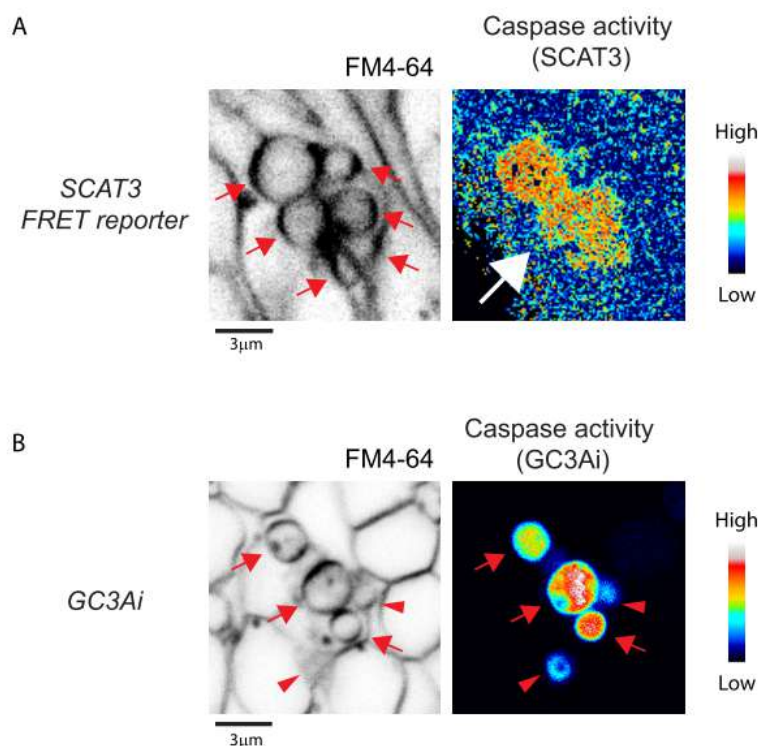


Figure S5: Caspase activity detection by SCAT3 FRET reporter and GC3Ai. A-B. Images of living tissues showing SCAT3 FRET reporter activity (A) or GC3Ai activity (B) using a color-code to report FRET ratio or fluorescence intensity. The highest intensity of caspase activity is in white while the lowest intensity is in black (see intensity scale). Labelling of the plasma membrane (black) is achieved using the lipid-binding vital dye FM4-64 which allows to detect apoptotic bodies. (A) On the left, six apoptotic bodies are detected (red arrows). On the right, the caspase activity detected by the FRET reporter highlights the dying cell (big white arrow), but individual apoptotic bodies are not clearly visible (n=15/24). (B) On the left, 3 apoptotic bodies are detected (red arrows) and on the right

GC3Ai detects all of them (red arrows) (n= 20/21). Two apoptotic bodies are slightly out of focus and indicated with arrowheads.

Schott et al. FigS6

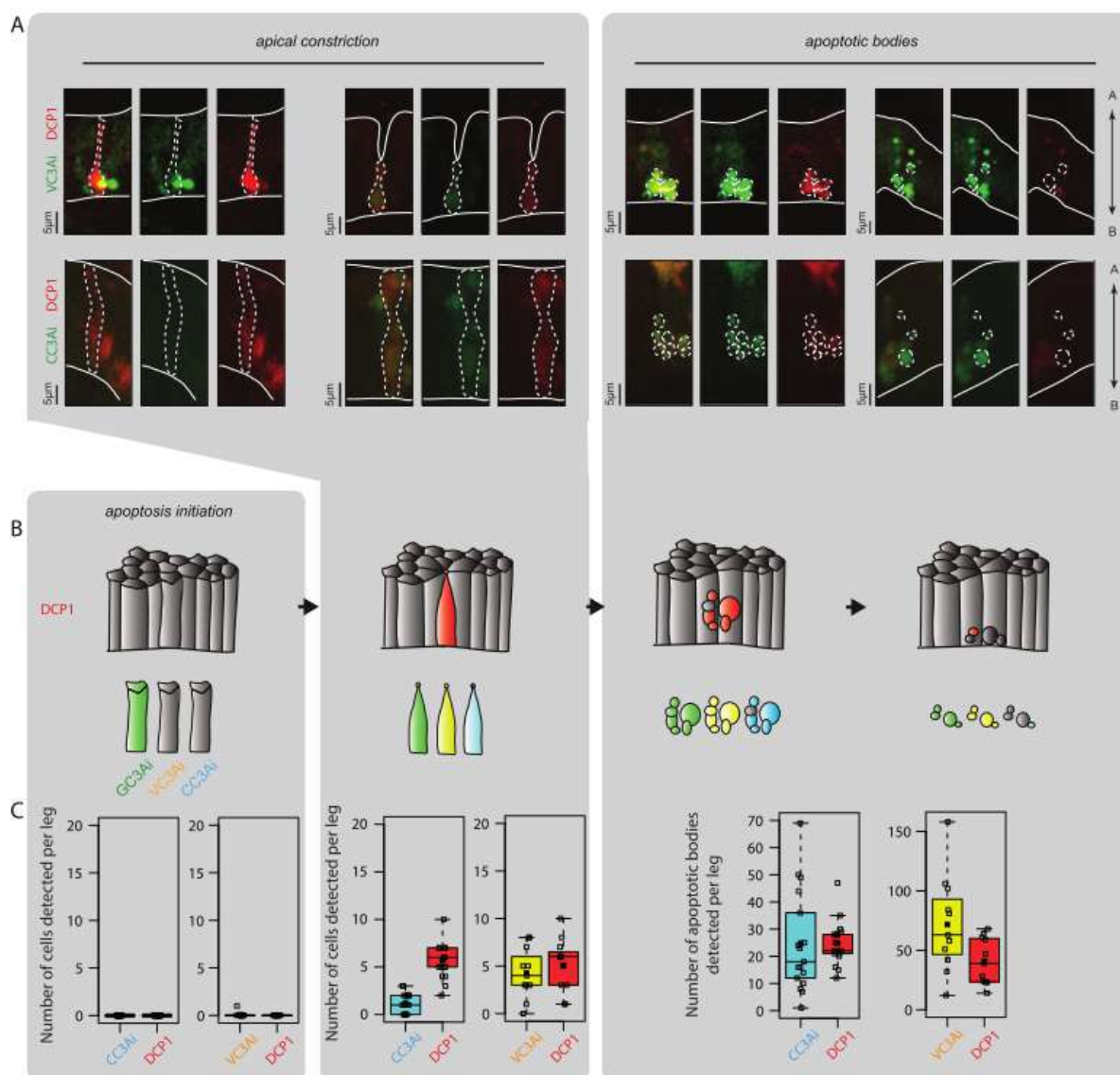


Figure S6. Pattern of fluorescence of Venus (VC3Ai) and Cerulean (CC3Ai) apoptosensors. (A-C) VC3Ai, CC3Ai and Dcp1 activation patterns are compared in pupal leg discs. Successive stages of the apoptotic process are presented from left to right. (A) Confocal images showing the comparison between VC3Ai (green), CC3Ai (green) and Dcp1 (red) activation patterns in fixed pupal leg discs at different apoptotic stages. Apoptotic cells or apoptotic bodies are surrounded by white dotted lines and the apical and basal surfaces of the epithelium are represented by a white line. (B) Schemes of the

different apoptotic stages recapitulating the activation pattern of VC3Ai (yellow) or CC3Ai (cyan) in fixed tissues, compared to Dcp1 (red). The pattern of GC3Ai fluorescence, as determined on fixed tissues in figure 3, is shown in green for comparison. (C) Quantification of the number of VC3Ai (yellow), CC3Ai (cyan) and Dcp1 (red) positive apoptotic cells or apoptotic bodies counted per fixed leg disc according to the different apoptotic stages (n=11 legs for VC3Ai, n=17 legs for CC3Ai). Data are presented as box plots showing every leg disc (open squares) as well as the mean (filled square).



Movie 1. Time lapse of a subset of a pupal leg disc expressing alphaCat-TagRFP in the ap domain (which encompasses the t4-t5 fold) and the GC3Ai construct to reveal caspase activity and thus visualise apoptotic cell. The apoptotic cell shape can be followed on the apical (top) and sagittal (bottom) sections. Note the reduction of the apical surface of the apoptotic cell on the apical views, the transient deformation of the apical surface on the sagittal views and the formation of apoptotic bodies.

II. Un nouveau mécanisme de génération de force apico-basale par les cellules apoptotiques lors de la morphogenèse.

Les articles de Sherrard, Robin et al. et de Monier, Gettings et al. ont mis en évidence l'existence de forces générées dans l'axe apico-basal des cellules (Sherrard et al. 2010, Monier et al. 2015). Cependant, ce type de force mécanique reste encore très peu étudié, contrairement aux forces générées dans le plan des jonctions adhérentes. La génération des forces planaires nécessite une connexion physique entre l'acto-myosine et les jonctions adhérentes. Ainsi, elles offrent la résistance nécessaire à l'acto-myosine pour générer une force planaire efficace et entraîner la formation d'une invagination (Martin et al. 2009, Martin and Goldstein 2014). En revanche, nous ne savons pas, dans les cellules apoptotiques, comment la structure apico-basale de myosine, que j'appellerai « câble de myosine », génère une force efficace lors de la morphogenèse de la patte de drosophile. J'ai donc, au cours de ma thèse, cherché à identifier les différents acteurs nécessaires à la génération d'une force apico-basale.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration d'Arnaud Ambrosini. Initialement, mon projet se focalisait sur l'étude du rôle du noyau dans la génération de la force apico-basale, alors qu'Arnaud s'intéressait au rôle des adhésions. Après réflexion, nous avons décidé d'unir nos projets. De manière succincte, j'ai ainsi caractérisé la régulation de la dynamique nucléaire (notamment à travers l'étude du LINC et du cytosquelette) et son importance dans la génération de la force. Arnaud pour sa part poursuit l'étude des adhérences, notamment à travers la perturbation des adhérences basales. Nous avons étudié ensemble la relation entre le noyau et le câble de myosine et l'impact sur la morphogenèse. Enfin, j'ai contribué à l'analyse de la transmission apico-basale des forces par ablation laser. Ce travail collectif a finalement abouti à une publication dont nous sommes co-premier auteurs.

MECHANICAL FUNCTION

OF THE NUCLEUS IN

FORCE GENERATION

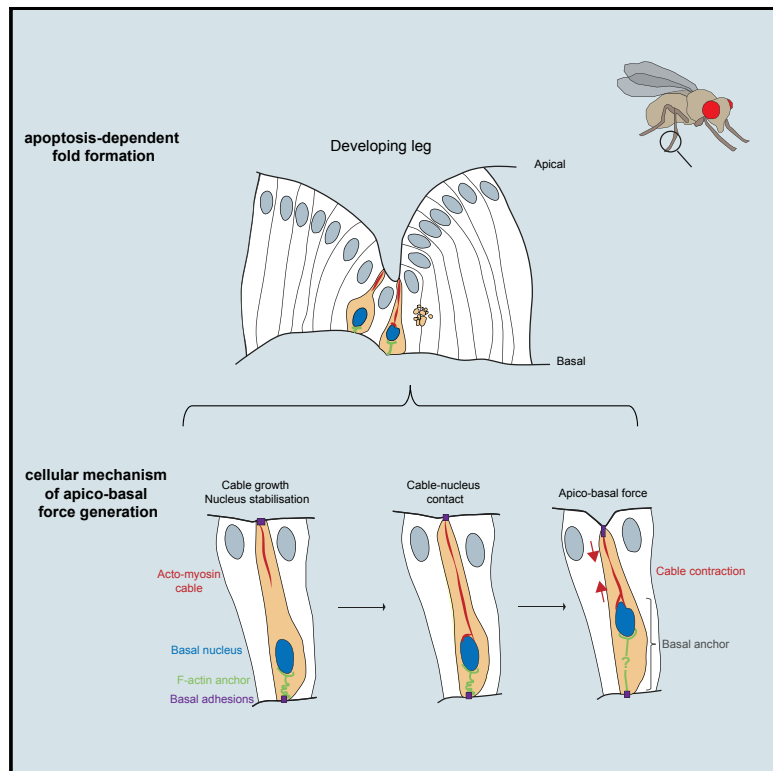
DURING EPITHELIAL

MORPHOGENESIS

Developmental Cell

Mechanical Function of the Nucleus in Force Generation during Epithelial Morphogenesis

Graphical Abstract



Authors

Arnaud Ambrosini, Mégane Rayer,
Bruno Monier, Magali Suzanne

Correspondence

bruno.monier@univ-tlse3.fr (B.M.),
magali.suzanne@univ-tlse3.fr (M.S.)

In Brief

Although essential for morphogenesis, apico-basal forces remain poorly understood. Ambrosini, Rayer, et al. reveal that, in dying cells, apico-basal forces rely on a dynamic actomyosin structure connecting the apical surface to the nucleus, itself anchored to basal adhesions. This work reveals the active contribution of the nucleus to force production.

Highlights

- A contractile actomyosin structure connects the apical surface to the nucleus
- Nucleus anchoring to basal adhesion offers resistance to force generation
- The nucleus acts as a key component of the force-generation machinery
- Dying cell dynamics reveals a mechanism of apico-basal force generation



Mechanical Function of the Nucleus in Force Generation during Epithelial Morphogenesis

Arnaud Ambrosini,^{1,2} Mégane Rayer,^{1,2} Bruno Monier,^{1,*} and Magali Suzanne^{1,3,*}¹LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France²These authors contributed equally³Lead Contact*Correspondence: bruno.monier@univ-tlse3.fr (B.M.), magali.suzanne@univ-tlse3.fr (M.S.)<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.027>

SUMMARY

Mechanical forces are critical regulators of cell shape changes and developmental morphogenetic processes. Forces generated along the epithelium apico-basal cell axis have recently emerged as essential for tissue remodeling in three dimensions. Yet the cellular machinery underlying those orthogonal forces remains poorly described. We found that during *Drosophila* leg folding cells eventually committed to die produce apico-basal forces through the formation of a dynamic actomyosin contractile tether connecting the apical surface to a basally relocalized nucleus. We show that the nucleus is anchored to basal adhesions by a basal F-actin network and constitutes an essential component of the force-producing machinery. Finally, we demonstrate force transmission to the apical surface and the basal nucleus by laser ablation. Thus, this work reveals that the nucleus, in addition to its role in genome protection, actively participates in mechanical force production and connects the contractile actomyosin cytoskeleton to basal adhesions.

INTRODUCTION

Animal development relies on the dynamic remodeling of tissues to create germ layers. Subsequently, specialized organs are formed and sculpted into stereotyped shapes, a prerequisite for their function. Invagination or bending of epithelial sheets is essential to convert an initially flat polarized epithelia into complex three-dimensional structures during organogenesis (Davidson, 2012; Pearl et al., 2017). For example, during gastrulation, it allows to segregate tissues with distinct fate (Keller et al., 2003). Another example is neural tube formation in vertebrates, which relies on local bending and closure of the neural plate, and failure to correctly invaginate may lead to developmental defects such as spina bifida or anencephaly associated with defective neural tube formation (Colas and Schoenwolf, 2001).

Acquisition of a new shape at the tissue scale is triggered by the coordinated change in shape of individual cells. Apical constriction of epithelial cells is usually associated with tissue invagination and is thought to trigger tissue remodeling (Martin

and Goldstein, 2014). Cell shape changes essentially rely on the intrinsic property of cells to generate forces. At the subcellular scale, mechanical forces are usually produced by association of the molecular motor non-muscle Myosin II with filamentous actin (Lecuit et al., 2011). Mechanical forces, generated in the plane of adherens junction, represent an important driving force in epithelial remodeling (Chanet and Martin, 2014; Heisenberg and Bellaïche, 2013; Umetsu and Kuranaga, 2017). Much of our understanding comes from the fine characterization of the early steps of *Drosophila* mesoderm invagination. In this case, a pulsatile actomyosin network accumulates medio-apically in invaginating cells (Martin et al., 2009; Mason et al., 2013). The actomyosin meshwork organizes radially, with F-actin sarcomere-like cables emanating from the cell center (Coravos and Martin, 2016). A molecular clutch allows coupling with E-cadherin-catenin complexes (Roh-Johnson et al., 2012). Transient contraction of the actomyosin network then causes a decrease in apical surface area that is stabilized by a ratchet mechanism while forces are transmitted to neighbors through adherens junctions (Martin et al., 2009, 2010). Additional mechanisms, such as junctional rather than medio-apical accumulation of actomyosin, also enable apico-basal force generation (Hildebrand, 2005; Owaribe et al., 1981).

Although apical constriction plays a key role in tissue folding, recent evidence points at a more complex situation. Indeed, formation of salivary glands in *Drosophila*, which originate from the local invagination of an epithelial placode, has recently been shown to proceed when apical constriction is inhibited (Chung et al., 2017). Such an observation highlights the fact that additional or redundant mechanisms cooperate with apical constriction to promote efficient and stereotyped tissue invagination, at least in some contexts.

Interestingly, orthogonal apico-basal forces represent critical input with regard to tissue remodeling from two to three dimensions. (Kondo and Hayashi, 2015; Monier et al., 2015; Pearl et al., 2017; Sherrard et al., 2010; Yang et al., 2017). Indeed, during ascidian gastrulation, endoderm invagination is a two-step process beginning with Rok-dependent apical actomyosin contraction leading to apical constriction. This step is followed by basolateral myosin accumulation and cell shortening. Importantly, specific blocking of apical constriction and not cell shortening does not prevent tissue invagination, although folding is less pronounced (Sherrard et al., 2010). In the distal part of the *Drosophila* leg epithelium, the appearance of folds relies on localized apoptosis (i.e., programmed cell death) (Manjón et al., 2007). A combination of *in vivo* genetic manipulations



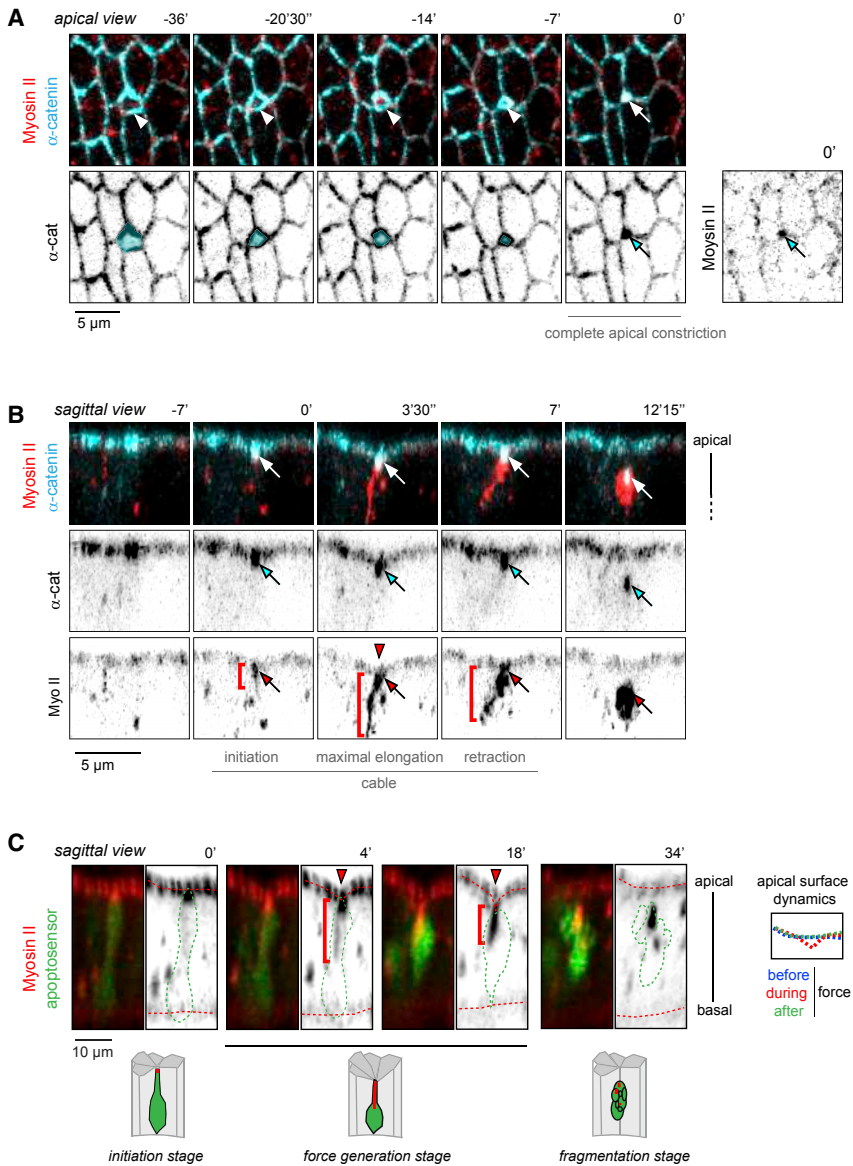


Figure 1. Coordinated Dynamics of Adherens Junction and Myosin II in Apoptotic Cells

(A and B) Stills from a movie showing apical (A) and sagittal views (B) of the same cell stained with the adherens junction marker α -catenin (cyan) and myosin (red) ($n = 11$).

(A) White arrowheads on the merge images show apoptotic cell apical constriction until the apex is completely closed. Apoptotic cell is colored in cyan on the black and white images. Myosin starts to accumulate at adherens junctions when they are closed (white and cyan arrows).

(B) White, cyan, and red arrows show the colocalization between Myosin II and α -catenin during the apoptotic process. The red arrowhead points at the transient deformation of the apical surface of the epithelium triggered by the apico-basal force. The red brackets follow the myosin cable.

(C) Stills from a movie showing the myosin cable (red) inside the apoptotic cell (green) ($n = 15$) and the corresponding schemes. The red brackets follow the myosin cable whose maximal extension reaches the middle of the cell (4'). The apoptotic cell is outlined in green and the apical and basal surfaces are highlighted by red dotted lines on the black and white images. The red arrowhead points at the transient deformation of the apical surface. The panel on the right illustrates apical surface dynamics (color-coded) during apoptosis.

the contractile actomyosin cable-like structure links adherens junction to the stabilized basal nucleus. This transient contractile connection between adherens junctions and basal adhesions via the nucleus generates a force at the cellular scale that modifies the shape of the epithelium.

RESULTS

Apoptotic Apical Myosin II Cable Dynamics

We previously reported that during apoptotic force generation, Myosin II creates an apico-basal accumulation emanating from the apical region of the cell (Monier et al., 2015), hereafter named “apico-basal myosin cable”. Force generation at the cell scale necessitates that the intracellular molecular force-producing machinery is linked to stable anchoring points to transmit forces to neighboring cells. To identify the localization of the various anchoring points of the apico-basal myosin cable, we first characterized more precisely Myosin II dynamics following myosin live by performing time-lapse imaging with co-labeling of the component of adherens junctions, α -catenin. Constriction of the apical surface is the first step of dying cell remodeling (Kuipers et al., 2014; Lubkov and Bar-Sagi, 2014; Rosenblatt et al., 2001; Schott et al., 2017). Myosin recruitment starts at the end of apical constriction where α -catenin accumulates (Figures 1A and 1B; Video S1). Then, the Myosin II cable forms, extends basally to a maximum, then retracts, and eventually detaches from the apical surface concomitantly with apoptotic adherens junctions internalization

and *in silico* modeling showed that an apico-basal pulling force is required in dying cells to trigger folding of surrounding living cells (Monier et al., 2015). This force relies on an elongated actomyosin structure that forms along the apico-basal cell axis of dying cells. How this actomyosin structure is tethered to specific cellular components in order to create a force at the cell scale remain unknown (Kiehart, 2015; Monier et al., 2015). Such reports demonstrate the importance of apico-basal forces complementing apical constriction to produce highly stereotyped tissue invagination. However, no clear mechanism was reported regarding how cells reorganize to produce efficient forces along their apico-basal axis.

In order to identify the underlying mechanism of orthogonal cellular force production, we focused on the folding process of the *Drosophila* developing leg. We show that apoptotic cells relocate their nucleus at the vicinity of basal adhesions and trap it in an F-actin meshwork that restrains nucleus movement. Further,

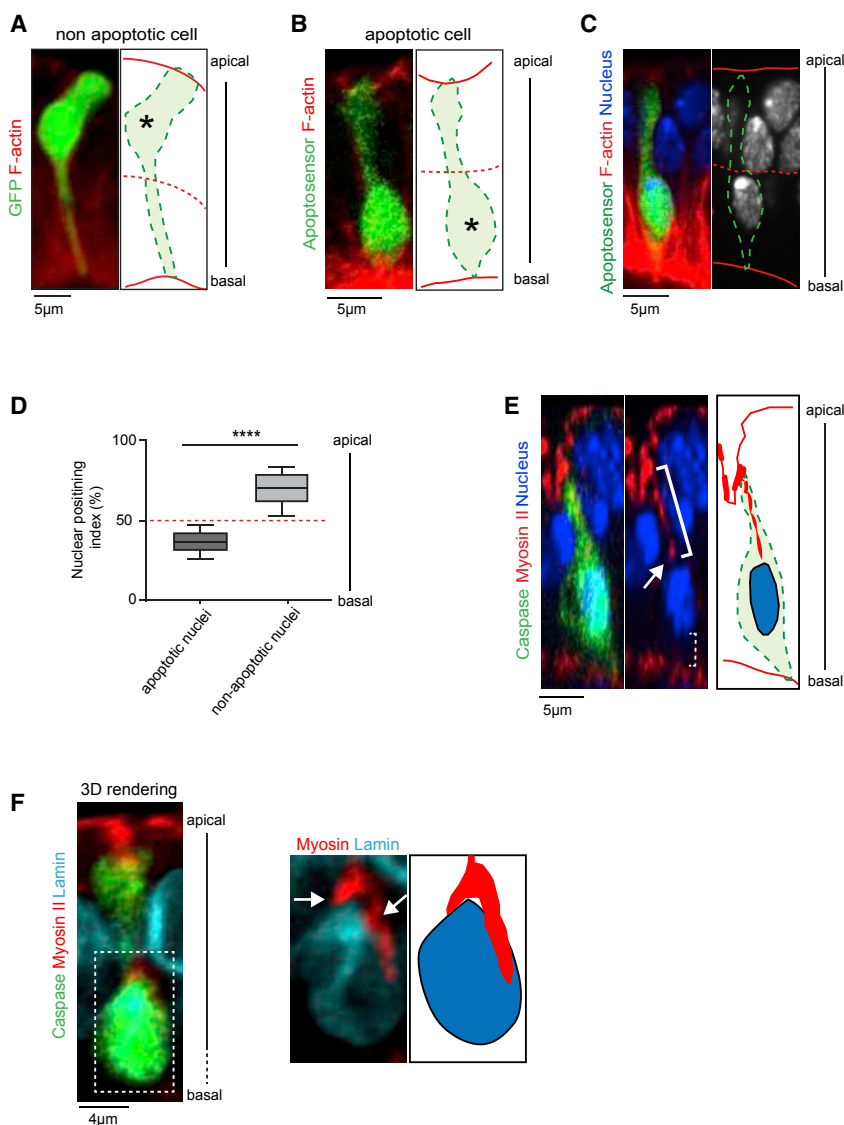


Figure 2. Proximity between the Myosin Cable and the Basal Apoptotic Nucleus

(A and B) Sagittal views and schematic representations showing the localization of cell bodies (asterisk) in individual nonapoptotic (A) and apoptotic (B) cells ($n = 24$ and 23). Cells are outlined in dotted green lines in the schematic representations.

(C) Sagittal view showing nuclei positioning (blue or white) in apoptotic (green or dashed green line) and nonapoptotic cells. Only the apoptotic nucleus is located in the basal half of the epithelium. In (A–C), apical and basal surfaces are schematized by a red line and the midplane of the epithelium by a red dashed line.

(D) Box plot representation of the quantification of nuclei localization along the apico-basal axis in apoptotic ($n = 25$) and nonapoptotic ($n = 115$) cells. Wilcoxon statistical test: p value < 0.0001 (****). The midplane of the epithelium is indicated by a dashed red line.

(E) Sagittal view and schematic representation showing the myosin cable (highlighted by the white bracket) which extends toward the basal apoptotic nucleus (arrow) ($n = 13$). No myosin accumulation can be detected between the apoptotic nucleus and the basal-most region of the cell (dashed bracket).

(F) (Left) 3D reconstructions of a general view of an apoptotic cell (green) and a close-up of the nucleus (Lamin-TagRFPT in cyan) ($n = 9$). (Right) Schematic representation. The myosin cable (red) contacts the apical side of the nucleus (white arrows).

(E and F) Apoptotic cells are stained in green with an anti-cleaved Dcp1 antibody.

See also [Figure S1](#).

([Figure 1B](#); [Video S1](#)). Importantly, Myosin II appears tightly connected to adherens junctions throughout the whole apoptotic process, from myosin cable initiation to maximal cable extension to cable retraction. Hence, like during other invagination processes ([Martin et al., 2010](#); [Roh-Johnson et al., 2012](#)), analysis of Myosin II dynamics suggests that the apico-basal myosin cable is anchored to adherens junctions during the whole process of apico-basal force generation.

The Apical Myosin II Cable Targets the Basally Relocated Nucleus

The linear organization of the Myosin II apoptotic structure suggests the presence of a second anchoring point at the basal end of the myosin cable, i.e., opposite the adherens junctions. To identify this potential anchoring point, we next performed live imaging by coexpressing Myosin II and a fluorescent reporter of caspase activity that highlights the cytoplasm of apoptotic cells ([Schott et al., 2017](#)). We found that at maximal extension the apico-basal myosin cable ends in the middle of the cell ([Figure 1C](#)).

apoptotic cells or, alternatively, be a specialized structure created when cells turn on the apoptotic program in order to provide basal resistance to the apico-basal myosin cable. To discriminate between those hypotheses, we labeled individual nonapoptotic epithelial cells and compared their morphology with apoptotic ones. Interestingly, we found that, in the leg pseudostratified epithelium, apoptotic cells adopt a shape drastically different from their nonapoptotic neighbors. Indeed, nonapoptotic cells present a large cell body located in the apical half of the epithelium and connected to the basal surface by a long, thin extension ([Figure 2A](#)). On the contrary, apoptotic cells that have not entered the fragmentation stage possess a narrow apical section and a large cell body localized basally ([Figure 2B](#)). As the nucleus is the cell's biggest organelle, we wondered whether its positioning could account for the specific shape of dying cells. Indeed, we found that while nuclei of nonapoptotic cells are located on the apical half of epithelial cells, nuclei of apoptotic cells are systematically located on the basal half ([Figures 2C](#) and [2D](#)). At that stage of apoptosis, the nucleus is still

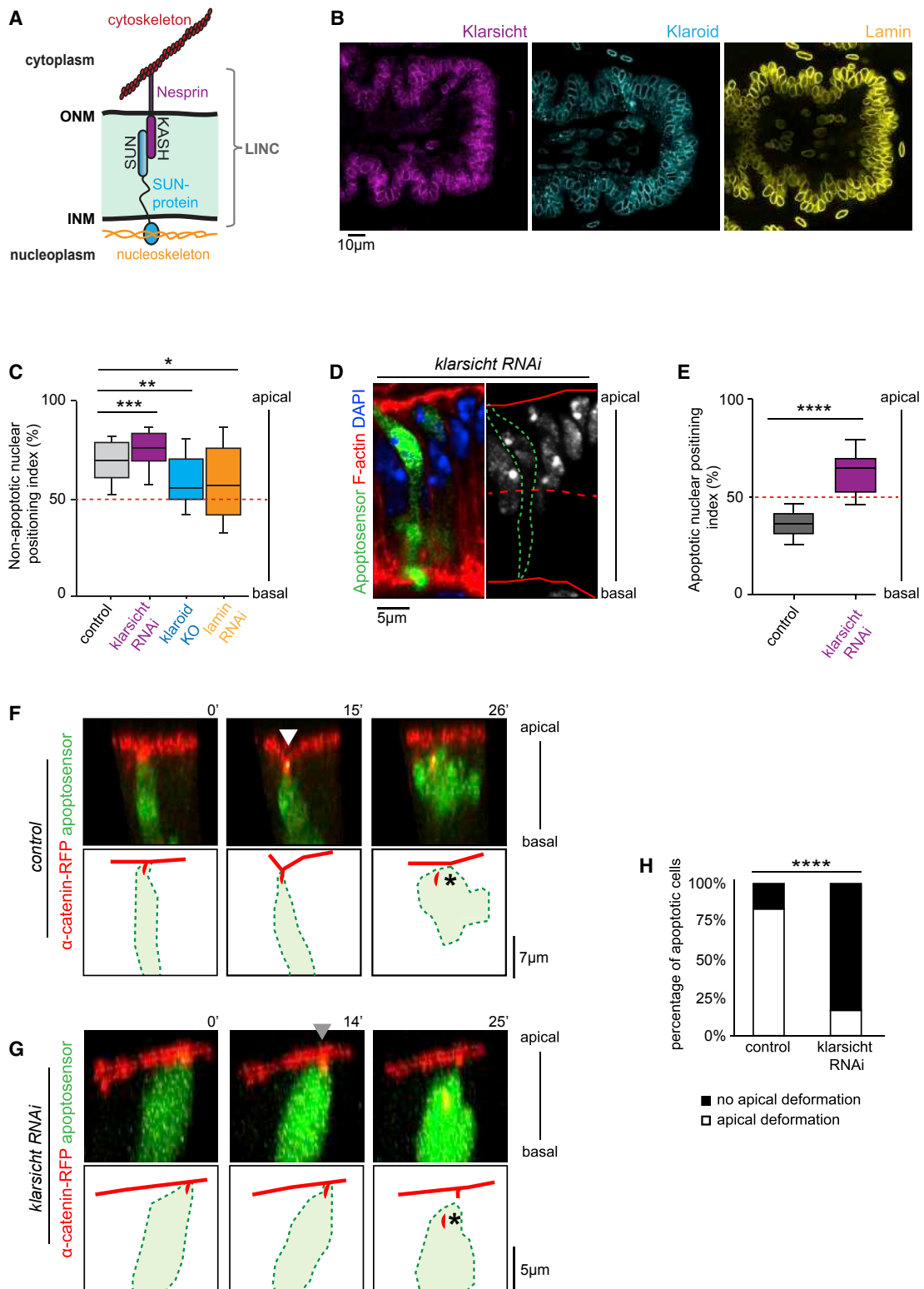


Figure 3. Basal Positioning of the Nucleus Is Essential for Apico-basal Force Generation

(A) Scheme describing the LINC complex made of SUN- and KASH-domain proteins. The color-code for Nesprin, SUN-protein, and nucleoskeleton is used in (B) and (C). ONM, outer nuclear membrane; INM, inner nuclear membrane.

(B) Perinuclear localization of LINC members (Klarsicht and Klaroid) and Lamin in the leg tissue.

(legend continued on next page)

morphologically similar to nonapoptotic nuclei, although we observe a reduction of Lamin levels (using a Lamin-TagRFPT endogenous fusion protein), which may render the apoptotic nucleus softer or modulate its interaction with the cytoskeleton (Figures S1A and S1B).

To test if the apoptotic nucleus could be part of the apico-basal force machinery, we investigated whether the apical Myosin II cable targets the nucleus. We observed that the basal end of the actomyosin cable is in close vicinity of the apoptotic nucleus (Figure 2E). Moreover, 3D reconstruction images of the nucleus periphery labeled with Lamin-TagRFPT showed that the basal end of the cable runs along the apical side of the nucleus (Figure 2F). These observations suggest a physical association between the apico-basal Myosin II cable and the nucleus.

Basal Nucleus Relocation Is Essential for Apico-basal Force Generation

To test whether the nucleus is required for apico-basal force generation, we looked for a way to inhibit the basal relocation of the apoptotic nucleus. One candidate was the linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex, a macromolecular complex involved in nucleus localization in a number of cellular contexts ranging from fibroblast migration to interkinetic nuclear movement in the vertebrate central nervous system (Gundersen and Worman, 2013; Lee and Burke, 2018). The LINC is composed of Nesprins spanning the external nuclear envelope interacting with SUN-domain proteins spanning the internal nuclear envelope. Nesprins also interact with the cytoskeleton while SUN proteins bind to Lamin within the nucleus (Figure 3A). In the *Drosophila* leg, we observed perinuclear localization for the sole somatic SUN-protein, Klaroid, similarly to Lamin (Figure 3B). Among the two fly Nesprins, Klarsicht has also a specific perinuclear localization (Figures 3B and S2).

We next tested whether inactivation of those LINC components affects nucleus positioning in this tissue, in parallel to Lamin inactivation. We found that inactivation of *klaroid* and *lamin* leads to nonapoptotic nuclei mispositioning, with most nuclei found in the middle plane of the leg epithelium instead of being located in the apical half (Figure 3C). This indicates a general function of *klaroid* and *lamin* in nuclei positioning in the developing leg. On the contrary, *klarsicht* inactivation had a very limited impact on the position of nonapoptotic nuclei, which remained apical (Figures 3C and 3D). However, we observed that *klarsicht* inactivation blocks apoptotic nuclei relocation as shown by the presence of all apoptotic nuclei in the apical half of the epithelium (Figures 3D and 3E, compare with Figure 2C).

We choose to focus our analysis on the *klarsicht* loss-of-function background. Apoptotic cells exert a force that transiently deforms the apical surface of the epithelium (Monier et al., 2015) (Figure 3F; Video S2). Therefore, to directly address whether the nucleus contributes to apico-basal force generation, we followed the shape of the apical surface by time-lapse imaging in a context of *klarsicht* inactivation. Importantly, we found that, in this context where the nucleus remains apical, most apoptotic cells are unable to transiently deform the apical surface of the epithelium (Figures 3G and 3H; Video S3). This reveals that apico-basal forces are considerably reduced or absent in this context, strongly suggesting that nucleus positioning is critical for apoptotic force generation.

Basal Anchoring of the Apoptotic Nucleus by an Actin Network Linked to Basal Adhesion

To act as the basal Myosin II cable anchoring point, the apoptotic nucleus would have to resist the intracellular force developed by the actomyosin cytoskeleton. For this, it might either be stabilized basally or, being the cell's largest organelle, it might be able to offer resistance by itself. To discriminate between these hypotheses, we used high temporal resolution imaging to compare the movement of nonapoptotic nuclei and basal apoptotic nuclei during the period preceding cable formation (i.e., before the force-generation stage). Interestingly, nuclear tracking showed that apoptotic nuclei are less mobile than nuclei of living neighboring cells (Figure 4D, compare DMSO conditions). Because at that stage of apoptosis the nucleus is morphologically similar to the nucleus of nonapoptotic cells (Figure S1A), the difference in nuclei velocity suggests the presence of a stabilizing mechanism specific for apoptotic nuclei.

We next sought to characterize how the nucleus is stabilized in apoptotic cells. Although the LINC complex participates in nucleus anchoring in several contexts (Tapley and Starr, 2013), its involvement in apoptotic nucleus relocation precludes analysis of its possible role in basal nucleus stabilization. We thus focused on cytoskeleton components. In the leg epithelium, microtubules form an apical cap and are enriched along lateral membranes in the apical half of the cell, with limited or no localization on the basal side. By contrast, F-actin strongly accumulates in apical and basal domains, with weaker staining along lateral membranes (Figures 4A–4C). The relative distribution of those two cytoskeletal networks prompted us to focus on the F-actin cytoskeleton, as it is more likely to be in contact with basally relocated nuclei. By performing high-resolution microscopy on early apoptotic cells (prior to the myosin cable or

(C) Box plot of the apico-basal distribution of nonapoptotic nuclei in the epithelium of control ($n = 115$), *klarsicht* RNAi ($n = 67$), *lamin* RNAi ($n = 24$), and *klaroid* mutant ($n = 21$). The red dotted line indicates the midplane of the epithelium in the graph. Mann & Whitney test: p value < 0.0001 for ***, < 0.0024 for **, and < 0.0144 for *.

(D) Sagittal views showing that the apoptotic nucleus is located apically in a *klarsicht* RNAi context. Nuclei are in blue or white and the apoptotic cell is indicated in green or with a green dotted line. Apical and basal surfaces of the epithelium are outlined in red and the midplane of the epithelium with a red dotted line.

(E) Box plot of apoptotic nucleus distribution in the apico-basal cell axis in control ($n = 25$) and *klarsicht* RNAi ($n = 33$) contexts. The red dotted line indicates the midplane of the epithelium in the graph. Mann & Whitney test: p value < 0.0001 (****).

(F and G) Stills from time-lapse movies and corresponding schemes showing apoptotic cell dynamics in control (F) and *klarsicht* RNAi (G) contexts. Arrowheads mark the presence (F, in white) or the absence (G, in gray) of deformation of the apical surface. Black stars indicate the adherens junction apical accumulation detachment. $t = 0'$ is set at the end of the apoptotic apical constriction.

(H) Histogram showing the proportion of apoptotic cells deforming or not the apical surface of the epithelium in control ($n = 23$) and *klarsicht* RNAi ($n = 12$) contexts. Fisher statistical test: p value < 0.0003 for ****.

See also Figure S2.

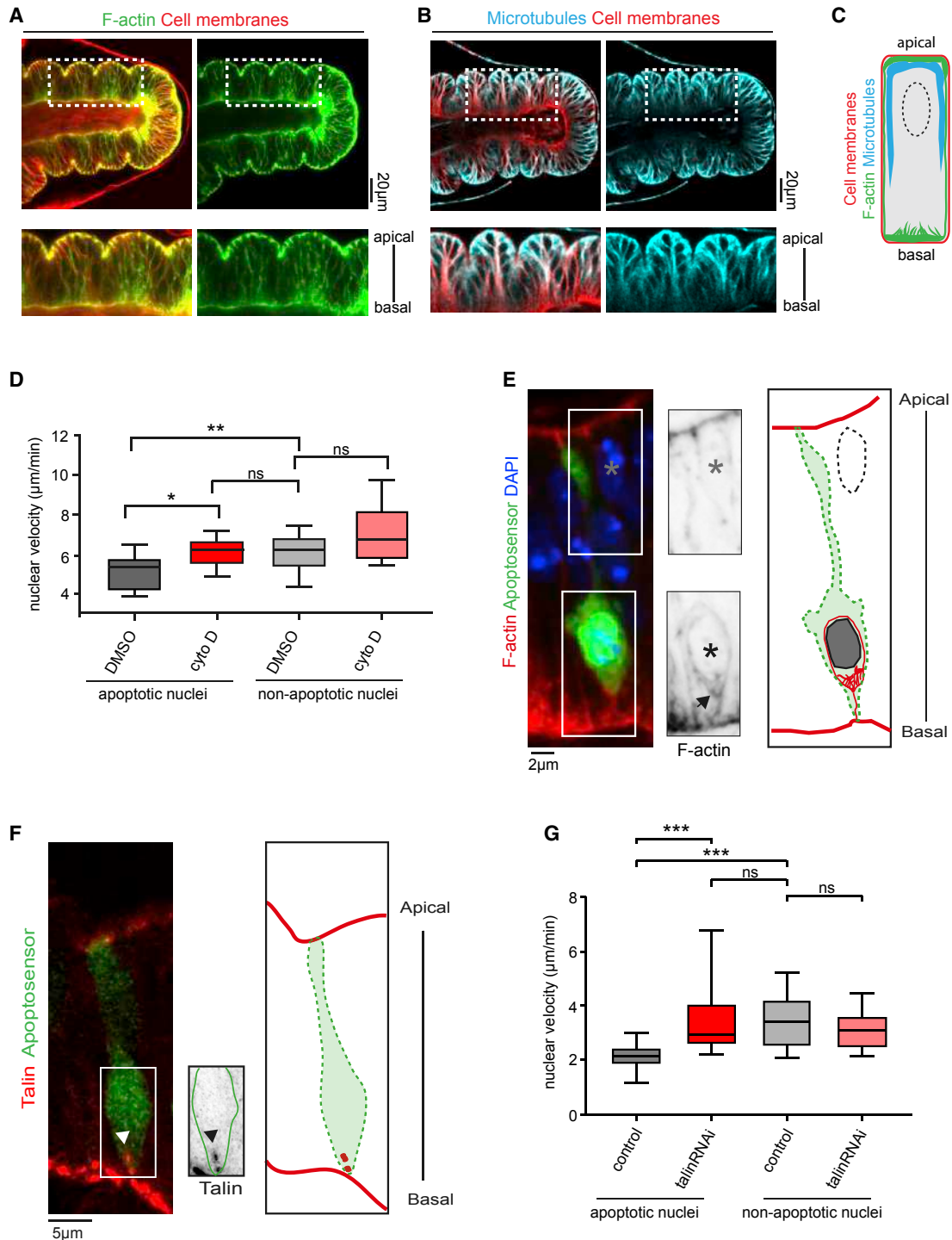


Figure 4. A Basal Adhesion-F-Actin Network Stabilizes the Basal Apoptotic Nucleus

(A and B) Confocal images showing distribution of F-actin (Utrophin-GFP reporter, green, A) and microtubules (MAP205::GFP protein trap, cyan, B) in live leg discs. The cell membranes are stained in red using the lipid dye FM4-64 to visualize the leg epithelium.

(C) Schematization of F-actin and microtubules distribution in the leg disc observed in (A) and (B). F-actin is enriched in the cell's apical and basal domains and, to a lesser extent, in the lateral domain. Microtubules accumulate mainly in apical and lateral domains. They are essentially absent from the cell's basal pole.

(D) Box plot representation of apoptotic and nonapoptotic nuclei displacement per minute in control (DMSO; $n = 9$ and 9) and after treatment by Cytochalasin D ($n = 21$ and 21). Wilcoxon statistical test: p value < 0.0039 for ** and Mann Whitney statistical test: p value < 0.0246 for * and nonsignificant for n.s.

(E) Sagittal view and scheme showing the presence of a basal F-actin structure (black arrow) contacting the apoptotic nucleus (black star), but not a nonapoptotic nucleus (gray star). F-actin is in red (left) or black (right), nuclei in blue, and the apoptotic cell in green ($n = 24$).

(legend continued on next page)

force-generation stage), we identified strong F-actin accumulation running between the basal apoptotic nucleus and the most basal part of the cell, while no specific F-actin accumulation is detected in close vicinity to nonapoptotic nuclei (Figure 4E). This observation suggests that relocation of the nucleus in the early apoptotic phase could bring it in close vicinity with an F-actin basal network, likely poorly contractile since no Myosin II is detected basally (Figure 2E).

To determine whether the actin cytoskeleton anchors the nucleus basally, we performed tracking of apoptotic nuclei following actin destabilization. We set up conditions in which short incubation of leg discs with Cytochalasin D-containing culture medium causes a substantial decrease in polymerized actin yet does not lead to altered tissue morphology (not shown). In this condition, dynamics of nonapoptotic nuclei is not significantly affected (Figure 4D, compare nonapoptotic nuclei in DMSO and Cytochalasin D conditions). On the contrary, apoptotic nuclei mobility was increased after actin destabilization, reaching the velocity of nonapoptotic nuclei (Figure 4D, compare apoptotic nuclei in Cytochalasin D condition, with nuclei in DMSO). These results indicate that an F-actin network specifically stabilizes the apoptotic nucleus.

Actin-dependent stabilization of the nucleus most probably necessitates a basal anchor at the membrane to provide resistance. Although dying cells are commonly viewed as detaching from the matrix, we found that basal adhesions are maintained during early apoptotic stages (Figure 4F), as are apical adhesions (Lubkov and Bar-Sagi, 2014; Monier et al., 2015). This suggests that basal adhesions might act as the ultimate basal anchoring point of the system. To directly assess this idea, we used RNAi to inactivate Talin, a key component of focal adhesion that mechanically links integrin receptors to the actin cytoskeleton (Kla-pholz and Brown, 2017). In this context, although Talin level is greatly reduced, cellular integrity is unaffected (Figure S3). We therefore compared nuclei stability in control and Talin RNAi conditions. The dynamics of apical nonapoptotic nuclei, which are located far away from basal adhesions, were unaffected in Talin RNAi condition. However, the velocity of apoptotic nuclei was drastically increased compared to control apoptotic nuclei, becoming similar to the velocity of nonapoptotic nuclei (Figure 4G). Therefore, apoptotic nuclei behave similarly either when F-actin is destabilized or when Talin function is reduced. Altogether, those results point toward a model in which a basal F-actin cytoskeleton network linked to basal adhesion stabilizes the apoptotic nucleus prior to the force-generation stage.

Anchoring the Nucleus Basally Provides Resistance Required for the Apico-basal Force

We next focused on the force-generation stage and asked if the stabilizing mechanism of apoptotic nuclei identified above could be involved in force generation. We therefore followed the dy-

namics of both Myosin II and the nucleus during the apoptotic process, both in a control and in a context in which basal anchoring is deficient.

In the control, we observed that the apoptotic nucleus is located basally before cable formation. Then, the cable extends from the apical surface of the epithelium to the upper part of the nucleus. Finally, the nucleus progressively moves apically, remaining in close vicinity to the Myosin II cable as it shortens (Figures 5A and S4; Video S4). Interestingly, the nucleus movement is composed of two upward phases separated by a transient break shown by slower and random motion, suggesting a physical resistance halfway up (Figure 5C).

Since F-actin depolymerization would alter not only nucleus stabilization but also apical contractile cable formation (Monier et al., 2015), we tested the role of nucleus basal stabilization by inactivating Talin. We show that although Talin plays a critical role in limiting basal apoptotic nuclear movement, it has no impact on apoptotic nucleus basal relocation or apico-basal myosin cable formation, thus allowing us to follow nucleus dynamics during the whole apoptotic process (Figure 5B; Video S5). In this context, although the nucleus moves apically as observed in the control, quantitative analysis reveals that nucleus dynamics is altered. Indeed, in absence of basal anchoring, upward movement of the nucleus is rather regular, with no or limited break in upward nuclear motion (Figures 5D and 5E). Hence, apico-basal myosin cable and nucleus dynamics are correlated in both contexts, although upward movement is continuous when basal anchoring is defective in *talin* loss of function. These data suggest that, at the force-generation stage, the Myosin II cable is anchored to the nucleus, which resists to the force thanks to the basal F-actin-basal adhesion network.

To directly test the importance of nucleus basal anchoring in providing resistance to the apico-basal myosin cable contraction, we inactivated *talin* and analyzed the ability of the apoptotic cells to deform the apical surface. Importantly, we found that most apoptotic cells devoid of Talin are no longer able to trigger the apical surface deformation of the surrounding epithelium (Figures 5F and 5G; Video S6 compare with Figure 3F and Video S2). This indicates that the apoptotic force is either abolished or strongly reduced when basal adhesions are weakened. Therefore, basal adhesions are critical to stabilize the nucleus and offer effective resistance to Myosin II contraction during apico-basal force generation.

Transmission Path of the Apico-basal Force

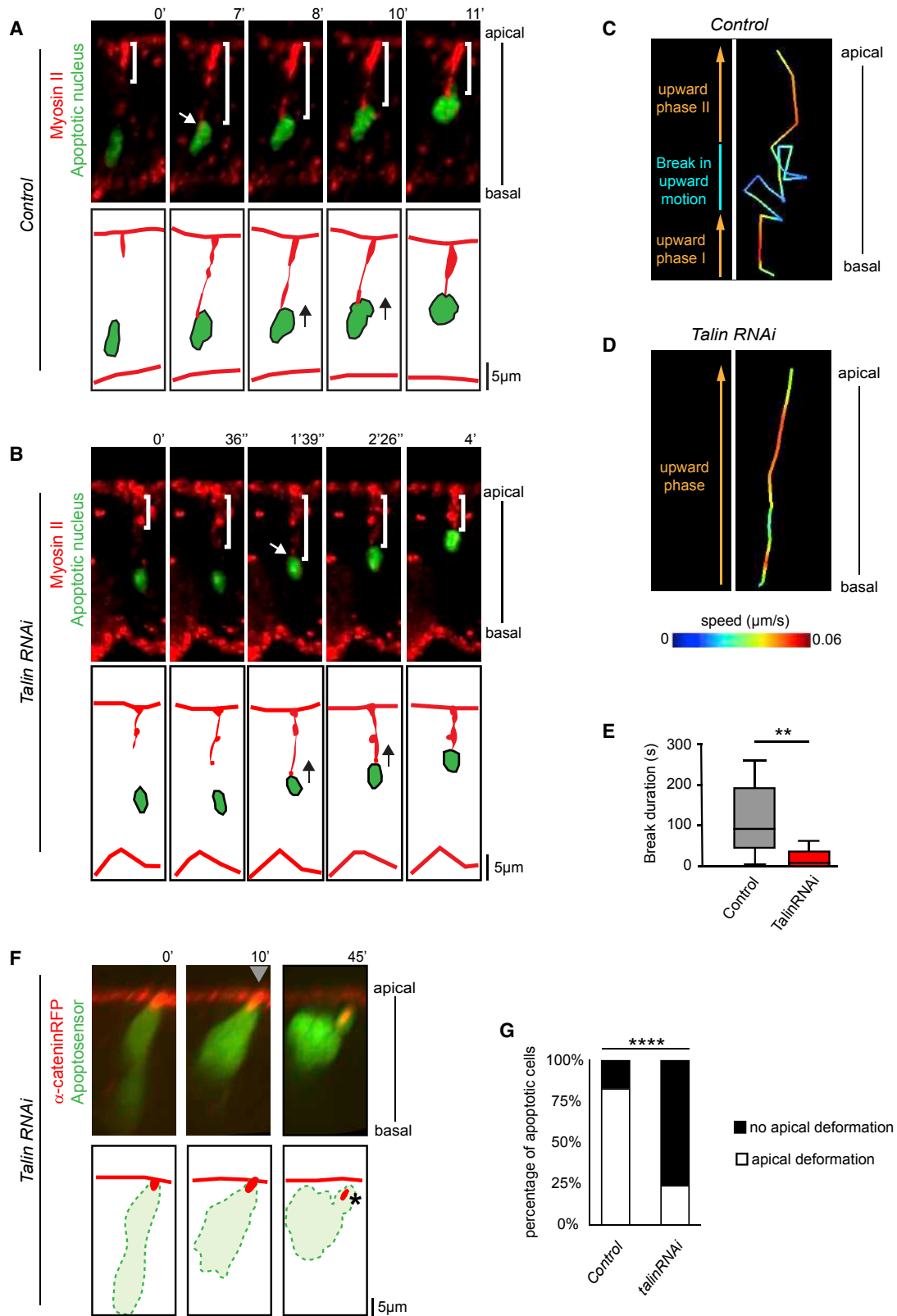
Combined, our results point toward a model in which the myosin cable would contract and generate forces that would be transmitted, on the one hand, toward the apical surface and, on the other hand, toward the basal resisting apoptotic nucleus. To strengthen our understanding of the apico-basal force transmission path, we therefore set up laser ablation experiments. Based

(F) Sagittal view and scheme showing the presence of Talin (in red and black, arrowheads) in an apoptotic cell (green) (n = 4).

(G) Box plot representation of apoptotic and nonapoptotic nuclei displacement per minute in control (n = 12 and 11) and *talin* RNAi (n = 11 and 10). Wilcoxon statistical test: p value < 0.001 for ***, and Mann Whitney statistical test: p value < 0.0007 for ***, and nonsignificant for n.s. (D and G) A non-paired Mann Whitney test was used to compare nuclei displacement between conditions, except for comparison of apoptotic versus nonapoptotic nuclei in DMSO (D) or control (G) for which we used a paired Wilcoxon test.

In (D–G), apoptotic cells are at the initiation stage, before the generation of the apico-basal force.

See also Figure S3.



(legend on next page)

on the recognition of apoptotic cells by the presence of Myosin-GFP cables running from adherens junctions to the middle of the epithelium in the prospective fold domain, we found that cuts in the middle of myosin cables lead to rapid retraction of the opposite ends of the cables (Figures 6A, 6B, and 6E). We further notice a recoil of the apical surface after ablation of the apoptotic cable (Figures 6B and 6F). On the contrary, apico-basal laser cut in nonapoptotic cells leads to weak or even absence of retraction and has no effect on apical surface (Figures 6C–6F). These results show that the myosin cable formed in apoptotic cells is under tension and that the myosin cable-dependent force is transmitted toward the apical region of the dying cell and subsequently to the neighbors.

We further investigated whether apico-basal forces are also transmitted to the basal apoptotic nucleus. For this purpose, we used the recently developed aptosensor, DBS-S (Baena-Lopez et al., 2018). DBS-S is a membrane-bound GFP that relocalizes to the nucleus upon initiator caspase activation. Upon UV induction in the larval wing disc, basal apoptotic nuclei become fluorescent and move apically (Baena-Lopez et al., 2018) in a process reminiscent of nuclear dynamics of endogenously dying cells in prepupal legs (Figure 5A). We therefore characterized nucleus behavior upon cable ablation by combining DBS-S to myosin-TagRFpT. In most cases, the nucleus moves basally following laser ablation (Figures 6G and 6H), supporting the notion of force transmission to the nucleus. The absence of nuclear movement in the remaining cases might be due to ablation performed just before force generation, the stage during which nucleus upward movement is initiated. To further confirm that myosin cable-dependent forces are transmitted to the nucleus, we followed the dynamics of the nuclear envelope overtime. Interestingly, while the apoptotic nuclear envelope is initially round, it deforms and adopts a pointed shape during nuclear upward movement (Figures 6I and 6J). This is consistent with the observation of Myosin II running around the apical surface of the nucleus (Figure 2F). On the contrary, the envelope of nonapoptotic cells remains round over the same timescale (Figure 6J). Altogether, we propose that apico-basal forces are transmitted both apically and basally during the apoptotic process.

Perturbation of Apico-basal Force Generation Affects Fold Formation

We previously reported that apoptosis is necessary for the progressive formation of folds in leg tarsal segments. Moreover, arti-

ficial induction of apoptosis is sufficient to create ectopic folding in the wing disc. This ectopic folding relies on apoptotic forces since inhibition of myosin activity specifically in dying cells prevents the formation of ectopic folds (Monier et al., 2015). We therefore reasoned that tempering with components of the cellular machinery of apoptotic apico-basal force generation should compromise fold formation in the leg. We focused on the fold that separates tarsal segments 4 and 5 (T4/5) because, in this domain, folding starts at the beginning of metamorphosis. This allowed us to check that epithelium shape is normal prior to the onset of fold formation in absence of Talin or Klarsicht (Figure S3; data not shown). In both RNAi contexts, we observed shallow or absent T4/5 folds in most of the legs analyzed, at a stage where deep folds are formed in control legs (Figures 7A and 7B). These results demonstrate that apico-basal forces created by apoptotic cells are critical for correct fold formation in the developing leg.

DISCUSSION

A Cellular Reorganization That Creates Apico-basal Forces: Lessons from Dying Cells

A growing body of evidence support the notion that apical constriction cooperates with additional forces to drive tissue invagination. During mesoderm invagination in flies, very early steps of the process that lead to formation of a cup-shape need apical constriction (Martin et al., 2009) but are unlikely to necessitate an apico-basal force since this stage can be reached in acellular embryos that lack lateral membranes (He et al., 2014). However, at later, less understood stages of mesoderm invagination, an increase in apico-basal tension has been inferred by video-force microscopy (Brodland et al., 2010). This is consistent with *in silico* modeling that shows that apical and apico-basal forces must cooperate to produce an efficient and stereotyped pattern of invagination (Monier et al., 2015). This view is supported by work that shows that endoderm invagination in ascidian embryos is a two-step process in which blocking apical constriction does not prevent invagination driven by apico-basal forces (Sherrard et al., 2010). However, the cellular machinery involved in the generation of such apico-basal forces remains to be identified.

We focused on apoptotic cells for several reasons: (1) apoptotic cells generate apico-basal forces that trigger invagination in the *Drosophila* leg (Monier et al., 2015), (2) individual apoptotic cells can be followed *in vivo* thanks to the recent

Figure 5. Basal Apoptotic Nucleus Stabilization Is Essential for Efficient Apico-basal Force Generation

(A and B) Stills from time-lapse movies and schematic representations showing the dynamics of Myosin II (red) and the apoptotic nucleus (green) after post-acquisition treatment (see Figure S4 and STAR Methods for details) in control (A, n = 12) and *talin* RNAi context (B, n = 10). White brackets highlight the dynamics of apoptotic myosin cable, white arrows indicate cable-nucleus contact, and black arrows on the schemes indicate nuclei movements.

(C and D) Comparison of apoptotic nuclei upward movements in control (C, n = 12) and *talin* RNAi (D, n = 10) contexts. Trajectories are color-coded to reveal nuclei speed.

(E) Box plot representation of the duration of the break in nucleus upward movement in control and *talin* RNAi contexts based on the movement observed in (C) and (D). Mann Whitney test: p value < 0.0039 for **.

(F) Still from a time-lapse movie and corresponding schemes showing apoptotic cell dynamics in *talin* RNAi context. No apical surface deformation, indicative of an absence of apico-basal force, is observed (gray arrowhead). Adherens junction apical accumulation detaches normally (star). $t = 0'$ is set at the end of the apoptotic apical constriction (n = 23).

(G) Histogram showing the proportion of apoptotic cells deforming or not the apical surface of the epithelium in control (n = 23) and in *talin* RNAi (n = 25). Fisher statistical test: p value < 0.0001 for ****.

See also Figure S4.

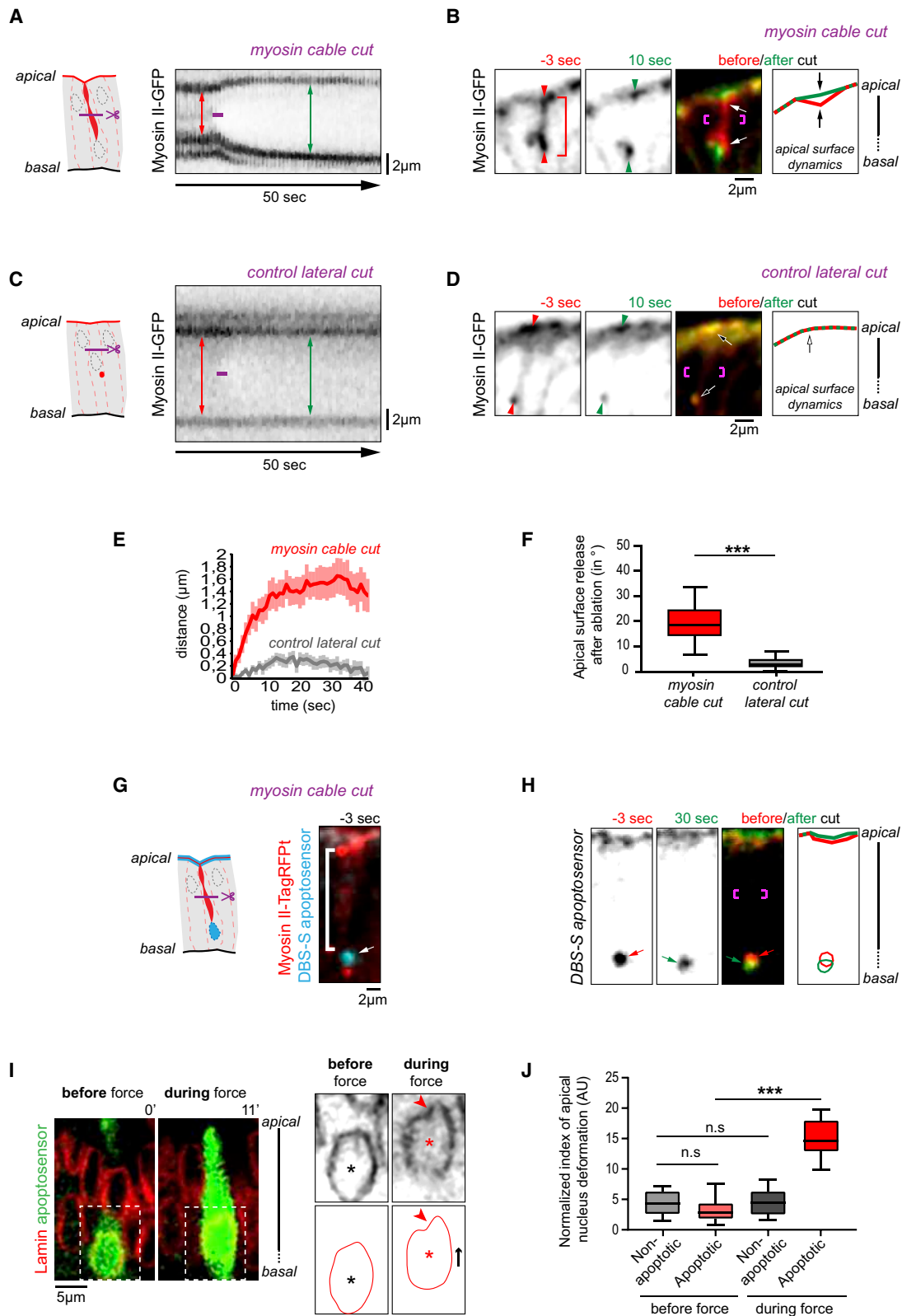


Figure 6. Forces Generated by the Apoptotic Myosin Cable Are Transmitted to the Apical Surface and the Nucleus

(A–D) Laser ablation of apico-basal myosin cable (A and B) and control lateral cut in nonapoptotic cells (C and D). In kymographs, red and green double arrows indicate the distance between two dots before and after cut respectively. Cuts were performed at the level of the apico-basal myosin cable (A) or at control lateral site (C). The timing of laser cut is indicated by the purple line.

(legend continued on next page)

development of apoptosensors (Baena-Lopez et al., 2018; Schott et al., 2017; Zhang et al., 2013), and (3) one can compare the same cell before and during apoptosis to identify differences between no-force and force generating cells.

Apico-basal force generation occurs at early stages of apoptosis. To date, characterization of cellular dynamics during cell elimination has essentially focused on cell extrusion from living tissues or cell monolayers in culture (Andrade and Rosenblatt, 2011; Eisenhoffer et al., 2012; Gu et al., 2011; Kuipers et al., 2014; Levayer et al., 2016; Marinari et al., 2012). Our combination of loss-of-function, time-lapse imaging and laser ablation experiments now shed light on early steps of apoptosis. Early apoptotic events include basal nucleus relocation and subsequent anchoring. The apico-basal force is next generated by cells committed to die through the formation of a continuum between their apical and basal surfaces. This continuum involves an apical contractile network composed of an actomyosin cable-like structure and a basal anchor composed of the nucleus, a non or poorly contractile F-actin cytoskeleton network and basal adhesions (Figure 7C).

Although commonly viewed as “passive”, apoptotic cells are able to communicate with and modify their environment, both in physiological and pathological contexts (Ambrosini et al., 2017; Huang et al., 2011; Pérez-Garijo and Steller, 2015). Such communication, either chemical or physical, can be set up at stages where cells are committed to die, yet not destroyed. Understanding early steps of apoptosis is therefore of prime importance, but is a complex task since, during those steps, cells committed to die are barely distinguishable from their living neighbors. The development of apoptosensors adapted to live imaging allowed us to characterize the cellular machinery responsible for the orthogonal force produced by apoptotic cells *in vivo*, during a morphogenetic process. Our characterization of the apoptotic force machinery will provide a framework to better understand apico-basal forces in other morphogenetic processes, both in *Drosophila* and other model organisms.

Nucleus Relocation, an Unsuspected Early Step of Epithelial Cell Death

Chromatin remodeling, from its condensation to its fragmentation, has been extensively studied during apoptosis. Nucleus

positioning, on the other hand, has been overlooked in dying cells. Although we have not characterized precisely the onset of nucleus basal relocation, it turned out to be one of the very first apoptotic events (with apical constriction) in a *Drosophila* epithelial sheet. Importantly, apoptotic nucleus relocation is unlikely to be restricted to morphogenetic apoptosis. Indeed, in the fly wing disc, upon death induction via irradiation, apoptotic nuclei are detected basally (Baena-Lopez et al., 2018). Hence, at least in fly imaginal tissues, early nuclear relocation is not specifically associated with morphogenetic apoptosis and could be a general prerequisite for cell destruction.

With this in mind, understanding the mechanistic basis of apoptotic nucleus motion is important. Our observations point toward an apoptotic LINC complex composed of Klarsicht and Klaroid. Klarsicht is known to associate with microtubules, although indirectly (Tapley and Starr, 2013). In both *Caenorhabditis elegans* and mouse, nesprins (Unc-83 and Syne-2 respectively) can associate with both dynein and kinesin complexes (Fridolfsson et al., 2010; Meyerzon et al., 2009; Zhang et al., 2009). A similar situation is likely at work in *Drosophila*. While pioneer works suggested a link between Klarsicht and the Dynein/Dynactin complex (Fischer et al., 2004), Klarsicht has been shown more recently to participate in a complex with and be localized by the plus-end motor kinesin-1 (Gaspar et al., 2014). Epithelial cells are usually polarized with microtubules minus-end and plus-ends oriented toward their apical and basal pole respectively (Toya and Takeichi, 2016), suggesting that Klarsicht, associated with kinesin-1, could promote nucleus motion along lateral microtubule tracks in apoptotic cells. It will be of interest to determine the polarity of the non-centrosomal microtubule network in the leg disc and test whether dynein and kinesin can bind to klarsicht at the same time or whether their binding is mutually exclusive in dying cells. An appealing hypothesis would be that caspase activity could modulate binding properties or activity of klarsicht-associated motor proteins, leading to the basal relocation of apoptotic nucleus. Investigation of apoptotic nucleus motion could, at term, shed new light on the regulation of the LINC complex and on its association with the cytoskeleton.

(B and D) Stills extracted from movies showing sagittal views of the epithelium before (red) and after (green) laser cut at the level of the apico-basal myosin cable (B) or at a control lateral site (D). The myosin cable and the localization of the cut are shown by red and purple brackets respectively. Apico-basal recoil is observed in 13 out of 14 cases following cable cut (B) and 3 out of 17 following control lateral cut (D).

(E) Curves of the average apico-basal recoil \pm SEM over time (cable cut $n = 14$; control cut $n = 17$).

(F) Box plot representation of the apical surface release following apico-basal ablation in the indicated contexts. It corresponds to the variation in the angle made by the apical surface 25 s after ablation, compared to 1 s prior ablation (cable cut $n = 15$; control cut $n = 17$). Wilcoxon test: p value < 0.0002 (***)

(G and H) Stills extracted from a movie showing apoptotic nucleus behavior upon laser ablation of apico-basal myosin cable. (G) The DBS-S apoptosensor (cyan on the left panel) labels the nucleus in dying cells (arrow) and is enriched in the apical membrane in nonapoptotic cells. Myosin is shown in red and the apico-basal cable is highlighted by the white bracket. (H) Merge of DBS-S signal before (red) and after (green) myosin cable cut and associated schematization. Site of ablation is indicated by purple brackets. Individual images are shown in black and white on the left. The apoptotic nucleus moves basally after ablation in 9 cases out of 16, leading to an average basal displacement of $0.6 \pm 0.14 \mu\text{m}$.

(I) Stills extracted from a movie showing nuclear envelope dynamics (red) of a dying cell (green) before (left) and during (right) the apoptotic nucleus upward movement associated with the force-generation stage. A close-up view of the apoptotic nuclear envelope is shown in black and schematized. Note that the apoptotic nucleus is apically deformed during the force-generation stage (arrowheads, $n = 12/12$). Asterisks identify the center of the nucleus, highlighting the upward nuclear movement (black arrow).

(J) Normalized index of nuclear envelope apical deformation before and during the force-generation stage represented as box plots (see STAR Methods; apoptotic nuclei, $n = 12$; nonapoptotic nuclei, $n = 35$). AU: arbitrary unit. Wilcoxon statistical test was used for the comparison of nuclei before and during force transmission; apoptotic nuclei (p value < 0.0005 for ***) and nonapoptotic nuclei (n.s., nonsignificant). Mann Whitney was used for comparison of apoptotic nuclei versus nonapoptotic nuclei before force transmission (n.s.).

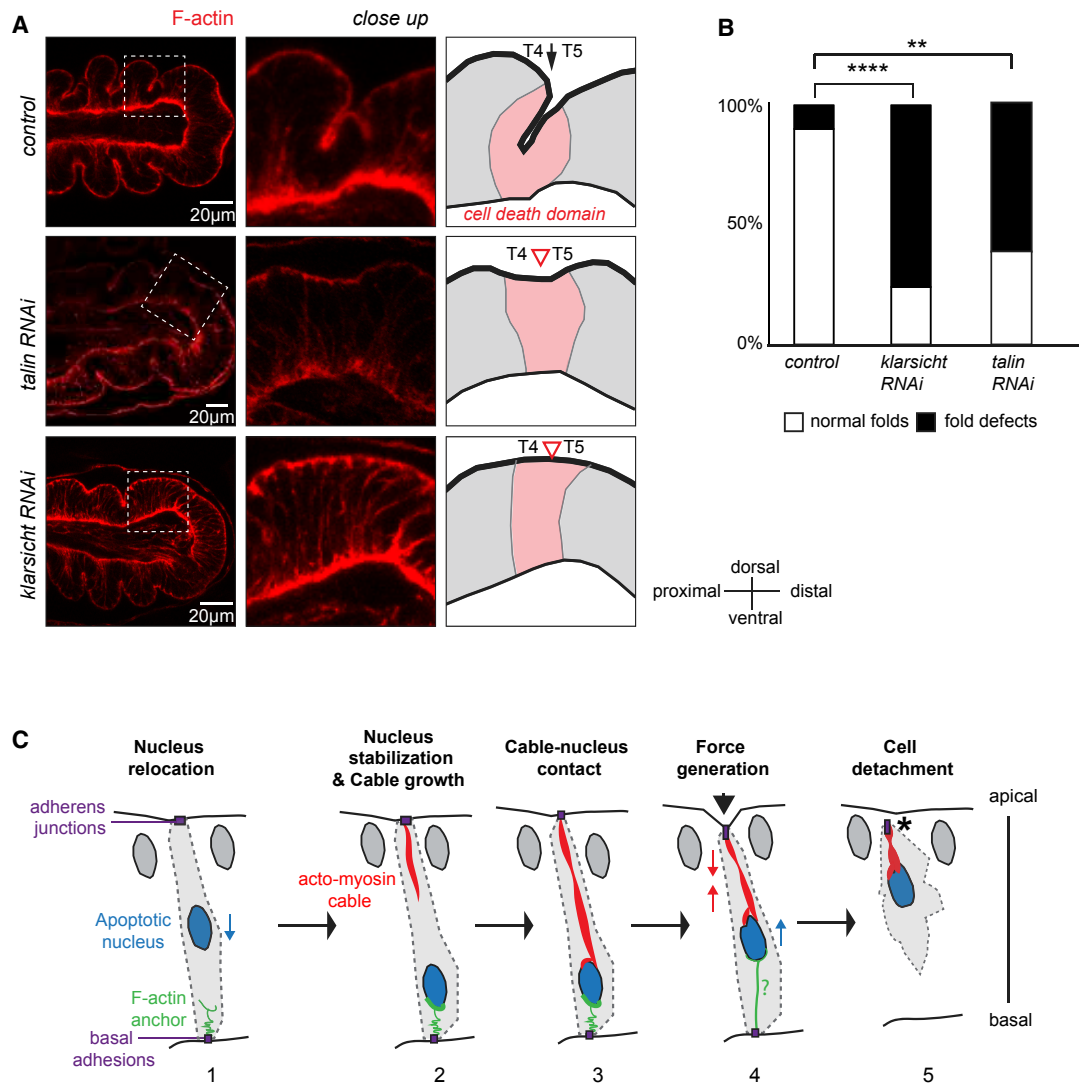


Figure 7. Perturbation of Apico-basal Force-Generation Affects Fold Formation

(A) General sagittal views of the distal leg (left), close up views on the T4/5 segments, and corresponding schemes of a control (top), *talin* RNAi (middle) and *klarsicht* RNAi (bottom) leg discs at 3–4 h after puparium formation. While deep folds form in the control (black arrow), shallow or absent folds are observed in knock-down contexts (open arrowheads).

(B) Histogram representation of the quantification of fold defects observed in control ($n = 20$), *klarsicht* RNAi ($n = 37$), and *talin* RNAi ($n = 13$) contexts. Fisher's statistical test: p values: <0.0001 for **** and <0.0036 for **.

(C) Model of the cellular organization responsible of apico-basal force generation in epithelial apoptotic cells: The apoptotic nucleus is first relocated basally (1). It becomes anchored basally by an actin structure linked to basal adhesion (2). At the same stage, the Myosin II apico-basal cable starts its progression from the apical surface. Next, the myosin cable enters in contact with the nucleus, running along its apical surface (3). At this stage, basal adhesion, basal F-actin and the nucleus form a basal anchor to the cable. Subsequently, the Myosin II cable contracts deforming the apical surface of the epithelium and the apical side of the nucleus, thus transmitting force to the neighbors (4). Although the basal anchor is required at this stage, its organization is only speculative (question mark). Eventually, the force ends when the cell detaches from its neighbors (asterisk, 5).

The Nucleus, from an Organelle Subjected to Forces to a Key Component of the Force-Generation Machinery

An increasing body of work demonstrates that mechanical forces can affect many cellular behaviors. For example, differentiation of stem cells can be directed by mechanical properties of their substrate (or by activation of the Rho pathway) (Engler et al., 2006; McBeath et al., 2004; Yim and Sheetz, 2012). Differentiation of specialized structures such as cardiac valves are induced by blood flow (Boselli et al., 2015; Hove et al., 2003). Mesoderm

stiffening can trigger the onset of collective migration of neural crest cells during *Xenopus* development (Barriga et al., 2018). During adulthood, compression forces caused by tumor growth can cause abnormal proliferation of adjacent, wild-type tissues, hence propagating the tumor (Fernández-Sánchez et al., 2015). Such responses necessitate that at some point, cells modify their gene expression program. Thus, mechanisms are set up to transfer information about cytoplasmic or external forces into the nucleus. For instance, compressive forces applied

upon fibroblast nuclei deform the nuclear envelope, modifying the shape of nucleopores, which allows entry of key molecules such as the transcription factor YAP into the nucleus (Elosegui-Artola et al., 2017). Alternatively, cells might use the LINC complex to transfer forces from the cytoskeleton to the nuclear envelope. Applying forces to the LINC (in isolated nuclei) leads to nucleus stiffening (Guilluy et al., 2014) while using a Nesprin-tension sensor shows that mechanical forces can indeed be transmitted across a nuclear membrane protein (Arsenovic et al., 2016). Moreover, compressive forces, for example forces generated when forcing cells to cross a small pore, can also change nucleus shape and transiently alter the integrity of its envelope, highlighting the importance of specialized repair mechanisms (Denais et al., 2016; Raab et al., 2016).

Since the primary function of the nucleus is to protect the genome and participate in the regulation of the genetic information, most of the studies addressing the relationship between the nucleus and cellular forces focused so far on how forces can trigger changes within the nucleus. Strikingly, our results demonstrate that, not only does the nucleus respond to forces, it also plays a key role in force generation at the cell scale during a morphogenetic process. The double connection with distinct cytoskeletal structures (one contractile and one resisting) switches the nucleus from being a moving organelle (Gundersen and Worman, 2013; Huelsmann et al., 2013; Lee and Norden, 2013; Zhao et al., 2012) to an essential constituent of the cellular machinery responsible for force generation. To our knowledge, this illustrates for the first time an additional, nongenomic function of the nucleus during animal development.

Pending questions are now whether the nucleus does participate in the cellular machinery responsible of apico-basal forces in other cell types, and to which extent does it participate in additional types of cellular forces. In this regard, it has been recently proposed that the nucleus can transmit forces from the rear to the front of isolated migrating cells in culture (Alam et al., 2015), suggesting the potential conservation of the nucleus as a key element in the force-generation machinery in different contexts.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
 - Breeding Conditions for Model Animals
 - Fly Stocks
- **METHOD DETAILS**
 - Immunostainings
 - Tissue Culture and Live Microscopy
 - Drug Treatment
 - Post-acquisition Isolation of Apoptotic Nuclei
 - Nuclei Positioning and Deformation
 - Laser Dissection
 - Analysis of Force Generation and Fold Morphogenesis
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Nuclei Positioning
 - Nuclei Stability

- Break Duration during Baso-apical Nucleus Movement
- Measures of Recoil after Laser Ablation
- Quantification of Apical Nucleus Deformation

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.027>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their thanks to Mélanie Gettings, Anne Pelissier-Monier, and Alice Davy for helpful discussion, to Alberto Baena-Lopez for sharing reagents, and to the Imaging (LITC) and *Drosophila* facilities of the CBI. M.S.'s lab is supported by grants from the European Research Council (ERC) under the European Union Horizon 2020 research and innovation program (grant number EPAF: 648001), the Fondation Arc pour la Recherche sur le Cancer (CA 09-12-2014), and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, Plan cancer 2014–2019). A.A. has been supported by the French Ministry of Research and A.A. and M.R. by la Ligue Nationale contre le Cancer during their PhD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.A. and M.R. performed most experiments and data analysis. M.R., B.M., and M.S. performed ablation experiments. B.M. and M.S. supervised the project. Funding acquisition: M.S.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: November 5, 2018

Revised: March 11, 2019

Accepted: May 10, 2019

Published: June 13, 2019

REFERENCES

- Alam, S.G., Lovett, D., Kim, D.I., Roux, K.J., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2015). The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Cell Sci.* *128*, 1901–1911.
- Ambrosini, A., Gracia, M., Proag, A., Rayer, M., Monier, B., and Suzanne, M. (2017). Apoptotic forces in tissue morphogenesis. *Mech. Dev.* *144*, 33–42.
- Andrade, D., and Rosenblatt, J. (2011). Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion. *Apoptosis* *16*, 491–501.
- Arsenovic, P.T., Ramachandran, I., Bathula, K., Zhu, R., Narang, J.D., Noll, N.A., Lemmon, C.A., Gundersen, G.G., and Conway, D.E. (2016). Nesprin-2G, a component of the nuclear LINC complex, is subject to myosin-dependent tension. *Biophys. J.* *110*, 34–43.
- Baena-Lopez, L.A., Arthurton, L., Bischoff, M., Vincent, J.P., Alexandre, C., and McGregor, R. (2018). Novel initiator caspase reporters uncover previously unknown features of caspase-activating cells. *Development* *145*.
- Barriga, E.H., Franze, K., Charras, G., and Mayor, R. (2018). Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature* *554*, 523–527.
- Boselli, F., Freund, J.B., and Vermot, J. (2015). Blood flow mechanics in cardiovascular development. *Cell. Mol. Life Sci.* *72*, 2545–2559.
- Brodland, G.W., Conte, V., Cranston, P.G., Veldhuis, J., Narasimhan, S., Hutson, M.S., Jacinto, A., Ulrich, F., Baum, B., and Miodownik, M. (2010). Video force microscopy reveals the mechanics of ventral furrow invagination in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 22111–22116.
- Chanet, S., and Martin, A.C. (2014). Mechanical force sensing in tissues. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *126*, 317–352.
- Chung, S., Kim, S., and Andrew, D.J. (2017). Uncoupling apical constriction from tissue invagination. *ELife* *6*.

- Colas, J.F., and Schoenwolf, G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.* *221*, 117–145.
- Coravos, J.S., and Martin, A.C. (2016). Apical sarcomere-like actomyosin contracts nonmuscle drosophila epithelial cells. *Dev. Cell* *39*, 346–358.
- Davidson, L.A. (2012). No strings attached: new insights into epithelial morphogenesis. *BMC Biol.* *10*, 105.
- Denais, C.M., Gilbert, R.M., Isermann, P., McGregor, A.L., te Lindert, M., Weigel, B., Davidson, P.M., Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2016). Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* *352*, 353–358.
- 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.
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A.J., Oriá, R., Kechagia, J.Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.L., et al. (2017). Force triggers YAP nuclear entry by regulating transport across nuclear pores. *Cellule* *171*, 1397–1410.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677–689.
- Fernández-Sánchez, M.E., Barbier, S., Whitehead, J., Béalle, G., Michel, A., Latorre-Ossa, H., Rey, C., Fouassier, L., Claperon, A., Brullé, L., et al. (2015). Mechanical induction of the tumorigenic β -catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature* *523*, 92–95.
- Fischer, J.A., Acosta, S., Kenny, A., Cater, C., Robinson, C., and Hook, J. (2004). Drosophila klsr1 has distinct subcellular localization domains for nuclear envelope and microtubule localization in the eye. *Genetics* *168*, 1385–1393.
- Fridolfsson, H.N., Ly, N., Meyerzon, M., and Starr, D.A. (2010). UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. *Dev. Biol.* *338*, 237–250.
- Gaspar, I., Yu, Y.V., Cotton, S.L., Kim, D.H., Ephrussi, A., and Welte, M.A. (2014). Klar ensures thermal robustness of oskar localization by restraining RNP motility. *J. Cell Biol.* *206*, 199–215.
- Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2011). Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J. Cell Biol.* *193*, 667–676.
- Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., and Burridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* *16*, 376–381.
- Gundersen, G.G., and Worman, H.J. (2013). Nuclear positioning. *Cell* *152*, 1376–1389.
- He, B., Dubrovinski, K., Polyakov, O., and Wieschaus, E. (2014). Apical constriction drives tissue-scale hydrodynamic flow to mediate cell elongation. *Nature* *508*, 392–396.
- Heisenberg, C.P., and Bellaïche, Y. (2013). Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* *153*, 948–962.
- Hildebrand, J.D. (2005). Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J. Cell Sci.* *118*, 5191–5203.
- Hove, J.R., Köster, R.W., Forouhar, A.S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S.E., and Gharib, M. (2003). Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* *421*, 172–177.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.C., et al. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* *17*, 860–866.
- Huelsmann, S., Yläñne, J., and Brown, N.H. (2013). Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in Drosophila nurse cells. *Dev. Cell* *26*, 604–615.
- Keller, R., Davidson, L.A., and Shook, D.R. (2003). How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation* *71*, 171–205.
- Kiehart, D.P. (2015). Epithelial morphogenesis: apoptotic forces drive cell shape changes. *Dev. Cell* *32*, 532–533.
- Klapholz, B., and Brown, N.H. (2017). Talin - the master of integrin adhesions. *J. Cell Sci.* *130*, 2435–2446.
- Kondo, T., and Hayashi, S. (2015). Mechanisms of cell height changes that mediate epithelial invagination. *Dev. Growth Differ.* *57*, 313–323.
- 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, H.O., and Norden, C. (2013). Mechanisms controlling arrangements and movements of nuclei in pseudostratified epithelia. *Trends Cell Biol.* *23*, 141–150.
- Lee, Y.L., and Burke, B. (2018). LINC complexes and nuclear positioning. *Semin. Cell Dev. Biol.* *82*, 67–76.
- Levayer, R., Dupont, C., and Moreno, E. (2016). Tissue crowding induces caspase-dependent competition for space. *Curr. Biol.* *26*, 670–677.
- Liang, X., Michael, M., and Gomez, G.A. (2016). Measurement of mechanical tension at cell-cell junctions using two-photon laser ablation. *Bio Protoc.* *6*.
- Lubkov, V., and Bar-Sagi, D. (2014). E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion. *Curr. Biol.* *24*, 868–874.
- Manjón, C., Sánchez-Herrero, E., and Suzanne, M. (2007). Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for Drosophila leg morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 57–63.
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T., and Baum, B. (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue over-crowding. *Nature* *484*, 542–545.
- Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2010). Integration of contractile forces during tissue invagination. *J. Cell Biol.* *188*, 735–749.
- 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.
- 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.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* *6*, 483–495.
- Meyerzon, M., Fridolfsson, H.N., Ly, N., McNally, F.J., and Starr, D.A. (2009). UNC-83 is a nuclear-specific cargo adaptor for kinesin-1-mediated nuclear migration. *Development* *136*, 2725–2733.
- 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.
- Owaribe, K., Kodama, R., and Eguchi, G. (1981). Demonstration of contractility of circumferential actin bundles and its morphogenetic significance in pigmented epithelium in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* *90*, 507–514.
- Pearl, E.J., Li, J., and Green, J.B. (2017). Cellular systems for epithelial invagination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *372*.
- Pérez-Garijo, A., and Steller, H. (2015). Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development* *142*, 3253–3262.
- Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.M., Manel, N., et al. (2016). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* *352*, 359–362.
- 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.
- Schott, S., Ambrosini, A., Barbaste, A., Benassayag, C., Gracia, M., Proag, A., Rayer, M., Monier, B., and Suzanne, M. (2017). A fluorescent toolkit for spatio-temporal tracking of apoptotic cells in living *Drosophila* tissues. *Development* *144*, 3840–3846.
- Sherrard, K., Robin, F., Lemaire, P., and Munro, E. (2010). Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination. *Curr. Biol.* *20*, 1499–1510.
- Tapley, E.C., and Starr, D.A. (2013). Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 57–62.
- Toya, M., and Takeichi, M. (2016). Organization of non-centrosomal microtubules in epithelial cells. *Cell Struct. Funct.* *41*, 127–135.
- Umetsu, D., and Kuranaga, E. (2017). Planar polarized contractile actomyosin networks in dynamic tissue morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *45*, 90–96.
- Yang, Q., Roiz, D., Mereu, L., Daube, M., and Hajnal, A. (2017). The invading anchor cell induces lateral membrane constriction during vulval lumen morphogenesis in *C. elegans*. *Dev. Cell* *42*, 271–285.
- Yim, E.K., and Sheetz, M.P. (2012). Force-dependent cell signaling in stem cell differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* *3*, 41.
- Zhang, J., Wang, X., Cui, W., Wang, W., Zhang, H., Liu, L., Zhang, Z., Li, Z., Ying, G., Zhang, N., et al. (2013). Visualization of caspase-3-like activity in cells using a genetically encoded fluorescent biosensor activated by protein cleavage. *Nat. Commun.* *4*, 2157.
- Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R., and Han, M. (2009). Sun1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron* *64*, 173–187.
- 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.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse anti-klarsicht-C (1:50)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)	9C10; RRID: AB_10584797
Mouse anti-Lamin Dm0 (1:50)	DSHB	ADL195; RRID: AB_528333
Rat anti-E-Cadherin (1:50)	DSHB	DCAD2; RRID: AB_528120
Rabbit Anti-cleaved Dcp1 (1:200)	Cell Signaling Technologies	Cat#9578; RRID: AB_2721060
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Vectashield with DAPI	Vector Laboratories	Cat#H-1200
Phalloidin-Rhodamine	Fisher Scientific	Cat#10063052
FM4-64	Fisher Scientific	Cat#10717864
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich	Cat#C2618
DMSO	Sigma-Aldrich	Cat#D8418
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	Cat#B2883
20-hydroxyecdysone	Sigma-Aldrich	Cat# H5142
Agarose type VII	Sigma-Aldrich	Cat#A4018
Experimental Models: Organisms/Strains		
<i>D. melanogaster</i> : Myosin-GFP: <i>w, sqh{TI}-eGFP</i> [29B]	This study	N/A
<i>D. melanogaster</i> : Myosin-TagRFP: <i>w, sqh{TI}-TagRFP</i> [3B]	This study	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>w, lamin{TI}-TagRFP</i>	This study	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w; rhea[MI00296]-GFP/TM6B</i>	BDSC	RRID: BDSC_39649
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w; rhea[MI00296]-mCherry/TM6B</i>	BDSC	RRID: BDSC_39648
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; UAS::alpha-Catenin-TagRFP</i>	Gift from K. Sugimura	FBal0279996 Kyoto University, iCeMS
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w, cv, sqh[AX3]; sqh::sqh-GFP</i>	BDSC	RRID: BDSC_57144
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w; klaroid[CB04483]-GFP</i>	BDSC	RRID: BDSC_51525
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w; Map205[CC00109]-GFP</i>	BDSC	RRID: BDSC_51533
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; arm::arm-GFP</i>	BDSC	RRID: BDSC_8556
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w; UAS::lamin-GFP</i>	BDSC	RRID: BDSC_7378
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w, HS::Flp; act5C-Flp-y+-FRT::Gal4, UAS::GFP</i>	Monier et al., 2015	Centre de Biologie Intégrative (CBI), LBCMCP
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; ; UAS::His2Av-mKO</i>	BDSC	RRID: BDSC_53731
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; ; UAS::lifeact-TagRFP</i>	BDSC	RRID: BDSC_58714
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; ; UAS::mcd8-mCherry</i>	BDSC	RRID: BDSC_27392
<i>D. melanogaster</i> : <i>cytoplasmic GFP apoptosensor: w; UAS::GC3Ai [G16]</i>	Schott et al., 2017	Centre de Biologie Intégrative (CBI), LBCMCP
<i>D. melanogaster</i> : <i>cytoplasmic GFP apoptosensor: w; ; UAS::GC3Ai [G75]</i>	Schott et al., 2017	Centre de Biologie Intégrative (CBI), LBCMCP
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; UAS::Utrrophin-GFP</i>	Gift from T. Lecuit	FBtp0073094
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; Msp300[CPTI003472]-Venus</i>	DGRC Kyoto	FBst0325397
<i>D. melanogaster</i> : <i>Dll::Gal4[MD23]/CyO</i>	BDSC	RRID: BDSC_3038
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, w; ap::Gal4[md544]/CyO</i>	BDSC	RRID: BDSC_3041
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, sc, v; ; UAS::RNAi-klarsicht[HMS01612]</i>	BDSC	RRID: BDSC_36721
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, v; ; UAS::RNAi-klarsicht[JF02944], e</i>	BDSC	RRID: BDSC_28313
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, sc, v; ; UAS::RNAi-rhea[HMS00856]</i>	BDSC	RRID: BDSC_33913
<i>D. melanogaster</i> : <i>w; ; UAS::RNAi-rhea[40339]</i>	VDRC	V40339; FBst0463536
<i>D. melanogaster</i> : <i>y, sc, v; UAS::RNAi-lamin[HMC04816]</i>	BDSC	RRID: BDSC_57501

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<i>D. melanogaster</i> : <i>w</i> ; <i>koi</i> [80]	BDSC	RRID: BDSC_25105
<i>D. melanogaster</i> : nuclear GFP apoptosensor: <i>w</i> ; <i>tub::DBS-S</i>	Gift from A. Baena-Lopez; Baena-Lopez et al., 2018	Dunn School, University of Oxford
Software and Algorithms		
Prism 8	GraphPad	RRID: SCR_002798
Photoshop CS5	Adobe	RRID: SCR_014199
Imaris 8.4.1	Bitplane	RRID: SCR_007370
Fiji	https://fiji.sc/	RRID: SCR_002285
Other		
120 μ m deep Secure-Seal™	Sigma-Aldrich	Cat#GBL654008
Shields and Sang M3	Sigma-Aldrich	Cat#S3652
Schneider's insect medium	Sigma-Aldrich	Cat#S0146
Halocarbon oil	Sigma-Aldrich	Cat#H8773
Microscopes		
Confocal LSM880	Zeiss	54477
CellObserver Spinning Disc	Zeiss	57174
Objective 40X 1.4 Oil Plan APO	Zeiss	4207 62 - 9900
Objective 40X 1.2 Water C APO	Zeiss	421767-9971-790
Objective 63X 1.4 Oil APO	Zeiss	420782 - 9900
Objective 63X 1.2 Water C APO Dic	Zeiss	421787 - 9971 - 790
Pulsed Laser 532nm	Rapp-opto	DPSL 532/42/CLS UGA-42 Firefly

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Magali Suzanne (magali.suzanne@univ-tlse3.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Breeding Conditions for Model Animals**

The animal model used here is *Drosophila melanogaster*, in a context of *in vivo/ex vivo* experiments. In order to respect ethic principles, animals were anesthetized with CO₂ (adults) before any manipulation. To avoid any release of flies outside the laboratory, dead flies were frozen before throwing them. Stocks of living flies were conserved in incubators, either at 18 or 25 degrees to maintain the flies in optimal condition. Genotypes and developmental stages are indicated below. Experiments were performed in both males and females indifferently. Loss of function experiments using RNAi were carried out at 30 degrees.

Fly Stocks

Lamin-TagRFPT, sqh-eGFP[29B] and sqh-TagRFPT[3B] (this work) are knock-in designed and generated by homologous recombination by InDroso functional genomics (Rennes, France). The respective tags were inserted in C-terminal just before the stop codon for sqh and in N-terminal just before the ATG for lamin, and the resulting flies were validated by sequencing.

Additional fluorescent lines obtained from Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) are: rhea[Mi00296]-GFP, rhea[Mi00296]-mCherry, sqh[AX3]; sqh::sqh-GFP, klaroid[CB04483]-GFP, Map205[CC00109]-GFP, arm::arm-GFP, UAS::lamin-GFP, UAS::His2Av-mKO, UAS::lifactTagRFPT, UAS::mcd8-mCherry. The GFP apoptosensor UAS::GC3Ai was described previously (Schott et al., 2017). The *tub::DBS-S* apoptosensor, UAS:: α -catenin-TagRFP and UAS::Utrophin-GFP are gifts from A. Baena-Lopez, K. Sugimura and T. Lecuit respectively. Msp300[CPTI003472]-Venus was obtained from DGRC (Kyoto, Japan). Additional stocks are Dll::Gal4 [MD23], ap::Gal4[md544], act5C-Flp-y+-FRT::Gal4, UAS::GFP and HS::Flp.

RNA interference was realized using UAS::RNAi-klarsicht[HMS01612] and UAS::RNAi-klarsicht[JF02944] (both lines were obtained from BDSC and gave similar results). UAS::RNAi-rhea[HMS00856] and UAS::RNAi-rhea[v40339] (obtained from BDSC and Vienna *Drosophila* Resource Center, both lines gave similar results) were used to knock-down Talin. UAS::RNAi-lamin [HMC04816] and *koi*[80] mutant line were obtained from BDSC.

METHOD DETAILS

Immunostainings

Leg discs from prepupae (from 0h to 4h after puparium formation depending on experiments) are dissected in PBS 1x. Tissues are fixed by paraformaldehyde 4% diluted in PBS 1x during 20 minutes. Then the samples are washed and saturated in PBS 1x, 0.3% Triton X-100 and BSA 1% (BBT). Next, the samples are incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in BBT. Samples are washed for 1h in BBT before a 2h incubation at room temperature with secondary antibodies diluted in BBT. Finally, samples are washed with PBS 1x, 0.3% Triton X-100 for 1h and mounted in Vectashields containing DAPI (Vector Laboratories). A 120- μ m-deep spacer (Secure-SealTM from Sigma-Aldrich) is placed in between the glass slide and the coverslip to preserve morphology of the tissues.

Primary antibodies from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) are klarsicht-C antibody (9C10-s, mouse, 1:50), Lamin Dm0 (ADL195-s, mouse, 1:50) and E-Cadherin antibody (DCAD2, rat, 1:50). Anti-cleaved Dcp-1 (#9578, rabbit, 1:200) was obtained from Cell Signaling Technologies. Secondary antibodies (Alexa488 and 647) are purchased from Interchim and diluted at 1:200 or 1:100 respectively. Phalloidine-Rhodamine (Fischer Scientific) used to stain F-actin is diluted at 1:200.

Tissue Culture and Live Microscopy

Leg discs are dissected at white pupal stage in Shields and Sang M3 or Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 15% fetal calf serum and 0.5% penicillin-streptomycin as well as 20-hydroxyecdysone at 2 μ g/mL (Sigma-Aldrich, H5142). Leg discs are transferred on a glass slide in 13.5 μ L of this medium confined in a 120 μ m-deep double-sided adhesive spacer (Secure-SealTM from Sigma-Aldrich). A glass coverslip is then placed on top of the spacer. Halocarbon oil is added on the sides of the spacer to prevent dehydration. Dissection tools are cleaned with ethanol before dissection.

Nuclei are labelled *in vivo* either through expression of a UAS::His2Av-mKO construct or using Hoechst staining. For this purpose, dissected discs are incubated in the dark for 20 minutes with Hoechst 33342 (Sigma, B2883, 25mg/ml) diluted at (1:100) in the culture medium. Legs are then transferred in fresh medium without Hoechst and mounted between slide and coverslip as described above. To avoid Hoechst toxicity, fly tissues are imaged for no longer than 1h30. Membrane staining using FM4-64 was performed as described in [Monier et al. \(2015\)](#).

Live and fixed samples were imaged using either an inverted LSM880 Zeiss confocal mounted with 40x/1.2 or 63x/1.3 water objectives or 40x/1.4 or 63x/1.4 oil objectives and equipped with a piezo stage or using an inverted spinning disk confocal microscope (CSU-X1, Yokogawa, coupled to a Leica or a Zeiss microscope) equipped with 405 nm, 488 nm and 561 nm LEDs, a piezo stage and a Hamamatsu EMCCD camera controlled by the Metamorph or Zen softwares. Images were processed with the Fiji and Imaris softwares.

Drug Treatment

Cytochalasin D is a chemical agent which causes F-actin depolymerisation. We set up conditions that reduces F-actin levels without altering tissue integrity. Following dissection, leg discs are incubated during 20 minutes with Cytochalasin D (Sigma; #C2618, 5 μ g/ml) diluted at 1:1000 in Shields and Sang medium. DMSO was used for control conditions. Tissues are next washed with fresh medium and mounted between a glass slide and a coverslip separated with a spacer. The spacer is partly filled with a thin layer (around 5 μ m) of low gelling temperature agarose (Sigma, Agarose type VII, #A4018), 0.25% final diluted in Shields and Sang medium. 6 μ L of medium are added on top of agarose and leg discs are transferred (with a drop of about 4 μ L of medium).

Post-acquisition Isolation of Apoptotic Nuclei

In order to follow in the same cell the dynamics of both the nucleus and the myosin cable, it is necessary to acquire a z-stack encompassing the dying cell. However, cell packing renders nuclei tracking in 3D stacks complex. To circumvent this difficulty, we applied post-acquisition image treatment on movies obtained with confocal LSM880 (Zeiss). To increase spatial resolution, we used a ROI on apoptotic cells stained with the GFP cytoplasmic aptosensor ([Schott et al., 2017](#)), while nuclei are labelled with Hoechst and myosin using the knock-in line sqh-TagRFPT. Images are acquired every 20 to 30 seconds for at least 20 minutes. Next, we perform processing of the movies using the IMARIS software. We first create a 3D surface on the apoptotic cell staining. This is used to generate a mask which allows to specifically reveal the nucleus staining of the dying cell. This process is used in [Figures 5A and 5B](#) and illustrated in [Figure S4](#).

Nuclei Positioning and Deformation

To analyze nuclei dynamics during basal stabilization phase ([Figures 4D and 4G](#)), we performed movies with high temporal resolution in short periods of time using spinning disk microscopes. Images are taken on one single plane every 2 seconds during 5 minutes on legs co-expressing UAS::Histone2Av-mKO and UAS::GC3Ai transgenes that respectively label nuclei and apoptotic cells (see quantification in statistics section). We next used the MTrackJ plug in of the ImageJ software to manually track apoptotic and non-apoptotic nuclei and measure their velocity ([Figure 4D](#)). Alternatively, we used Imaris to track nuclei by creating spots on Histone2Av-mko staining (on both apoptotic nuclei and non-apoptotic nuclei) ([Figure 4G](#)).

To extract the behavior of the nucleus in control and RNAi *talin* conditions at the force stage (Figures 5C and 5D), we used the IMARIS software. We generated a spot on the isolated apoptotic nucleus (see “Post-acquisition isolation of apoptotic nuclei” section) and created a track of nuclear movement. Nuclei dynamics were visualized using Imaris speed color-coded scale.

To study nuclear distortion during force generation, z-stack ($\sim 7\mu\text{m}$) were acquired every 10 seconds during 30 minutes (time estimated to visualize upward nuclear movement) on legs expressing Lamin-tagRFPt and UAS::GC3Ai transgenes that respectively label nuclear envelope and apoptotic cells (Figures 6I and 6J) (see quantification and statistics section). We used a Zeiss spinning disc microscope.

Laser Dissection

Leg discs were dissected from white pupae (0-1 h APF), and mounted between a glass slide and a coverslip separated by a spacer to preserve leg morphology. Laser dissection experiments (Figures 6A–6H) were performed on a Zeiss LSM880 laser scanning microscope fitted with a pulsed DPSS laser (532 nm, pulse length 1.5 ns, repetition rate up to 1 kHz, 3.5 $\mu\text{J}/\text{pulse}$) steered by a galvanometer-based laser scanning device (DPSS-532 and UGA-42, from Rapp OptoElectronic, Hamburg, Germany). The laser beam was focused through a water-immersion lens of high numerical aperture (Plan-Apochromat 63x from Zeiss). Experiments were performed using a numerical 2x zoom. Photo-disruption in the middle of the leg epithelium was produced in the focal plane by illuminating at 100 % laser power a 70 pixel line (around $10\mu\text{m}$) for 5s. Images of Myosin-GFP or DBS-S were acquired every 500 ms to 1s using a 488 nm Argon laser and a GaAsP photomultiplier. In the case of DBS-S, the green apoptosensor was crossed to Myosin-TagRFPt to visualize the stage of the apoptotic cell and determine the region to be ablated. Due to photobleaching caused the 532 nm pulsed laser, Myosin-TagRFPt could not be analyzed after laser cut. Cells were selected for their apico-basal myosin cable spanning about the half of the epithelium and their localization in the presumptive T4/T5 fold region, and for the additional presence of nuclear GFP in the case of the DBS apoptosensor.

Analysis of Force Generation and Fold Morphogenesis

For analysis of apico-basal force generation (Figures 3H and 5G), we performed time-lapse movies of cells co-expressing the α -catenin-RFP and the apoptosensor under expression of the *apterous::Gal4* driver. We counted the percentage of cells able to deform the apical surface of the epithelium in control, *klarsicht* RNAi and *talin* RNAi.

For analysis of morphogenesis defects (Figure 7B), we fixed pupae of 3-4h APF. UAS::RNAi were driven by *Distalless::Gal4*. We stained legs with phalloidin to reveal the overall morphology and counted the number of legs with affected folds (shallow, twisted, absent). For both types of experiments, we performed the fisher statistic test to determine if differences between samples were significant.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistics were performed in Prism. N and p values are indicated in figure legends. Box plot were generated in Prism and represent the median, 10 and 90 percentile.

Nuclei Positioning

Related to Figures 2D, 3C, and 3E. The position of nuclei along the apico-basal axis was determined by calculating the ratio of the distance from nucleus center to basal surface divided by the overall cell height. Distances were measured using the Zen program (Zeiss). We used the Wilcoxon test for paired samples in Figure 2D and the Mann Whitney test for non-paired samples in Figures 3C and 3E.

Lamin Levels

Related to Figure S1B. Lamin levels were measured using Fiji by drawing a segmented line of the width of the nuclear envelope on single z planes. In each leg, the averaged intensity of non-apoptotic nuclei was used to normalize the intensity of each individual nucleus. We performed the Mann Whitney test because this is a non-parametric test with non paired samples.

Nuclei Stability

Related to Figures 4D and 4G. Using ImageJ or Imaris softwares, we measured the displacement of nuclei per minute. For comparison of apoptotic and non-apoptotic nuclei in DMSO (Figure 4D) or in control condition (Figure 4G), we calculated the mean velocity of apoptotic and non-apoptotic nuclei per leg and compared samples using paired Wilcoxon-test. For other comparisons, we performed the Mann Whitney test because this is a non-parametric test with non paired samples.

Break Duration during Baso-apical Nucleus Movement

Related to Figure 5E. The break in upward motion of apoptotic nuclei at the force-generation stage was determined on the tracks of nuclei movement generated by the Imaris software (see above). Beginning and end of the break phase were determined based on the change of nuclei velocity and direction. The difference of the break in nuclei upward motion was compared using Mann Whitney test.

Measures of Recoil after Laser Ablation

Related to [Figures 6E, 6F, and 6H](#). Quantification of recoil after ablation of Myosin-GFP apico-basal cables or control ablation of lateral membranes was performed by following two intense myosin structures over time as described in ([Liang et al., 2016](#)). Kymographs were generated using Fiji. Quantification of basal nuclear movement was achieved on the DBS-S apoptosensor ([Baena-Lopez et al., 2018](#)). Images were registered using the Fiji stackreg plug in. The displacement of the apoptotic nucleus from the site of ablation was then measured at around 30 seconds after the laser cut.

Quantification of the recoil of the apical surface was achieved in Fiji by measuring the angle made by the apical surface (stained by Myosin-GFP) above the site of lateral ablation. We calculated the difference between the apical surface angle before (-1 sec) and after (+25 sec) laser cut.

Quantification of Apical Nucleus Deformation

Related to [Figure 6J](#). The local transient apical deformation of the apoptotic nucleus was determined in Fiji. We first fitted the closest ellipse to the nucleus. Next, we draw a polygon that follows the outline of the apical region of the nucleus. The fit spline option was used to make the polygon smooth. The apical nucleus deformation corresponds to the difference of surface between the polygon and the ellipse which is normalized by the surface of the ellipse and expressed as a percentage. We compared apoptotic nucleus shape just prior and during baso-apical movement (which corresponds to the force stage); non-apoptotic nuclei were analyzed on the same images. Wilcoxon statistical test was used for the comparison of nuclei before and during force transmission; apoptotic nuclei (p-value <0.0005 for ***) and non-apoptotic nuclei (n.s.: non significant). Mann Whitney was used for comparison of apoptotic nuclei vs non apoptotic nuclei before force transmission (n.s.).

Developmental Cell, Volume 50

Supplemental Information

**Mechanical Function of the Nucleus in Force
Generation during Epithelial Morphogenesis**

Arnaud Ambrosini, Mégane Rayer, Bruno Monier, and Magali Suzanne

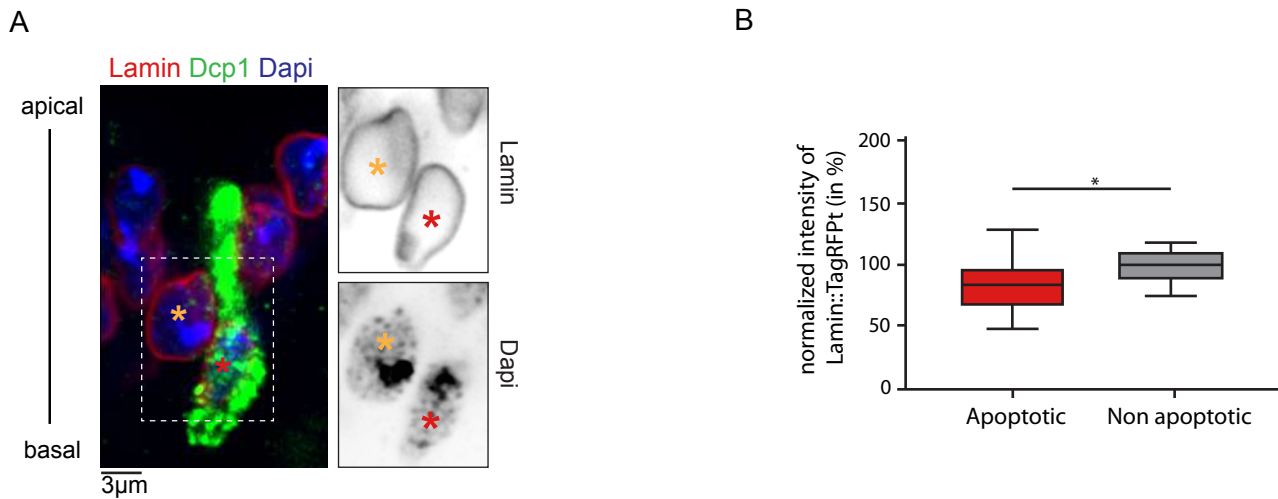


Figure S1. Nucleus morphology and integrity in early apoptotic cells

(A) Sagittal section of a fixed prepupal leg (left). Chromatin (DAPI) is in blue, nuclear envelope (Lamin) in red. An apoptotic cell is visualized by anti-Dcp1 staining (green). Close up views of Lamin (top) and DAPI (bottom) are shown on the right. Lamin distribution appears similar in apoptotic (red star) and non-apoptotic (orange star) nuclei. The apoptotic cell is at the initiation stage, before force generation. (B) Box plot of Lamin::RFPt levels in apoptotic (n=11) and non-apoptotic (n=35) nuclei. Apoptotic nuclei were selected on their basal localization, during or just prior the force generation stage. Mann Whitney test p value < 0.0159 (*). (Related to Figure 2).

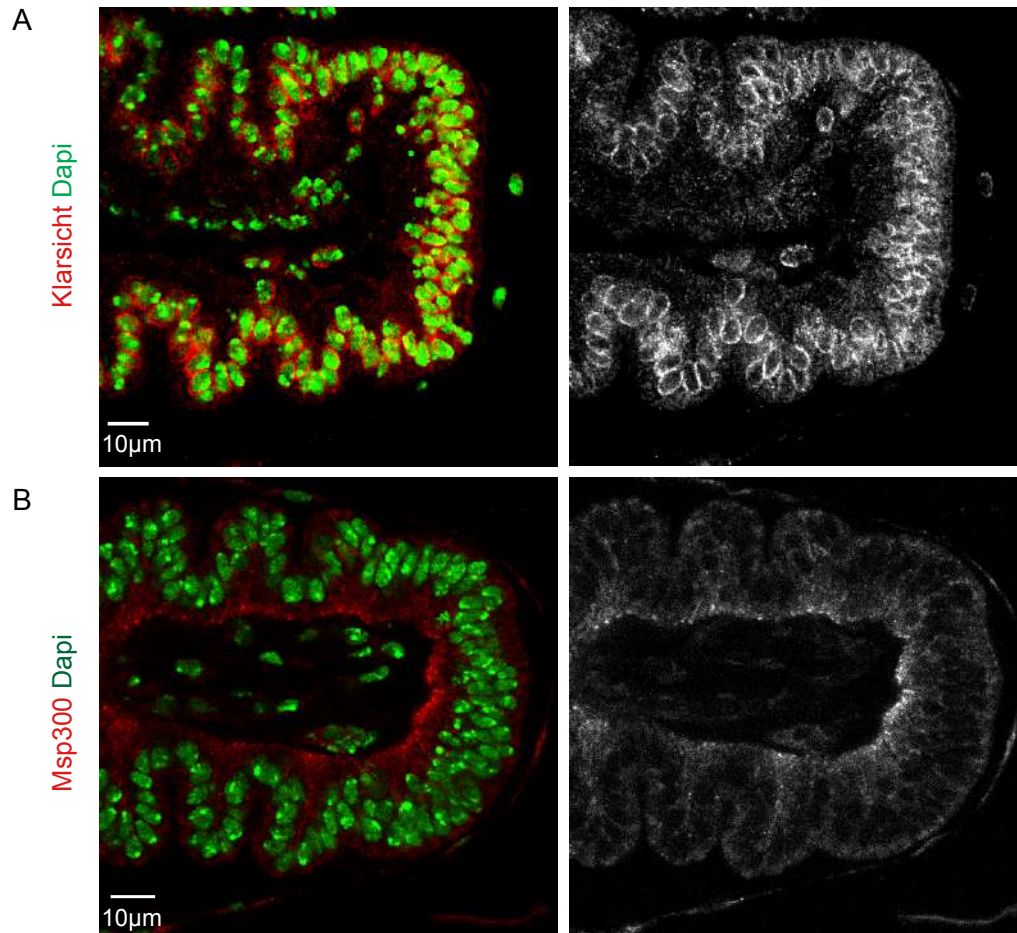
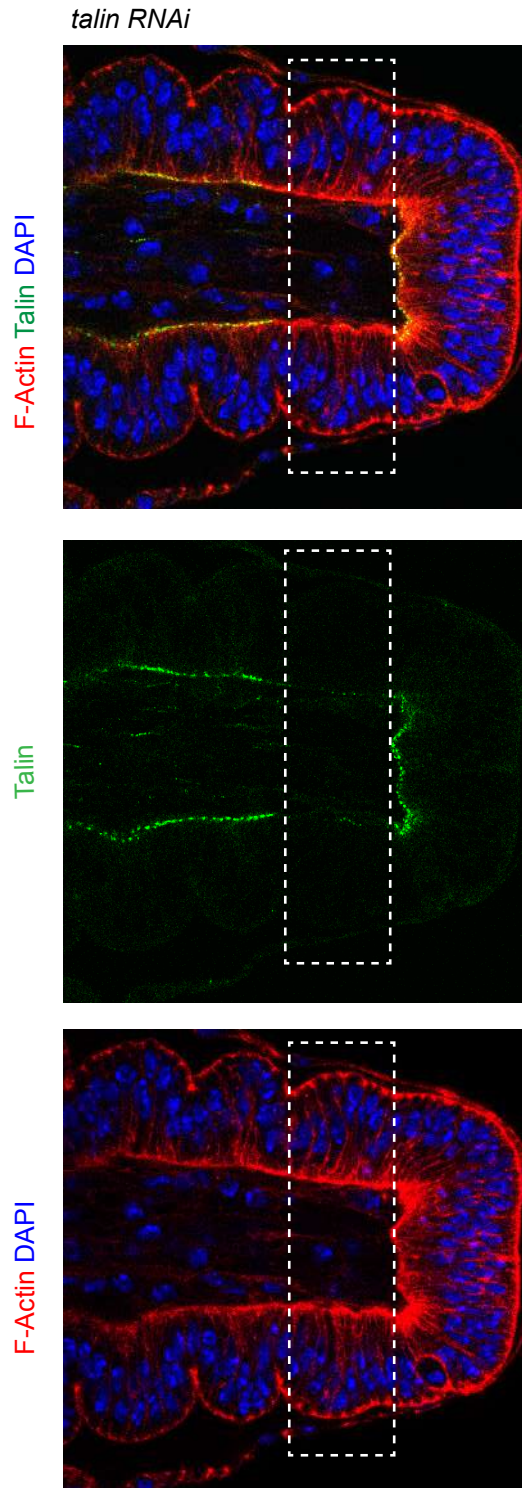


Figure S2. Localisation of KASH-domain proteins in the *Drosophila* leg

(A-B) Localization of the LINC members Klarsicht (A) and Msp-300 (B) in the leg tissue. Proteins of interest are shown in red and white and the nuclei in green. Msp-300 localisation is achieved using a Venus protein trap fly line. The Msp-300-Venus fusion protein is not perinuclear in the prepupal leg. By comparison, Klarsicht, which is detected by an antibody, is perinuclear in this tissue. Note that the black and white panel for Klarsicht in (A) is shown in purple in Fig. 3B. (Related to Fig. 3).

A



B

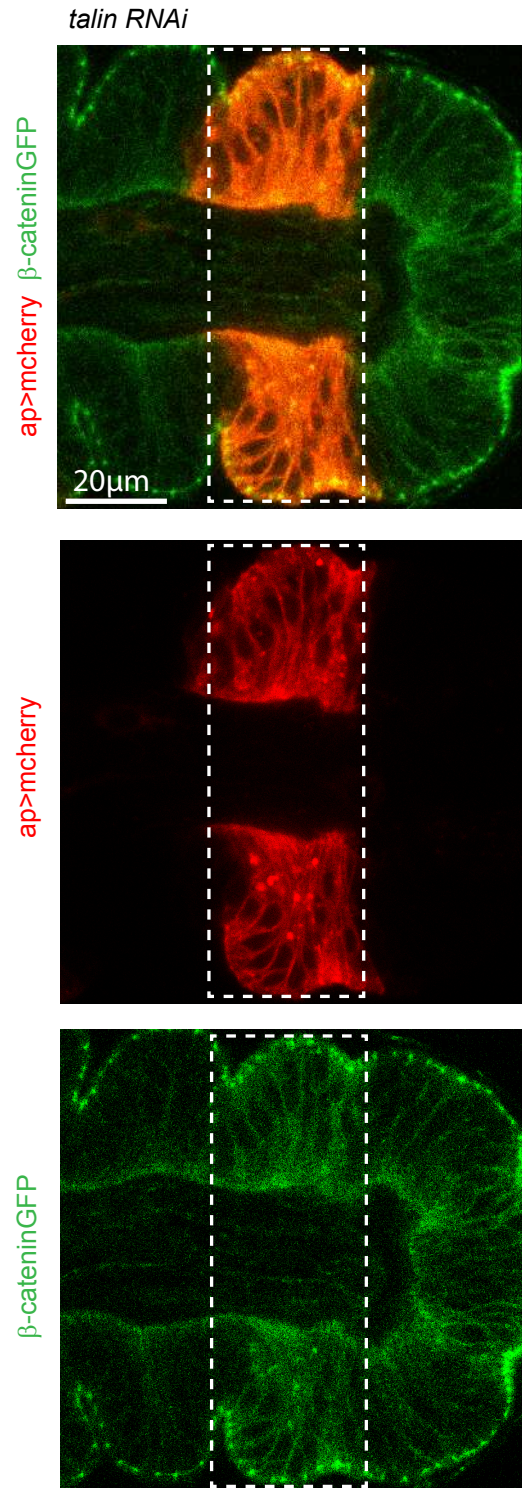


Figure S3. Talin inactivation does not alter tissue integrity in the prepupal leg

(A) Sagittal view of an *apterous::Gal4; UAS::talin RNAi* white pupa leg disc showing the distribution of Talin (green), F-actin organization (red) and nuclear positioning (blue). Note the strong reduction of Talin in the apterous domain (white dotted square). F-actin and nuclei positioning are unaltered in this domain. (B) Sagittal view of an *apterous::Gal4; UAS::talin RNAi* white pupal leg disc showing the distribution of β -catenin (green). Note that the epithelium is normally polarized in the apterous domain (white dotted square) in which *talin* is inactivated. UAS::mCherry labels the apterous domain. (Related to Figure 4)

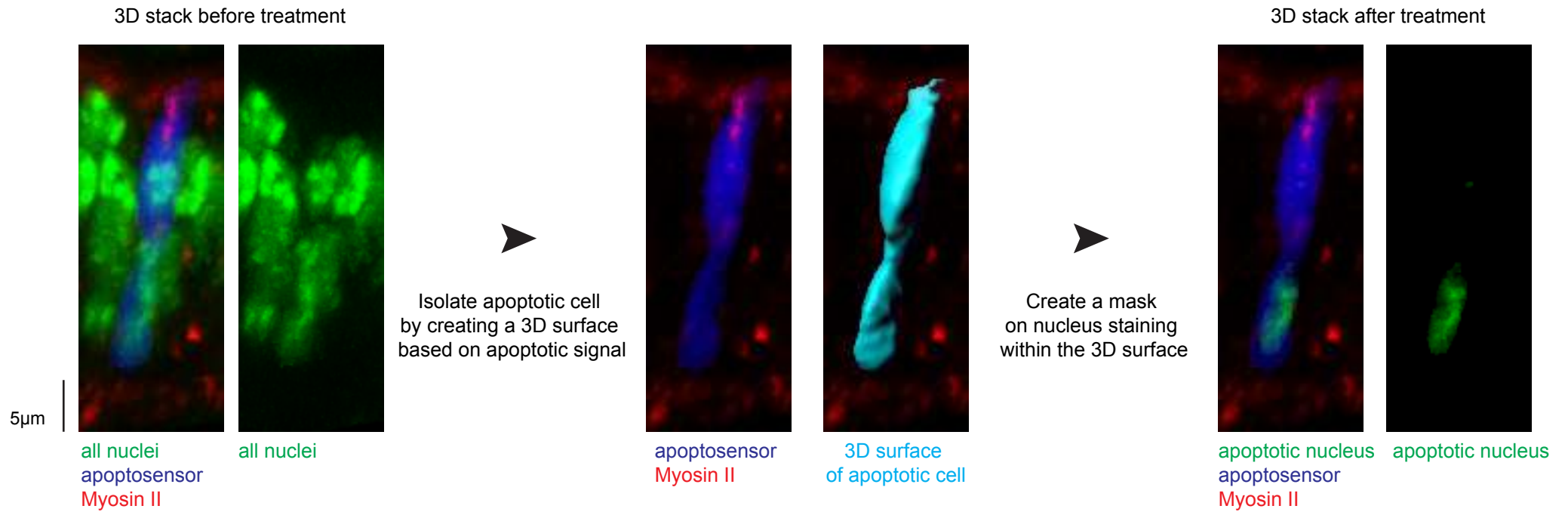


Figure S4. Post-acquisition method to isolate the apoptotic nucleus

Images recapitulating the different steps of apoptotic nucleus isolation from 3D reconstruction stack. 1. Isolation of an apoptotic cell by creating a 3D surface based on the expression of the apoptosensor (GC3Ai, blue). 2. Creation of a mask to extract nucleus staining (green) specifically in the apoptotic cell. Despite an originally crowded environment, this method allows to specifically visualize and track the apoptotic nucleus in live samples. (Related to Figure 5)

III. Une nouvelle étape dans le processus apoptotique : la relocalisation nucléaire.

Cette dernière décennie, beaucoup d'études montrent que la position des noyaux dans les cellules est importante pour leur fonction (division, migration, différenciation ou encore développement) (Gundersen and Worman 2013). Par exemple, lors du développement de l'œil de la drosophile, le noyau des futures cellules photoréceptrices migre vers leur pôle apical après le passage du sillon morphogénétique, permettant leur différenciation (Gundersen and Worman 2013, Mosley-Bishop et al. 1999, Fischer et al. 2004). Dans le cerveau des vertébrés, la migration nucléaire intercinétique, où le noyau migre vers l'apical, est associée à l'entrée en mitose des neuroblastes (Zwaan et al. 1969). Cependant, le rôle de la régulation de la position nucléaire pendant le développement reste relativement peu compris.

Classiquement, dans un épithélium, le noyau est représenté au basal des cellules. Or, dans l'épithélium de patte, les noyaux sont localisés dans sa moitié supérieure, à l'exception du noyau des cellules mourantes qui, lui, est systématiquement relocalisé au basal des cellules. Ces données suggèrent d'abord que la position des noyaux des cellules vivantes de cet épithélium est finement régulée, puisqu'ils sont tous apicaux. Les chercheurs s'intéressent le plus souvent au phénomène de repositionnement du noyau mais peu d'études ont été faites sur le positionnement des noyaux à l'état basal dans un épithélium. Mais alors comment les noyaux sont-ils maintenus à un endroit bien précis de la cellule ?

La place du noyau dans les cellules n'est pas le fruit du hasard. Cette localisation stéréotypée doit répondre à des fonctions cellulaires. Dans les cellules qui meurent le noyau est basal : il est ainsi positionné car il est requis pour la génération de la force apoptotique (voir article 2). Mais par quels mécanismes les cellules mourantes relocalisent leur noyau ? Cela reste à caractériser.

3.1. *Vers un processus actif.*

Le noyau des cellules apoptotiques est relocalisé de manière systématique lors de la morphogenèse de la patte de la drosophile. Ce processus, n'ayant jamais été décrit, mérite d'être caractérisé. Nous avons envisagé deux hypothèses lorsque j'ai débuté ma thèse : (1) le

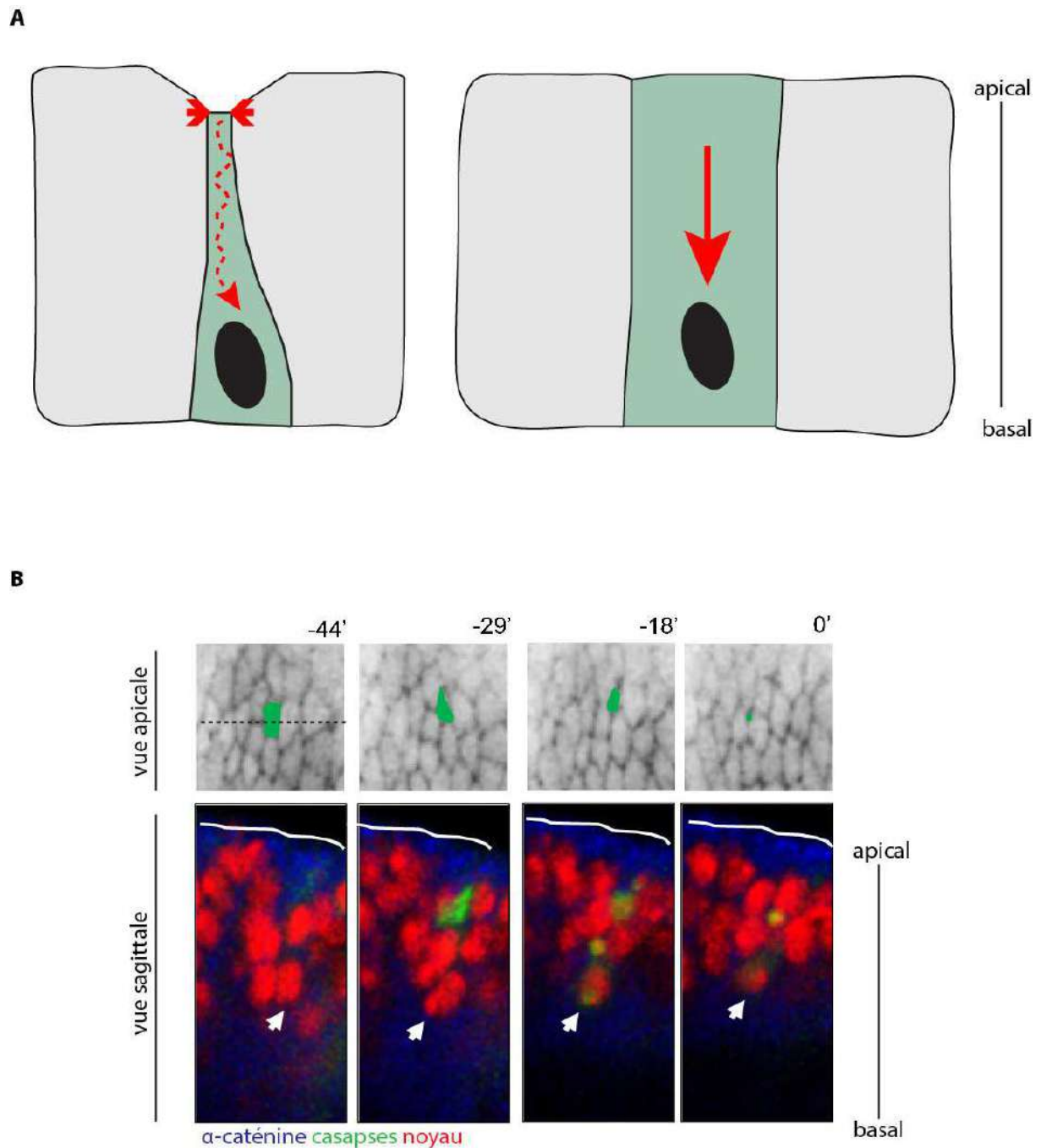


Figure 44. Localisation basale du noyau avant la construction apicale.

(A) hypothèses de relocalisation nucléaire. Le tourbillon rouge sur le schéma de gauche indique une relocalisation passive du noyau causé par le flux de liquide dans le cytoplasme induit par la constriction apicale (flèches rouges). A droite, la flèche rouge indique un mécanisme actif. Les cellules apoptotiques sont en vert. (B) Images tirées d'un film d'une patte pupale. En vue apicale, le tracé vert suit la constriction apicale dans le temps. En vue sagittale les noyaux sont marqués en rouge par NLS mkate, les cellules apoptotiques en vert par VC3Ai. La flèche blanche indique la position du noyau d'une cellule apoptotique basale dans le temps. Ce noyau est basal avant la constriction apicale.

noyau est relocalisé de manière passive ; (2) la relocalisation basale du noyau apoptotique est régulée par un mécanisme actif (**Figure 44A**).

Lors de la morphogenèse de la patte, les cellules apoptotiques vont réduire leur apex afin de faciliter la formation d'une invagination (Monier et al. 2015). De manière intéressante, des études ont montré que dans l'embryon de la drosophile, la constriction apicale provoque un flux de cytoplasme (He et al. 2014) qui peut entraîner la relocalisation des noyaux (Gelbart et al. 2012). On peut donc supposer que la constriction apicale au cours de l'apoptose provoque un flux vers le basal entraînant avec lui le noyau. J'ai donc suivi en temps réel la relocalisation des noyaux apoptotiques en fonction de la constriction apicale. Ainsi, j'ai pu voir que dans la majorité des cas, le noyau est déjà basal au début de la constriction de l'apex (**Figure 44B**). Ce résultat montre que le flux potentiellement généré par la constriction apicale n'est pas impliqué dans la relocalisation du noyau, suggérant alors fortement que le noyau est relocalisé par un autre mécanisme, probablement actif.

C'est à la suite de ces résultats que j'ai abordé le rôle du LINC, un complexe protéique important pour la relocalisation du noyau dans de nombreux types cellulaires (Starr and Han 2002, Lee et al. 2002, Gundersen and Worman 2013). MSP300 (homologue de Nesprine 1/2) et Klarsicht (homologue de la Nesprine 4 et KASH 5) sont les protéines à domaine KASH du complexe LINC chez la drosophile (Zhang et al. 2002, Mosley-Bishop et al. 1999). Elles interagissent respectivement avec les fibres d'actine et les microtubules. Klaroid, elle, est la protéine SUN des cellules somatiques chez la drosophile (Gundersen and Worman 2013, Kracklauer et al. 2007). MSP300 ne semble pas impliquée dans la relocalisation d'une part parce qu'elle n'est pas péri-nucléaire dans l'épithélium de patte (voir article 2), d'autre part car son inhibition à l'aide d'un mutant ne possédant pas de domaine KASH n'affecte pas la localisation des noyaux, qu'ils soient apoptotiques ou non-apoptotiques (**Figure 45**). En revanche, l'inhibition de Klarsicht, localisé à la membrane nucléaire, affecte radicalement le positionnement des noyaux apoptotiques. En effet, ils sont apicaux alors qu'ils devraient être basaux. Les noyaux des cellules non apoptotiques sont, eux, affectés dans une moindre mesure. Ils sont légèrement plus apicaux. Je développerai plus tard ce résultat. De plus, il est important de rappeler que le phénotype de positionnement nucléaire provoqué par Klarsicht a un impact négatif sur la génération de la force apico-basale induisant un défaut de

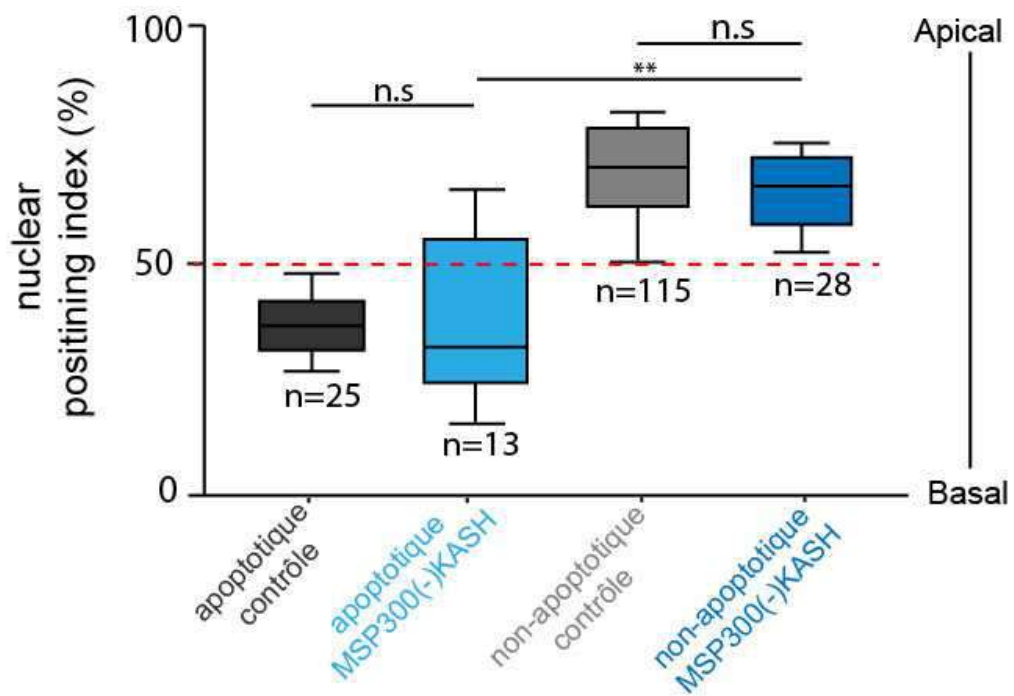


Figure 45. La perte de fonction de MSP300 ne perturbe pas le positionnement des noyaux dans la patte de drosophile.

Position des différents types noyaux dans l'épithélium de patte contrôle (gris) ou un mutant pour MSP300 (bleu). Test statistique Mann-Whitney : Pvalue : 0.0012 pour **, n.s pour non significatif. A noter que la mutation, réalisée par un recombinant homologue, élimine totalement le domaine KASH de localisation nucléaire et d'interaction avec la protéine SUN Klarioide.

morphogenèse (cf article 2). On aurait pu s'attendre à un phénotype identique à celui causé par la perte de Klarsicht en absence de Klaroid ou de lamine, puisque l'inactivation de ces trois gènes conduit au même phénotype dans l'œil de la drosophile (Kracklauer et al. 2007). Toutefois, l'absence de Klaroid et de la Lamine, tous deux péri-nucléaires, perturbe de manière générale la position des noyaux qui se retrouvent au milieu de l'épithélium, qu'ils soient mourants ou non (cf article 2). Ce résultat suggère qu'ils ne jouent pas un rôle spécifique dans la relocalisation du noyau apoptotique.

L'ensemble de ces résultats montre que les noyaux des cellules apoptotiques sont relocalisés par un mécanisme actif engageant un composant du LINC. En effet, j'ai pu identifier que Klarsicht joue un rôle important dans la relocalisation du noyau apoptotique. De plus, Klarsicht étant une protéine liant les microtubules (Fischer et al. 2004), il est donc possible qu'ils coopèrent pour la migration basale des noyaux lors de l'apoptose.

3.2. Où est le moins ? Où est le plus ? Trouvez-les dans la patte de drosophile.

Les Microtubules forment des faisceaux polarisés et sont de véritables rails qui assurent le trafic intracellulaire de nombreuses vésicules et organites (Welte 2004). Cette propriété en fait donc de bons candidats pour le transport du noyau apoptotique de l'apical vers le basal. Cependant, avant de chercher si les microtubules jouent un rôle dans la relocalisation du noyau apoptotique, il est nécessaire de comprendre comment ils s'organisent dans l'épithélium de patte, non décrit à ce jour, afin de pouvoir repérer une dynamique particulière dans les cellules apoptotiques.

De manière générale, dans un épithélium, il y a deux populations de microtubules : les microtubules sont associés aux centrosomes par leur extrémité négative (-) et donc leur extrémité positive (+) en est éloignée. Les microtubules non-centrosomaux, forment des faisceaux parallèles apico-basaux, qui ont leur extrémité (-) vers le pôle apical et l'extrémité (+) vers le pôle basal des cellules épithéliales (Muroyama and Lechler 2017). Cette organisation des microtubules est très conservée entre les espèces, on la retrouve dans les cellules des trachées de la drosophile (Brodu et al. 2010), dans les cellules intestinales de *C. elegans* (Bobinnec, Fukuda and Nishida 2000) et des mammifères (Toya et al. 2016). Est-ce que cette polarité est retrouvée dans l'épithélium de patte de drosophile ?

J'ai cherché à répondre à cette question en caractérisant :

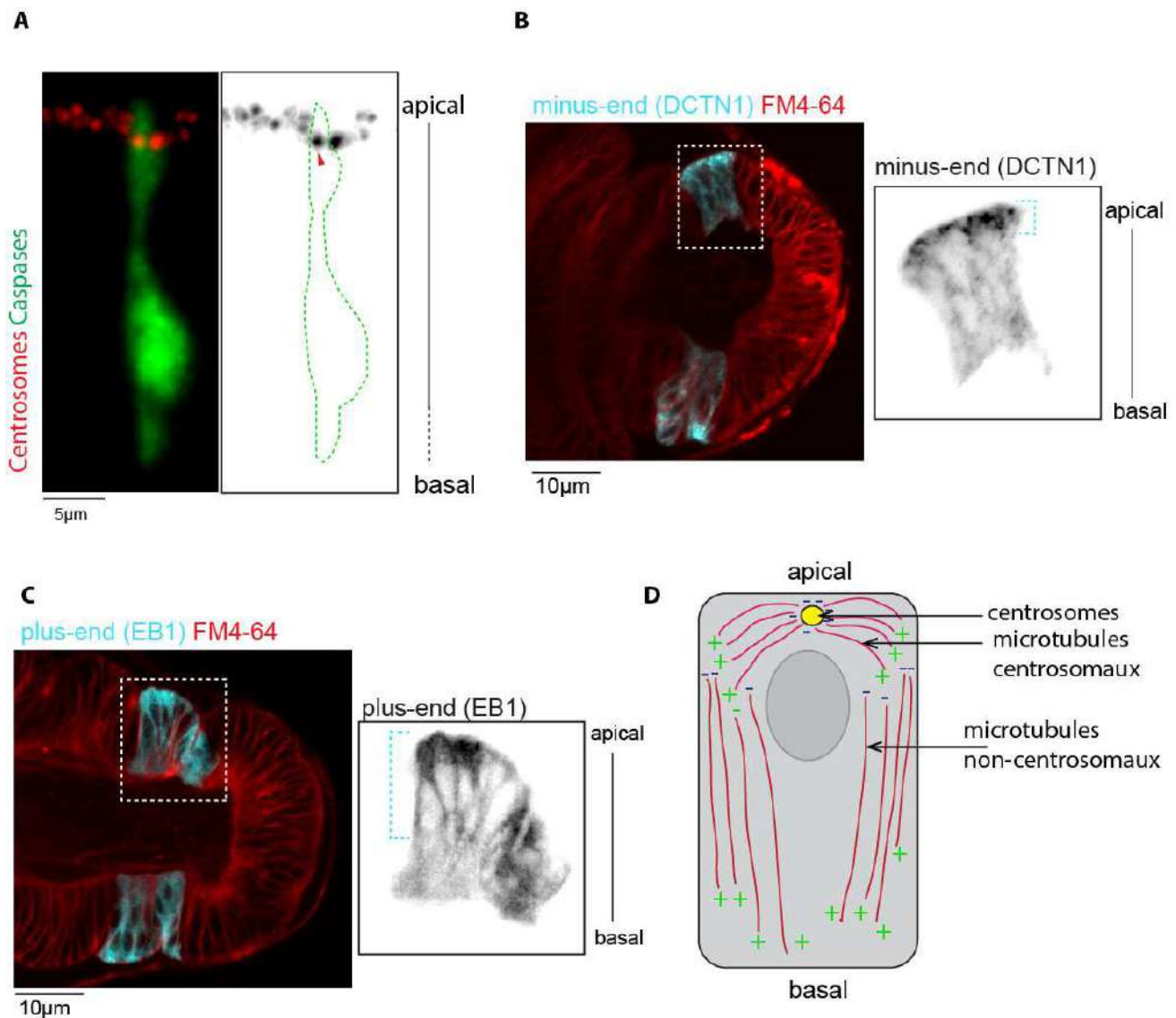


Figure 46. L'organisation des microtubules dans l'épithélium de patte.

(A) Présence subapicale des centrosomes (Asterless en rouge) dans les cellules non mourantes (non marquées) et dans les cellules apoptotiques (vert). **(B-C)** Vue sagittale de disques de pattes de drosophile. Les membranes sont marquées en rouge par le FM4-64 et le carré en pointillé correspond à la zone grossie à droite. **(B)** Le complexe Dynactine est visualisé par DCTN1-GFP, il marque l'extrémité négative des microtubules (cyan). **(C)** Le régulateur EB1 des microtubules fusionnés à la GFP marque les extrémités positives de ceux-ci. **(D)** Modèle représentant la polarité des microtubules des cellules de l'épithélium de la patte de la drosophile.

- (1) La présence et la localisation des centrosomes dans ce tissu grâce au marquage d'Asterless, une protéine centriolaire (Varmark et al. 2007). Ainsi j'ai pu déterminer que chaque cellule possède des centrosomes à leur pôle apical, y compris les cellules apoptotiques (**Figure 46A**).
- (2) La localisation de la Dynactine (DCTN1), une protéine connue pour s'associer à la Dynéine et donc s'enrichir à l'extrémité (-) des microtubules (Chowdhury et al. 2015, Urnavicius et al. 2015, Lloyd et al. 2012). Mes observations ont montré que DCTN1 est essentiellement concentrée en apical dans l'épithélium de patte (**Figure 46B**).
- (3) La localisation d'un régulateur des extrémité (+), EB1 (end-binding protein 1) (Nehlig et al. 2017). J'ai observé qu'EB1 est localisé en apical mais également enrichi en latéral des cellules de l'épithélium de patte (**Figure 46C**). La présence de microtubules courts (dans le plan apical) peut expliquer la présence du signal intense d'EB1 en apical (Singh et al. 2018). Au contraire, les microtubules latéraux s'étendraient vers le basal par leur extrémité (+).

Ainsi nous pouvons dessiner pour la première fois un modèle de la polarité des microtubules dans la patte de drosophile, qui reste toutefois classique (**Figure 46D**). En revanche, étant des molécules très dynamiques et ubiquitaires, leur analyse est difficile dans les cellules apoptotiques. La combinaison des marqueurs des microtubules avec l'apoptosenseur GC3Ai est difficile en temps réel, peu d'outils –RFP étant disponibles. L'identification et la description de leur dynamique spécifiquement dans les cellules apoptotiques s'avère particulièrement ardue. Je n'ai donc pas pu observer les microtubules spécifiquement dans les cellules apoptotiques. La présence d'Asterless dans les cellules apoptotiques suggère toutefois qu'ils sont toujours présents à ce stade de l'apoptose et que la polarité des microtubules, du moins centrosomaux, ne change pas.

3.3. *Un modèle qui se dessine.*

3.3.1. La relocalisation du noyau dans les cellules pas encore tout à fait mortes.

Klarsicht jouant un rôle dans le repositionnement nucléaire, deux hypothèses s'offrent à nous : (1) Klarsicht interagirait indirectement avec les microtubules par l'intermédiaire des protéines motrices, permettant un transport dirigé du noyau (**Figure 47**) ; (2) alternativement,

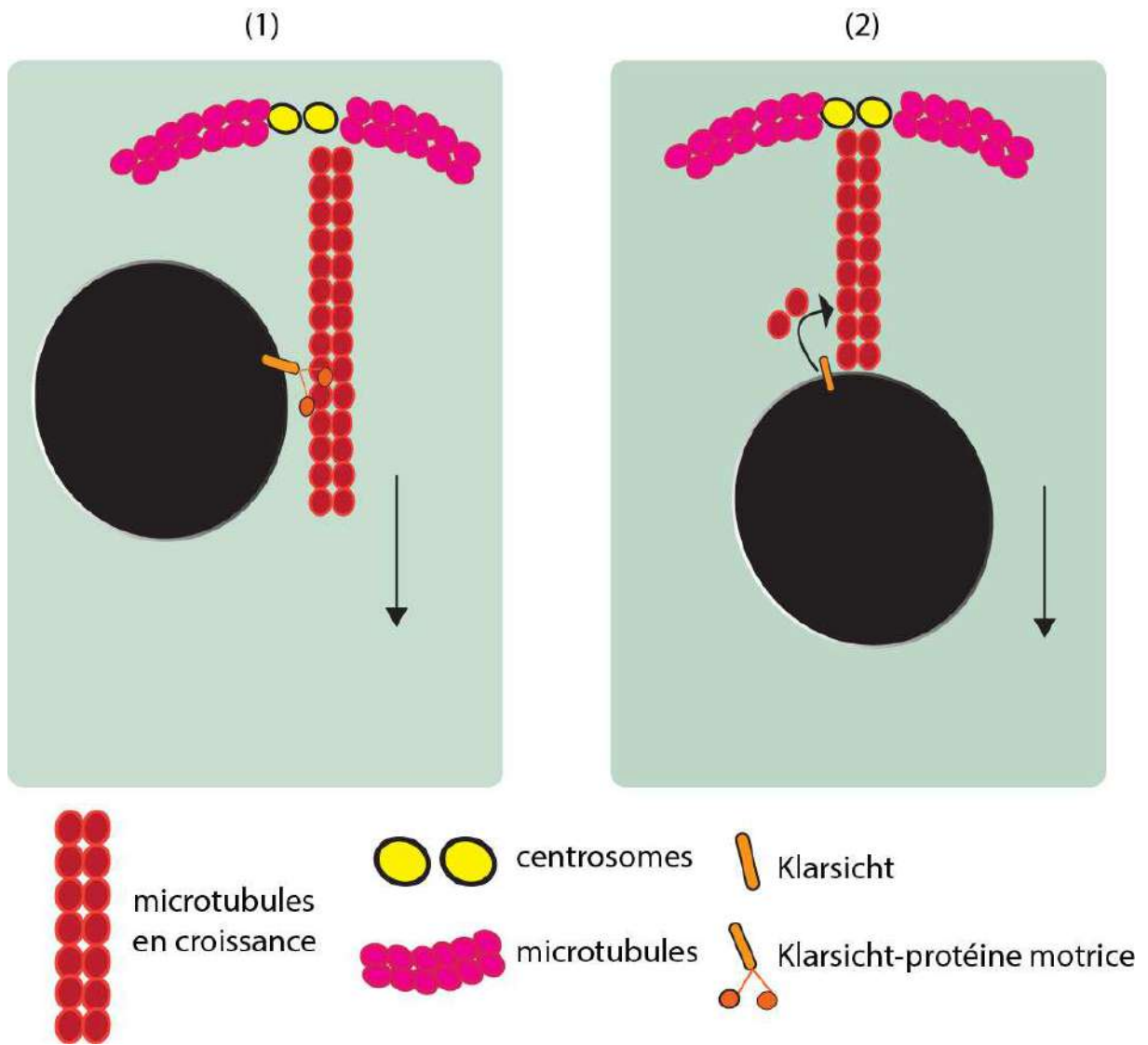


Figure 47. Hypothèse du rôle de Klarsicht dans la relocalisation du noyau des cellules apoptotiques.

(1) Liaison possible de klarsicht avec une protéine motrice le long des microtubules. **(2)** Klarsicht pourrait réguler la croissance des microtubules pour pousser le noyau vers le basal.

Klarsicht, qui a été proposé comme étant un régulateur de la polymérisation des microtubules en culture de cellules (Long et al. 2013), pourrait être localisé à l'extrémité positive des microtubules et y favoriser leur croissance afin de pousser le noyau vers le basal des cellules mourantes (**Figure 47**).

Pour tester ces hypothèses, j'ai modulé la fonction de protéines motrices. Le noyau migrant vers le basal et donc vers l'extrémité (+) des microtubules, j'ai testé la fonction de la Kinésine-1, qui réalise des mouvements antérogrades (Hirokawa et al. 1991). Elle est constituée de deux sous-unités motrices et de deux chaînes légères, codées respectivement par les gènes *Khc*, et *Klc* (Gauger and Goldstein 1993). Elle joue un rôle important dans la migration nucléaire (Meyerzon et al. 2009). La perte de fonction de ces deux constituants, *Klc* et *Khc*, donne un phénotype similaire, bien que celui provoqué par l'utilisation d'une lignée ARN interférant (ARNi) contre *Klc* soit plus important (**Figure 48A-B**). La position des noyaux apoptotiques dans ce contexte est radicalement opposée à celle du contrôle. Ils se trouvent exclusivement dans la partie apicale de l'épithélium alors qu'ils devraient être dans la partie basale (**Figure 48A-C-D**). Ce phénotype rappelle celui obtenu lors de l'inhibition de *klarsicht* (cf article 2). Ainsi Klarsicht interagirait avec Kinésine-1 pour induire le repositionnement du noyau des cellules mourantes. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que, récemment, klarsicht a été montré comme pouvant interagir directement avec Kinésine (Gaspar et al. 2014).

3.3.2. Des allers et venues en permanence dans les cellules non mourantes !

De manière intéressante, lors de l'inactivation par ARNi de *Klc*, les noyaux des cellules non apoptotiques sont encore plus apicaux que dans le contrôle, bien que légèrement. L'inhibition de *klarsicht* provoque aussi une position plus apicale des noyaux des cellules non mourantes, bien que là encore, la différence par rapport aux noyaux des cellules non apoptotiques contrôles soit ténue (voir article2). Dans les cellules non mourantes, la position des noyaux serait finement régulée pour maintenir le noyau dans la partie supérieure de l'épithélium. Cependant le mécanisme requis reste flou.

La Dynéine est un moteur qui transporte des cargos dans le sens inverse de la Kinésine, c'est-à-dire vers le (-). J'ai testé la fonction de DCTN1 (ou p150), une protéine appartenant au

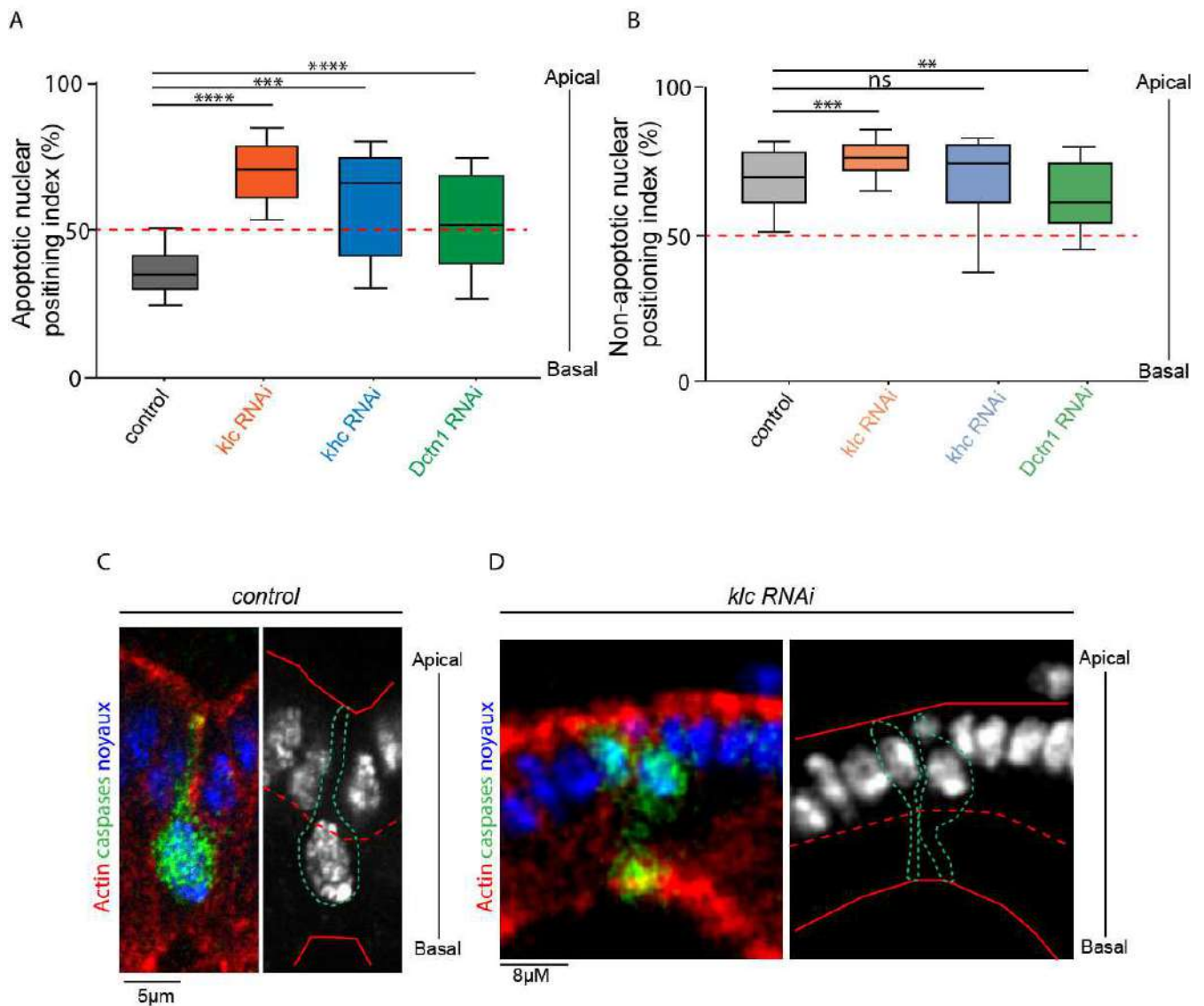


Figure 48. Les protéines motrices sont requises pour la localisation des noyaux dans l'épithélium de patte.

(A) Position des noyaux apoptotiques dans l'épithélium de patte. 100% correspond à l'apical de l'épithélium alors que 0% correspond au basal. Les médianes sont : contrôle=36%, *Klc*=70,5%, *Khc*=66%, *DCTN1*=52%. Test statistique Mann-Whitney Pvalue <0.0001 pour ****, Pvalue 0.0003 pour ***. **(B)** Position des noyaux non-apoptotiques dans l'épithélium de patte. Les médianes sont : contrôle=77%, *Klc*=77%, *Khc*=75%, *DCTN1*=62%. Test statistique Mann-Whitney Pvalue 0.0017 pour **, Pvalue 0.0001 pour *** et n.s pour non significatif. **(C-D)** Position des noyaux (bleu et blanc) dans les cellules apoptotiques (vert) dans l'épithélium de patte. A droite, les cellules sont représentées en pointillés verts, l'apical et le basal par une ligne rouge et le milieu de l'épithélium par une ligne discontinue rouge. Contrairement au cas contrôle (C) La perte de fonction de *Klc* la relocalisation nucléaire basale dans les cellules apoptotiques (D).

complexe Dynactine. C'est un cofacteur essentiel à l'activité de la Dynéine qui, par exemple, permet l'augmentation du flux de déplacement de la Dynéine le long des microtubules lors du transport axonal (Moughamian and Holzbaur 2012). Dynactine est aussi requise pour le positionnement correct du noyau des photorécepteurs de la Drosophile et du poisson zèbre (Whited et al. 2004, Tsujikawa et al. 2007). Dans l'épithélium de patte, son inhibition provoque un positionnement nucléaire plutôt médian dans les cellules apoptotiques et non-apoptotiques (**Figure 48A-B**). Les phénotypes de perte de fonction de *Klaroid* et de *lamine* par ARNi (voir article 2) sont similaires à celui causé par la perte de fonction de DCTN1 ARNi. Ces résultats suggèrent alors un rôle général de la Dynéine dépendant du LINC dans le positionnement nucléaire de ce tissu.

3.4. Conclusion.

Bien qu'encore spéculatif, l'ensemble de mes résultats permet de proposer un premier modèle de la régulation de la position des noyaux non seulement dans les cellules apoptotiques mais également dans les autres cellules de l'épithélium de patte : la position apicale des noyaux dans cet épithélium serait régulée par une balance entre le mouvement rétrograde (vers le (-)) et antérograde (vers le (+)). D'une part Klarsicht, par l'intermédiaire de son interaction avec Kinésine, permettrait le déplacement vers le basal ; d'autre part le complexe Dynéine/DCTN1 pourrait assurer le mouvement vers l'apical. Ainsi, c'est l'équilibre entre les deux déplacements qui permettrait au noyau de maintenir sa position dans la partie supérieure de l'épithélium. Puis lors de l'apoptose, il pourrait y avoir un signal apoptotique provoquant une rupture de cet équilibre, favorisant la migration antérograde par le couplage Klarsicht/Kinésine (**Figure 49**). Le noyau, relocalisé au basal, pourrait ainsi assurer sa fonction de résistance nécessaire à la génération de la force apico-basale.

Pour conclure sur cette partie des résultats, mon travail a permis d'identifier une nouvelle étape de l'apoptose, faisant intervenir le LINC, les protéines motrices et les microtubules. Ces derniers, qui étaient jusque-là supposés être démantelés lors des premières phases de l'apoptose, se trouvent en fait être particulièrement importants au tout début de la phase d'exécution. Cette étape pourrait être la toute première étape du suicide cellulaire.

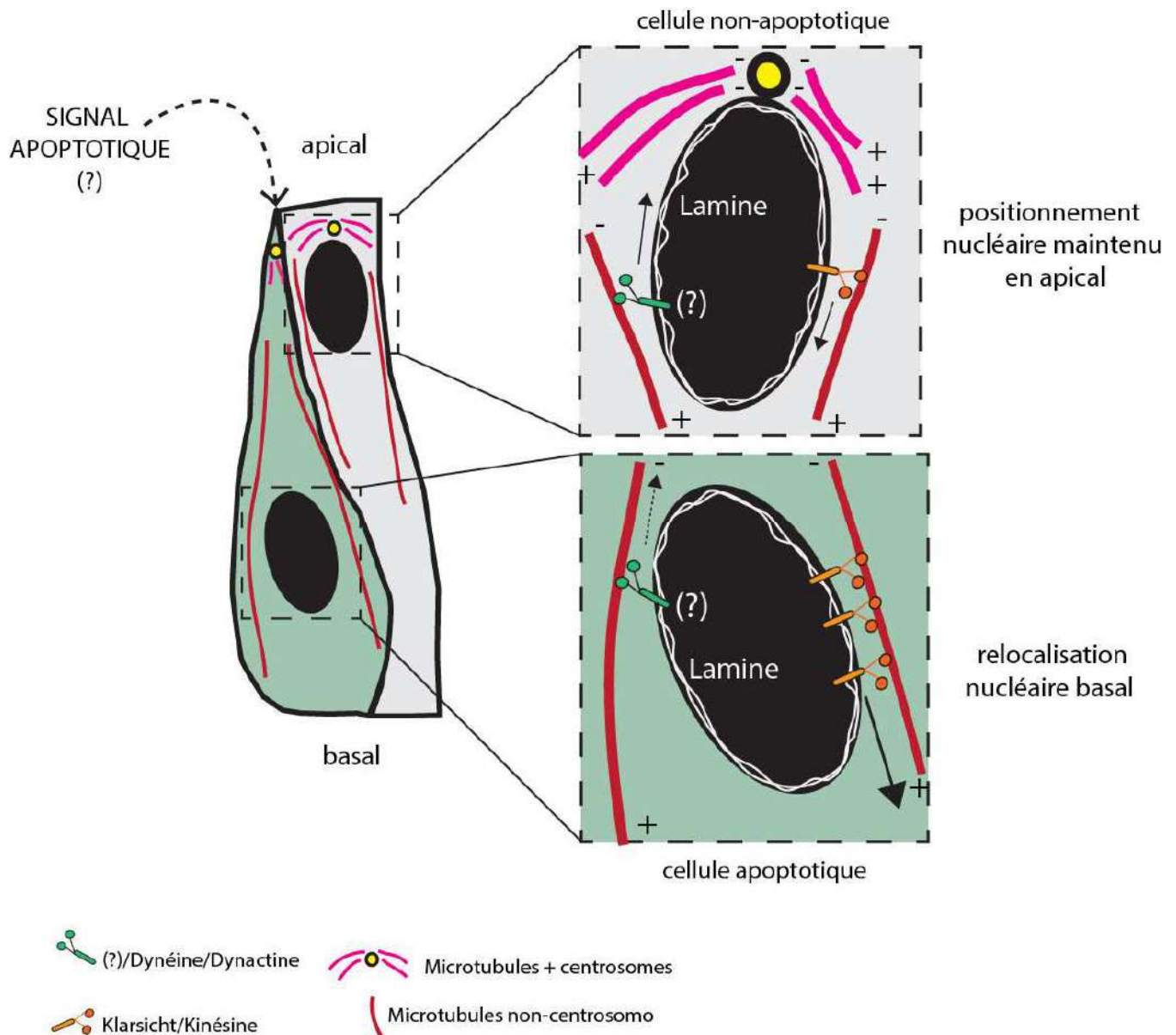


Figure 49. Modèle spéculatif de la régulation du positionnement nucléaire.

Les flèches indiquent le sens de migration du noyau. Dans la cellule apoptotique (vert), par simplicité plusieurs molécule de Klarsicht/kinésines ont été dessinées ainsi qu'une flèche plus grosse, montrant la migration basale du noyau. Au contraire, une flèche en pointillé indique la faible migration des noyaux vers l'apical. Les (+/-) précise la polarité des microtubules. Les (?) soulignent les inconnues du modèle.

IV. Une fin en mille morceaux !

La phase terminale de l'apoptose consiste à former des petits fragments de cellule bien délimités qui seront ensuite éliminés. Il est indispensable que les corps apoptotiques soient bien hermétiques car l'inverse provoquerait une réaction inflammatoire. Notamment, l'ADN est immunogène à l'extérieur des cellules. Par conséquent, ce processus doit être hautement régulé. Pour cela, le noyau va subir de nombreuses transformations aux conséquences dramatiques. La condensation et la fragmentation de l'ADN, des caractéristiques du suicide cellulaire, ont été très étudiées. En revanche peu de choses sont connues sur le mécanisme de désintégration du noyau. Une étude a toutefois montré que la désintégration du noyau nécessite un affaiblissement du nucléosquelette de lamine et la génération d'une force par l'acto-myosine. La diminution de la lamine ne suffit en effet pas à fragmenter le noyau et inversement, l'acto-myosine n'est pas suffisante. Il est impératif d'avoir ces deux composantes pour que le noyau soit complètement désintégré (Croft et al. 2005). Le mécanisme précis de la fragmentation nucléaire dépendante de l'acto-myosine n'a cependant jamais été décrit. Aucune donnée ne montre la dynamique *in vivo* de l'acto-myosine nucléaire à ce stade de l'apoptose.

La connexion avec le câble de myosine, précédemment décrite dans la cellule apoptotique, pourrait servir à démanteler le noyau. D'autant plus que des travaux réalisés dans l'équipe vont dans cette direction. Ils suggèrent que la force apico-basale est requise pour la fragmentation correcte de la cellule. En effet, l'absence d'ancrage basal par un ARNi contre Taline, perturbant la transmission de la force, induit une mauvaise fragmentation de la cellule. Les fragments formés sont plus volumineux que la normale (thèse d'Arnaud Ambrosini). La fragmentation nucléaire et cellulaire pourrait donc être la conséquence finale de cette force générée par le câble de myosine.

Dans cette partie je vais vous présenter les quelques résultats descriptifs que j'ai obtenus qui suggèrent un rôle de l'acto-myosine au cours de la fragmentation et plus précisément lors de la fragmentation du noyau.

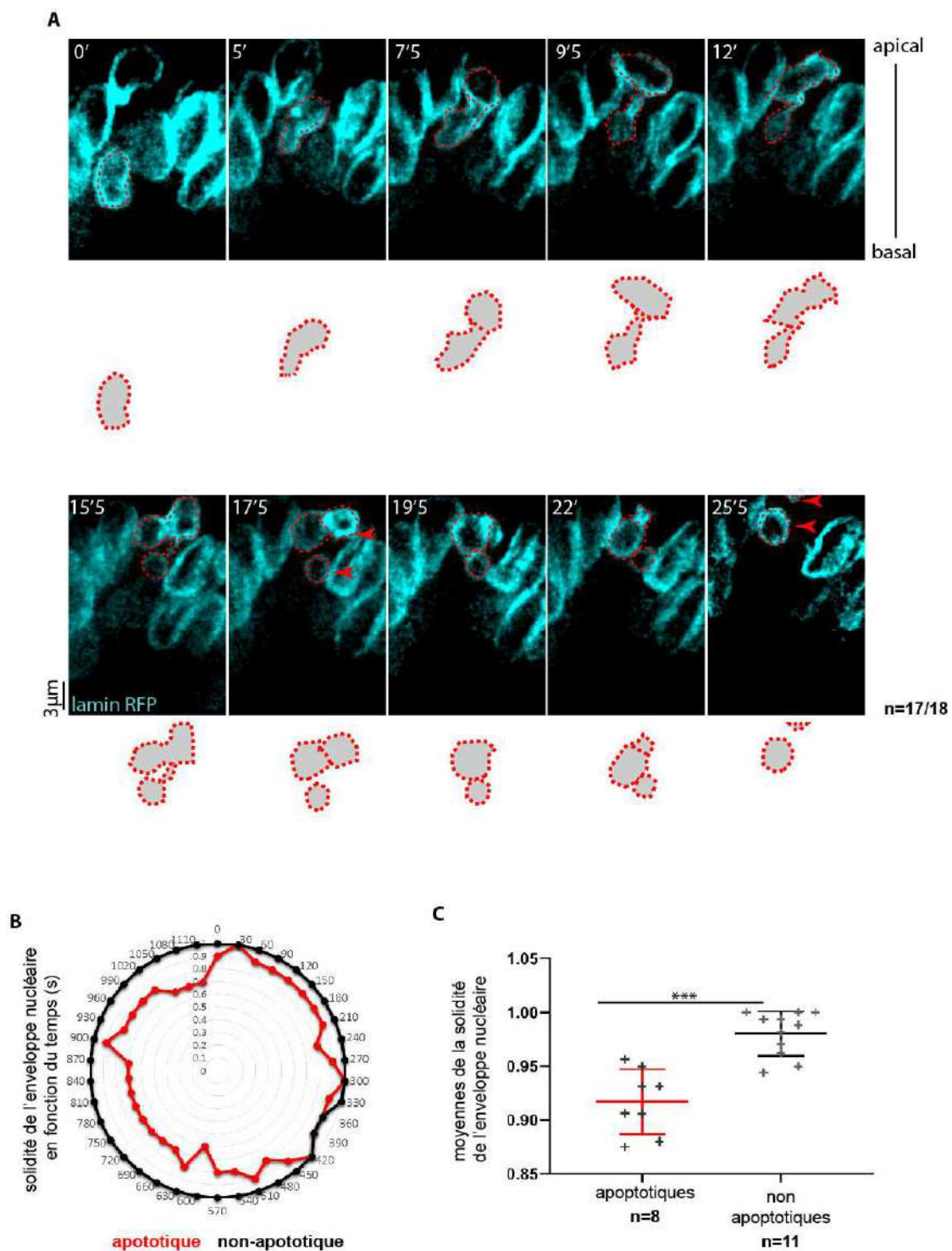


Figure 50. La dynamique de l'enveloppe nucléaire au cours des phases tardives de l'apoptose.

(A) Séquences d'images montrant les changements de formes du noyau (cyan) dans le temps. L'enveloppe nucléaire est marquée par la lamine-RFP (B) Graphique radar représentant un exemple de dynamique de l'enveloppe nucléaire (analyses toutes les 30 secondes durant 30 minutes). La solidité moyenne est représentée pour un noyau apoptotique (rouge) et pour un noyau non-apoptotique (noir). (C) Solidité moyenne des noyaux. Mann-Whitney pvalue 0.0007 pour ***.

4.1. *La dernière danse : la dynamique de l'enveloppe nucléaire lors des phases tardives de l'apoptose.*

Les évènements chronologiques des cellules mourantes ont rarement été visualisés en temps réel sur du tissu vivant. L'outil GC3Ai, nous a permis de suivre toutes les étapes morphologiques de la fin de vie d'une cellule, des étapes précoces jusqu'à sa destruction (Schott et al. 2017). Ainsi j'ai pu observer, grâce à cet outil et aux marquages RFP de la lamine, que le noyau adopte un comportement peu commun. D'une part il va se déformer très localement et remonter suite à la contraction du câble de myosine, d'autre part, la lamine est légèrement diminuée et réorganisée lors de l'apoptose (cf article 2). Enfin, l'enveloppe nucléaire va subir des déformations drastiques au cours des phases finales de sa remontée. Ces évènements pourraient s'apparenter à du « blebbing » aboutissant à la formation de fragments nucléaires (**Figure 50A**). J'ai apprécié cette dynamique grâce à une résolution temporelle élevée, ce qui m'a permis de quantifier les mouvements de déformation de l'enveloppe nucléaire. J'ai cherché à les quantifier en mesurant la circularité des noyaux des cellules apoptotiques en fonction du temps comparée à celle des noyaux non apoptotiques. Le problème avec cette méthode est que la forme des noyaux normaux n'est pas vraiment circulaire mais plutôt ovoïde. Ainsi, rien de pertinent n'a pu être révélé par l'analyse de ce paramètre. J'ai donc cherché une autre méthode pour étudier les déformations de l'enveloppe nucléaire dans le temps. La « solidité » me semble être un paramètre à exploiter. Il permet de mesurer la forme d'un objet en mesurant les surfaces convexes de cet objet (*la méthode est décrite dans la partie matériel et méthode du manuscrit*). Ainsi, il apparaît que la forme des noyaux non-apoptotiques change peu (elle est « solide » dans le temps) comparée à celle des noyaux apoptotiques qui change énormément au cours du temps (elle est peu « solide » dans le temps) (**Figure 50B-C**). Ces données suggèrent que le noyau des cellules mourantes doit subir une sorte de « blebbing » pour se fragmenter en plusieurs morceaux.

De plus, cette déformabilité nucléaire semble corrélée avec la fragmentation de la cellule. En effet, quand le noyau atteint le pôle apical de la cellule, il se fragmente de manière concomitante à la cellule (**Figure 51**). À la fin du processus, les fragments se séparent et s'éparpillent dans le but d'être éliminés.

Finalement, cette déformabilité du noyau est-elle une conséquence de la force apico-basale ? Ou est-ce un système indépendant ? La partie qui suit pourrait nous donner une piste.

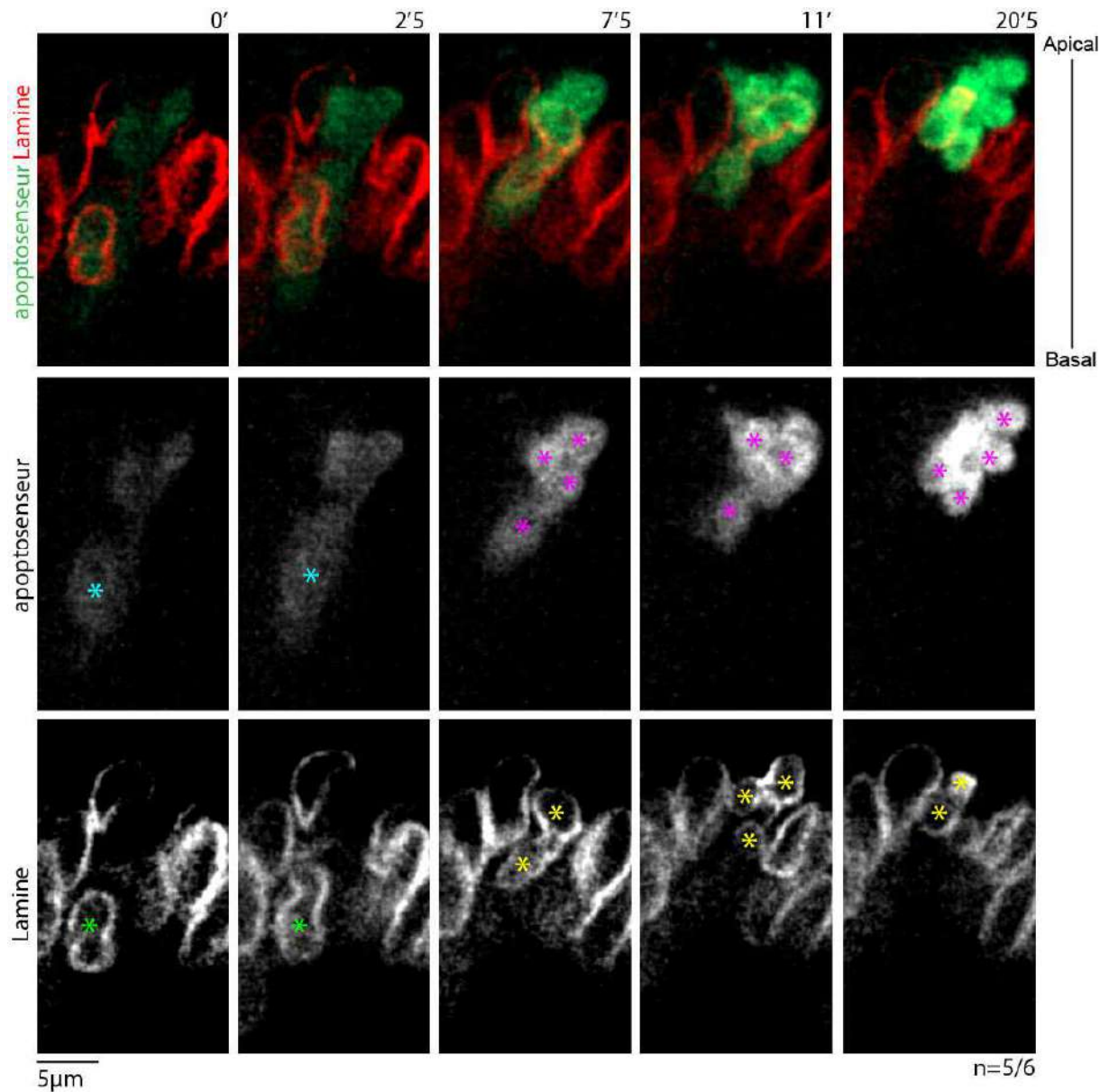


Figure 51. La dynamique de la cellule mourante lors des phases tardives.

Séquences d'images tirées du film de la figure précédente montrant la cellule apoptotique en vert et l'enveloppe nucléaire en rouge. Les astérisques blancs et verts indiquent la cellule et le noyau respectivement. Les cyans et jaunes indiquent la formation des fragments.

4.2. *Un réseau destructeur d'acto-myosine péri- et intranucléaire.*

La présence de l'actine dans le noyau a été mise en évidence il y a bien longtemps mais elle a souvent été controversée. Aujourd'hui, des fonctions nucléaires de l'actine monomérique et filamenteuse sont admises. L'actine peut influencer l'expression des gènes, intervenir lors de la réparation de l'ADN après dommage, jouer un rôle structural ou encore maintenir l'intégrité du génome (Virtanen and Vartiainen 2017). Quelques études ont aussi montré que la présence d'actine dans le noyau peut être associée à l'apoptose. En effet, l'induction de l'apoptose, par des drogues, dans des cellules cancéreuses en culture provoque l'accumulation d'actine dans le noyau (Grzanka 2001, Grzanka, Gagat and Izdebska 2013), suggérant un rôle potentiel de l'actine dans ce processus. Des accumulations d'actine sont notamment localisées à proximité d'une chromatine très compacte, suggérant qu'elle est impliquée dans le remodelage de la chromatine lors de l'apoptose (Grzanka, Grzanka and Orlikowska 2003). Il faut toutefois rester prudent car la mort est induite ici dans des cellules anormales qui peuvent avoir un noyau plus perméable et déformé (Zink, Fischer and Nickerson 2004, Takaki et al. 2017). L'article de Daniel Croft, lui, montre clairement que la fragmentation du noyau nécessite de l'acto-myosine (Croft et al. 2005). Cependant aucune corrélation entre la présence de l'actine dans le noyau et le moment de la fragmentation n'a été observée. De plus, à ce jour il semble qu'aucune étude n'ait montré la présence de myosine dans le noyau.

Lors de mes expériences de co-marquage d'actine et de myosine, j'ai pu révéler dans les cellules apoptotiques une organisation très surprenante d'acto-myosine. Des images de haute résolution montrent la présence d'un réseau très dense de filaments d'acto-myosine autour et à l'intérieur du noyau (**Figure 52A**). Ce réseau atypique semble être le prolongement du câble de myosine. De plus, j'ai pu apercevoir de façon préliminaire mais intéressante, une zone de chromatine compacte à proximité des filaments d'actine qui sont comme enroulés autour de cette grosse accumulation d'ADN condensé (**Figure 52B**).

Cette observation étonnante met en évidence des filaments d'actine et de myosine pénétrant et envahissant le noyau lors de l'apoptose et qui pourraient servir *in fine* à fragmenter le noyau.

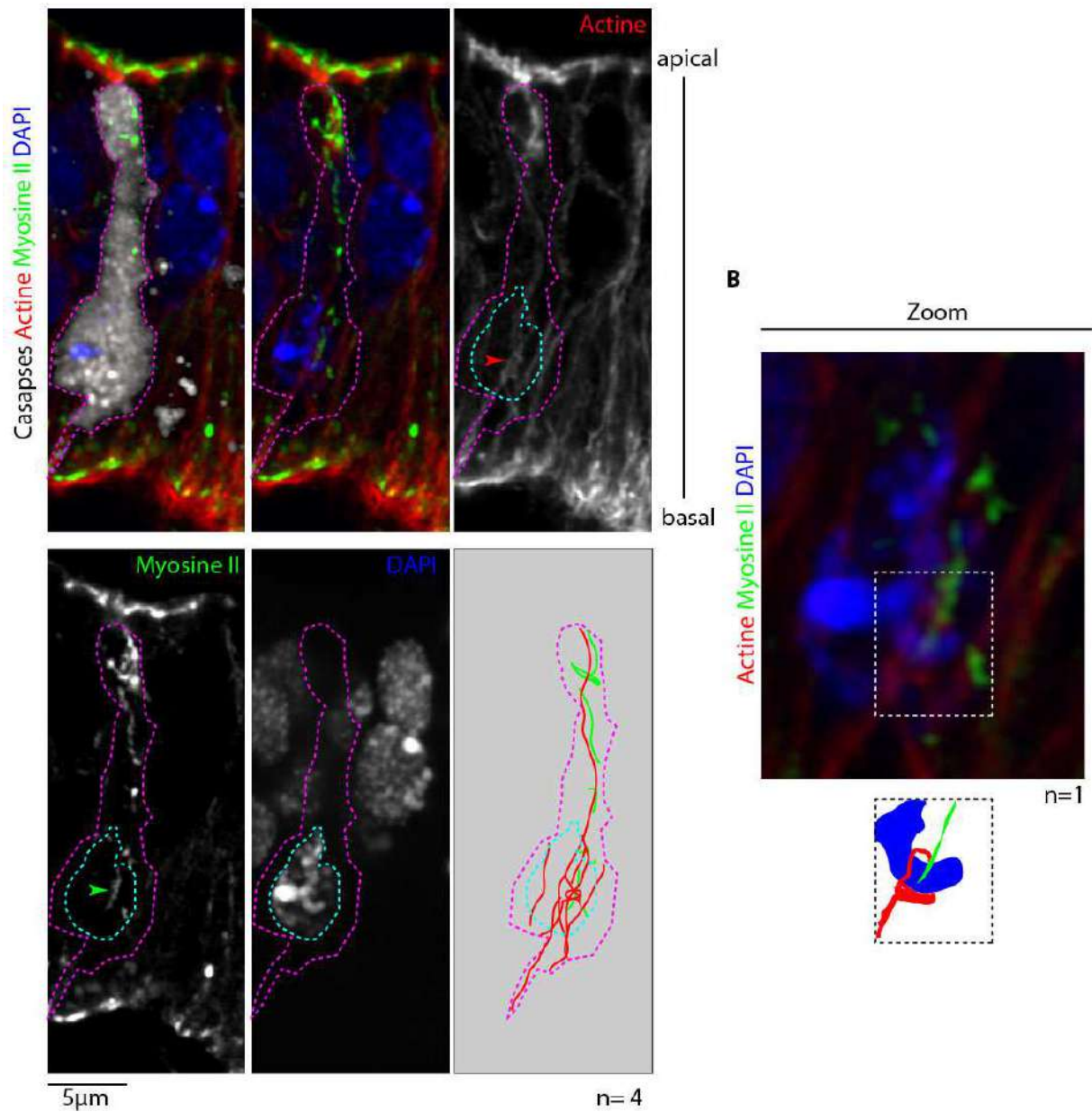
A

Figure 52. Un réseau d'acto-myosine autour et dans le noyau mourant.

(A) Vue sagittale d'une cellule apoptotique marquée en blanc, traversée par une structure d'actine (rouge) et de myosine (vert). Le noyau est marqué par le DAPI en bleu. La cellule mourante est dessinée en pointillé rose et le contour du noyau en pointillé bleu clair. La tête de flèche rouge montre des fibres d'actine dans le noyau et la verte pointe vers une structure de myosine à l'intérieur du noyau également. Ces images correspondent à un seul plan focal, passant par le centre du noyau. Elles ont été acquises avec le module airyscan du confocal. En bas à droite, schéma de la cellule apoptotique et de l'acto-myosine de celle-ci. **(B)** Cette image est agrandissement du noyau montré en (A). Le cadre en pointillé représente à la zone dessinée en dessous et montrant de l'ADN compact (bleu) associé à de l'acto-myosine.

4.3. *Conclusion.*

Mis ensemble, ces résultats suggèrent que l'enveloppe nucléaire doit pouvoir se déformer afin de former des fragments hermétiques. La présence d'acto-myosine nucléaire au cours de la mort cellulaire pourrait jouer un rôle pour la fragmentation du noyau, processus conservé au cours de l'évolution.

CONCLUSION ET

DISCUSSION

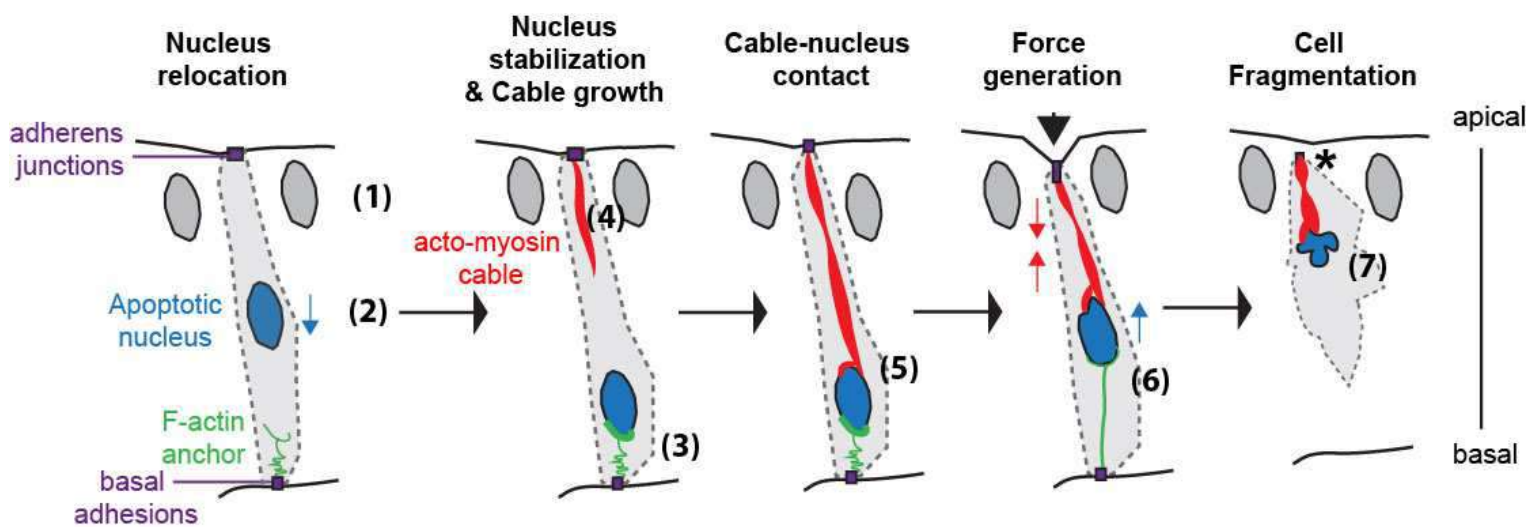


Figure 53. Un modèle de génération de forces apico-basales et de dynamique apoptotique.

Ce schéma synthétise mes résultats et pointe les inconnues du modèle de la génération des forces apico-basales apoptotiques et de la dynamique des cellules apoptotiques.

1 : Positionnement apical des noyaux de la patte dépendant de l'action de Dynéine et de Kinésine.

Comment l'équilibre d'activité de ces protéines motrices est-il régulé ?

2 : Relocalisation active des noyaux apoptotiques dépendante de Klarsicht et de la Kinésine.

Par quel signal le noyau apoptotique est-il relocalisé au basal ? Comment impacte-t-il sur l'activité de ces molécules ?

3 : Ancrage basal du noyau apoptotique par un réseau d'actine relié aux adhérences basales.

Comment l'actine s'ancre-t-elle au noyau ?

4 : Croissance du câble du pole apical vers le noyau basal.

Comment la formation du câble est-elle régulée ?

5 : Ancrage physique du câble au noyau apoptotique.

Quelle est la nature du lien physique entre le câble de myosine et le noyau ?

6 : Force exercée et transmise grâce à la résistance offerte par le noyau à la contraction du câble.

Comment le noyau offre-t-il un point de résistance solide ?

7 : Le noyau bourgeonne lors de la fragmentation.

Mon sujet de thèse avait pour but d'une part d'identifier les mécanismes précis de la force apico-basale générée par les cellules apoptotiques, afin d'élargir nos connaissances sur les forces physiques importantes pour la morphogenèse épithéliale ; d'autre part d'analyser la dynamique des cellules apoptotiques *in vivo* dans l'objectif de mieux comprendre leur comportement au sein d'un épithélium. Les résultats obtenus au cours de ma thèse (**Figure 53**), fournissent une solide avancée sur la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la génération d'une force apico-basale. Ils mettent notamment en lumière un nouveau rôle mécanique du noyau. Enfin, ils apportent également des nouvelles pistes pour mieux comprendre le comportement des cellules apoptotiques au sein d'un tissu. Cependant, il reste un certain nombre de zones d'ombre que j'aimerais discuter ci-dessous (**Figure 53**).

I. C'est trop dense ! Qui est à qui ?

L'une des limites de ma thèse a été de vouloir visualiser des molécules ubiquitaires uniquement dans la cellule mourante. C'était un vrai défi, car les microtubules, l'actine et les noyaux sont présents dans toutes les cellules de l'épithélium. Il a donc été difficile de détecter une dynamique particulière de chacun d'entre eux, spécifiquement dans les cellules apoptotiques. Il serait vraiment intéressant de réfléchir à des stratégies de biologie moléculaire qui pourrait permettre de visualiser ces différentes molécules seulement dans les cellules apoptotiques et ainsi de faciliter l'analyse.

Dernièrement, une équipe de recherche a généré un outil, le Drice-based sensor (DBS), qui permet la visualisation du noyau dans les cellules apoptotiques. Cette construction inclut une GFP fusionnée à une histone initialement adressée à la membrane plasmique grâce à un domaine transmembranaire (CD8). Bien qu'essentiellement enrichie au niveau de la membrane apicale, la GFP marque aussi les membranes latérales. Lorsque la cellule entre en apoptose, les caspases initiatrices vont cliver cette construction grâce à la présence d'un domaine de clivage par la caspase (Drice), ainsi la séquence de l'histone-GFP insérée dans cette construction va se relocaliser dans le noyau (Baena-Lopez et al. 2018). Cette stratégie m'a permis de réaliser des expériences d'ablation laser prouvant que le noyau est mécaniquement relié à la myosine (voir article 2). Cependant, cette construction ne me semble pas adaptée pour analyser avec précision la dynamique du noyau apoptotique. En

effet, les membranes des cellules vivantes de l'épithélium sont toujours marquées, ce qui s'avère gênant pour une analyse fine de noyau. De plus, cet outil semble être localisé seulement dans une partie du noyau. Or, pour réaliser une analyse fine du comportement ou de la forme du noyau apoptotique uniquement, il faudrait le voir en entier et éviter les pollutions environnantes. Je propose comme alternative l'utilisation de la technique du BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation, (Miller et al. 2015)). Cette technique permet normalement de visualiser l'interaction entre deux protéines, l'une étant fusionnée à l'extrémité N-terminale de la GFP et l'autre à l'extrémité C-terminale. Ainsi, si ces protéines interagissent ensemble, les deux moitiés de GFP vont s'assembler et reformer une GFP fonctionnelle. Il serait donc intéressant d'utiliser cette stratégie en couplant par exemple une partie de la GFP à une séquence NLS qui serait adressée à la membrane plasmique, par un domaine transmembranaire, puis y ajouter une séquence clivable par les caspases. Ainsi, une fois les caspases actives, la moitié de la GFP-NLS sera relocalisée dans le noyau où l'autre moitié serait fusionnée à la lamine. La GFP devenue fonctionnelle permettrait alors la visualisation spécifique de l'enveloppe nucléaire dans le noyau apoptotique (**Figure 54**). Il serait alors possible d'apprécier la dynamique du noyau au cours des différentes phases apoptotiques, notamment en réalisant un double marquage avec la myosine.

Il serait aussi nécessaire d'établir une stratégie pour visualiser l'actine et les microtubules spécifiquement dans les cellules apoptotiques. Je propose également une stratégie basée sur le BiFC. Il faudrait fusionner les microtubules ou l'Utrophine-ABD (le domaine de liaison à l'actine) à une moitié de GFP et fusionner l'autre moitié de la GFP à un site de clivable par les caspases et une séquence NLS. Cette protéine de fusion serait donc séquestrée dans le noyau des cellules vivantes et libérée dans le cytoplasme après clivage par les caspases. Ainsi, dans les cellules apoptotiques, cette moitié de la GFP étant libre pourra aller lier l'autre moitié fusionnée aux microtubules (ou à l'actine) et reconstituer une GFP fonctionnelle uniquement dans les cellules apoptotiques. Les microtubules (ou l'actine) ne seront visibles que dans la cellule mourante (**Figure 55**).

Ces différentes constructions permettraient d'analyser de manière extrêmement fine la dynamique des éléments cellulaires dans les cellules apoptotiques, requis pour l'apoptose elle-même mais également pour la force apico-basale. Ainsi, ils pourraient permettre de répondre aux différentes interrogations que je vais vous exposer dans la suite de la discussion.

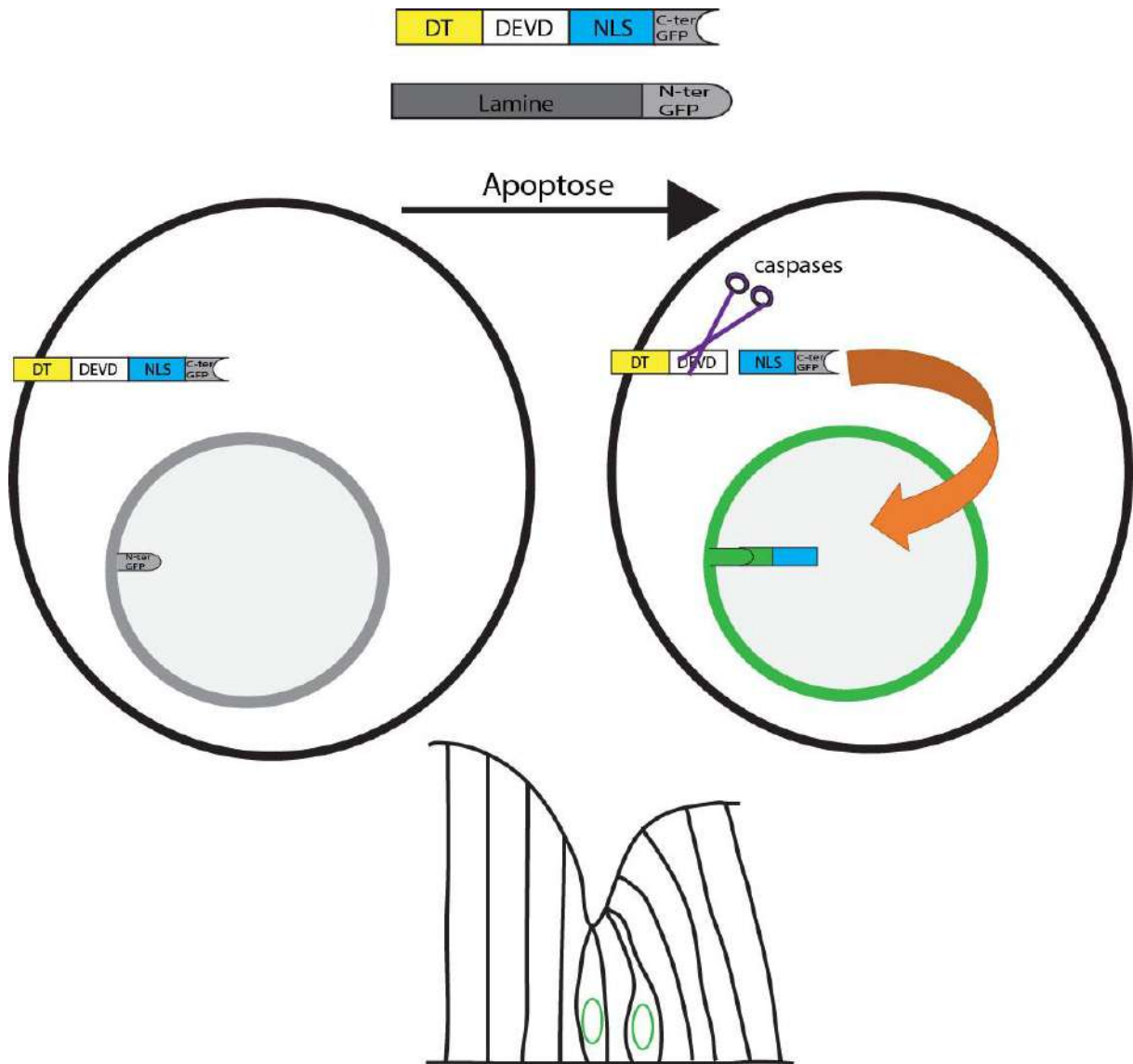


Figure 54. Un outil reposant sur le principe du BiFC pour visualiser le noyau uniquement dans les cellules apoptotiques.

DT : domaine transmembranaire, DEVD : site clivable par les caspases, NLS : « Nuclear localization signal », N-Ter : extrémité N-terminale de la GFP, C-ter : Extrémité C-terminale de la GFP.

Le domaine transmembranaire (jaune) permet de localiser l'outil (non fluorescent) à la membrane dans toutes les cellules d'un épithélium. Lors de l'apoptose les caspases (ciseaux) vont cliver le site DEVD (blanc), ainsi la partie C-terminale de la GFP (grise) est libérée et va être spécifiquement localisée dans le noyau grâce à la séquence NSL (bleu). Une fois dans le noyau, la partie C-terminale de la GFP va pouvoir s'associer à la partie N-terminale de la GFP (grise) qui est fusionnée à la Lamine (gris). Ainsi la GFP devient fonctionnelle et émet de la fluorescence (vert) spécifiquement dans le noyau des cellules mourantes.

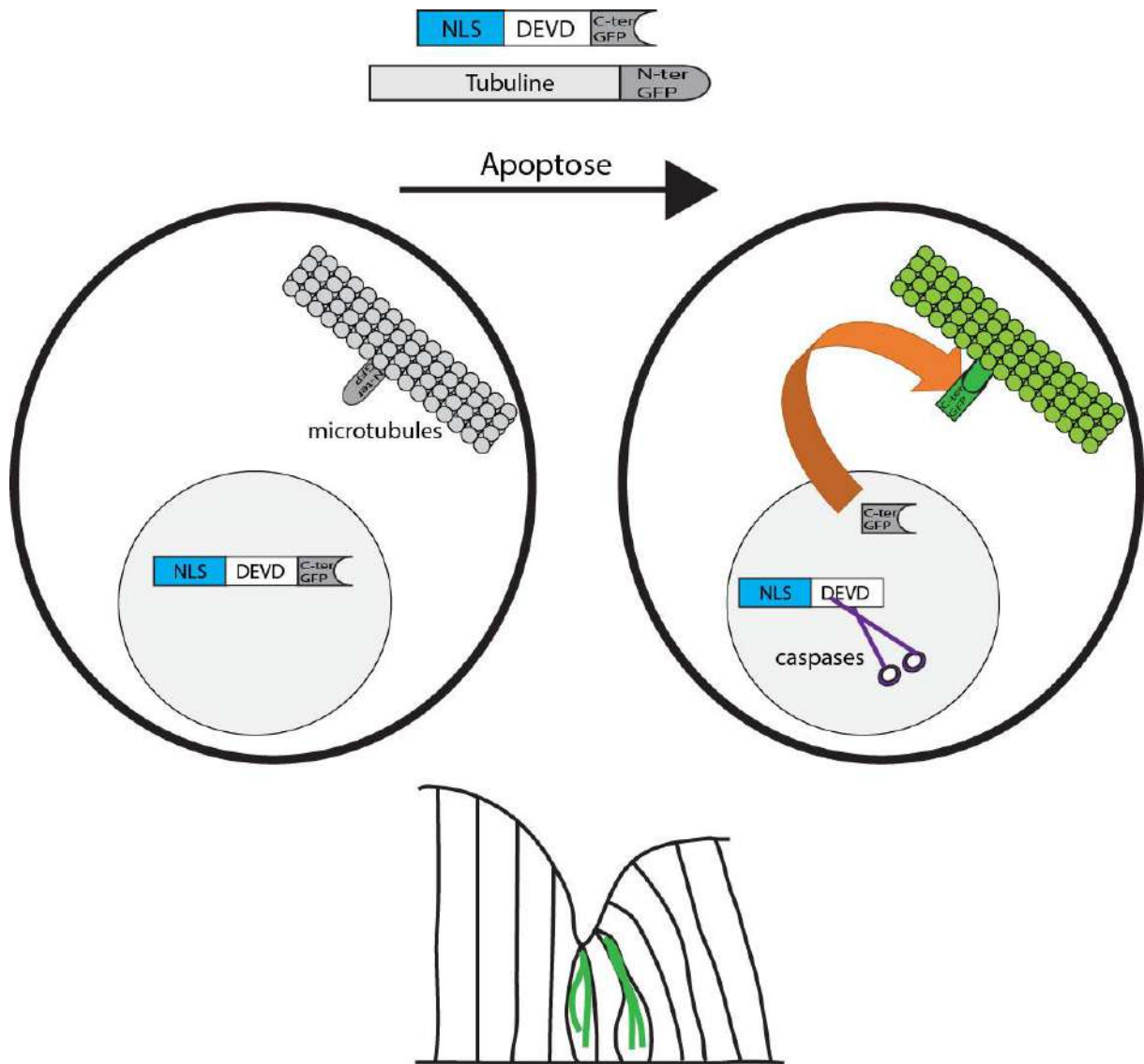


Figure 55. Un outil reposant sur le principe du BiFC pour visualiser les microtubules uniquement dans les cellules apoptotiques.

NLS : « Nuclear localization signal », DEVD : site clivable par les caspases, N-Ter : extrémité N-terminale de la GFP, C-ter : Extrémité C-terminale de la GFP.

La séquence NLS (bleue) permet de séquestrer la construction (non fluorescente) dans le noyau dans les cellules non-apoptotiques (à gauche). Dans les cellules apoptotiques (à droite), les caspases actives (ciseaux) vont entrer dans le noyau et cliver le site DEVD (blanc) de la construction, ainsi une des moitiés (C-terminale) de la GFP (grise) va être libérée dans le cytoplasme. Cette moitié de GFP va retrouver l'autre moitié de GFP (N-terminale, grise) qui est fusionnée à la Tubuline. Ainsi la GFP est reconstituée et devient fonctionnelle. Les microtubules fluorescents uniquement dans les cellules apoptotiques.

J'ai choisi de discuter les différents points que laisse mon projet dans l'ordre des étapes apoptotiques (**Figure 53**).

II. Les noyaux à la bonne place.

2.1. *Tous en haut !*

Dans l'épithélium de patte les noyaux sont toujours localisés dans la partie supérieure de l'épithélium, suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation du positionnement nucléaire. En effet, mes résultats montrent que la position du noyau serait régulée par les Kinésines et les Dynéines. Il y aurait une balance entre les deux molécules qui permettrait de maintenir le noyau dans la partie supérieure de l'épithélium. Il serait intéressant de générer une double perte de fonction des Dynéines et Kinésines et de regarder comment les noyaux se comportent dans ce contexte. Ainsi, cela pourrait nous aider à mieux comprendre la position stéréotypée des noyaux dans un épithélium.

2.2. *La descente en rappel du noyau.*

Lors de l'apoptose, le noyau est systématiquement relocalisé au basal des cellules. J'ai pu mettre en évidence que ce déplacement vers le basal implique Klarsicht et une Kinésine, deux protéines qui peuvent interagir physiquement (Gaspar et al. 2014). Mes résultats suggèrent que le déplacement vers le basal dépend de l'apoptose, cependant le signal du repositionnement nucléaire reste totalement inconnu. Il serait intéressant de déterminer si Klarsicht, Kinésines et Dynéines sont des cibles des caspases. D'après la littérature, en culture de cellules de mammifère, Kinésine est une cible des caspases, mais l'effet des caspases sur sa fonction n'a pas été identifié (Fischer et al. 2003, Machleidt et al. 1998). En revanche, chez les mammifères et le Xénope, la Dynactine et la Dynéine ont été identifiées comme inactives après clivage par les caspases (Lane et al. 2001). Ainsi, grâce à ces informations nous pouvons proposer un modèle selon lequel, dans les cellules apoptotiques, la perte de fonction du complexe Dynéine via clivage par les caspases favoriserait le transport du noyau vers l'extrémité (+) des microtubules, les kinésines restant actives. Ainsi, le noyau serait relocalisé vers le basal des cellules mourantes par une rupture de l'équilibre du transport nucléaire déclenché par l'activité des caspases (**Figure 56**). Induire massivement de la mort dans des

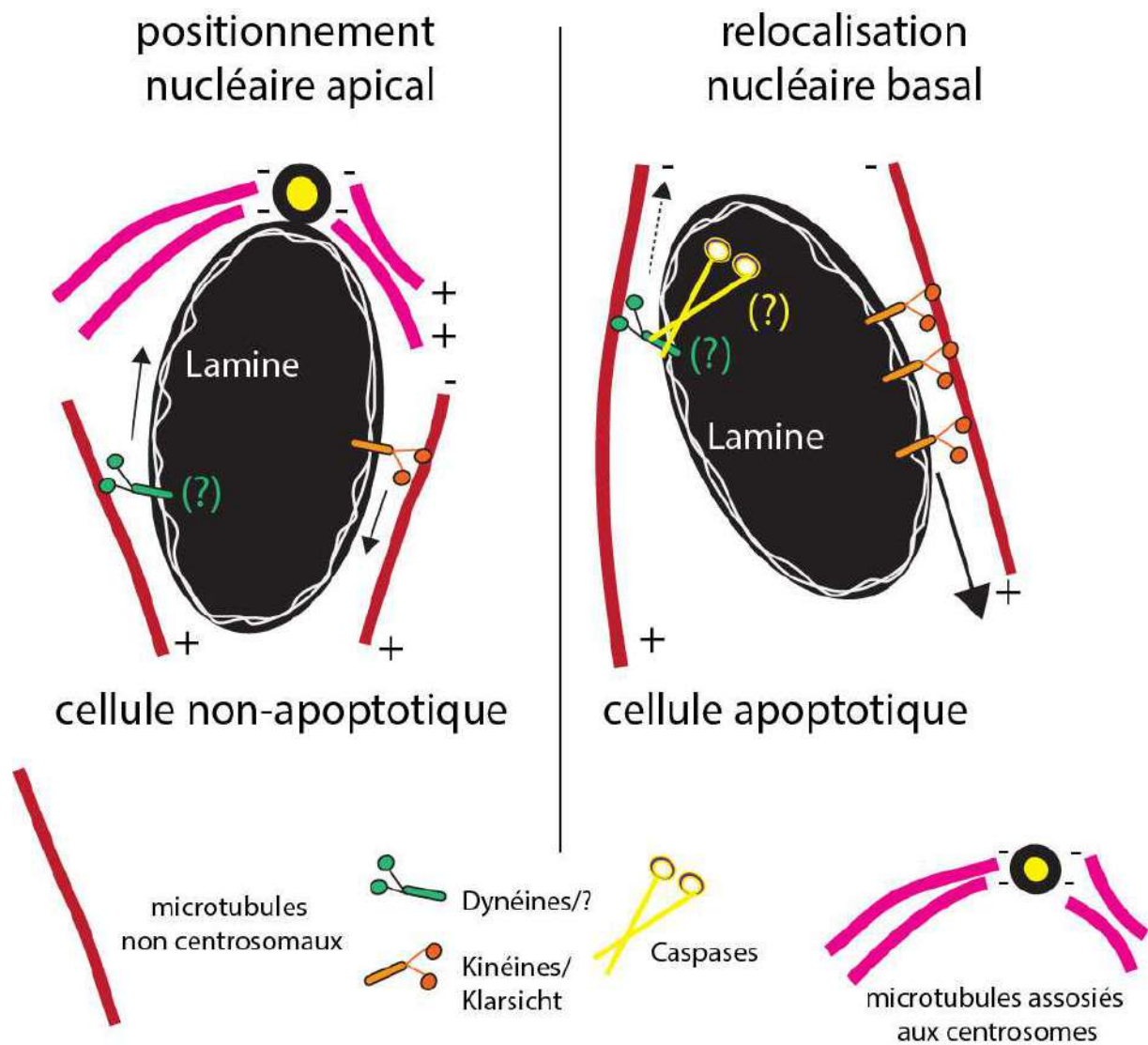


Figure 56. Hypothèse de relocalisation basale du noyau médié par les caspases.

Le schéma de gauche schématise la régulation du positionnement nucléaire dans une cellule non apoptotique. Il serait régi par une balance de déplacement vers l'apical via le complexe Dynéine (vert) et vers le basal via les Kinésines (orange), le long des microtubules non centrosomaux (rouges). Le schéma de droite représente la régulation de la relocalisation basale du noyau dans les cellules apoptotiques. Les Dynéines serait clivées par les caspases, les kinésines resteraient fonctionnelles pour relocaliser le noyau au basal.

disques d'ailes permettrait de tester le clivage par les caspases de Dynéine ou de Kinésine par un Western blot. Cette expérience nous donnerait des pistes sur la régulation de la relocalisation du noyau dans les cellules apoptotiques.

Il serait également très intéressant de suivre la dynamique en temps réel des microtubules spécifiquement dans les cellules apoptotiques afin de déterminer s'ils ont une dynamique particulière dans ce contexte cellulaire, notamment lors de la relocalisation du noyau. C'est d'autant plus intéressant car dans certains types de cellule, ils sont connus pour être démantelés dans les phases précoces de l'apoptose et reformés dans les étapes tardives (Moss & Lane, 2006). Il faudrait aussi analyser les conséquences d'une perte de fonction des microtubules (chimique ou génétique) sur la dynamique apoptotique, notamment celles sur du noyau. En effet, les microtubules n'ont à ce jour jamais été observés dans des cellules apoptotiques de manière intégrée dans un épithélium chez un organisme modèle.

Ainsi, réaliser ces différentes expériences pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la localisation des noyaux dans un épithélium, et en particulier celui des noyaux apoptotiques. Ces expériences pourraient permettre également de revisiter le rôle des microtubules lors de l'apoptose, notamment lors des phases précoces. Etant donné l'importance de Kinésine, les microtubules semblent être impliqués dans la relocalisation du noyau qui pourrait être la première étape de l'apoptose. De plus, ce mécanisme de relocalisation nucléaire dans les cellules apoptotiques ne semble pas être une étape réservée à l'apoptose morphogénétique. En effet, l'induction ectopique de l'apoptose dans des disques d'aile, a permis de détecter que le noyau est localisé au basal des cellules apoptotiques (Baena-Lopez et al. 2018), ce qui n'est pas le cas dans les cellules non apoptotiques.

III. Les mystères de la force apico-basale générée par les cellules mourantes.

Mon travail en collaboration avec Arnaud Ambrosini a permis de mettre en évidence la machinerie cellulaire nécessaire à la génération d'une force apico-basale par les cellules apoptotiques, lors de la morphogenèse de la patte de la drosophile. Ce nouveau mécanisme de génération de force implique la croissance d'un câble de myosine depuis les jonctions adhérentes jusqu'au noyau. Cependant, la régulation de la croissance du câble n'est pas

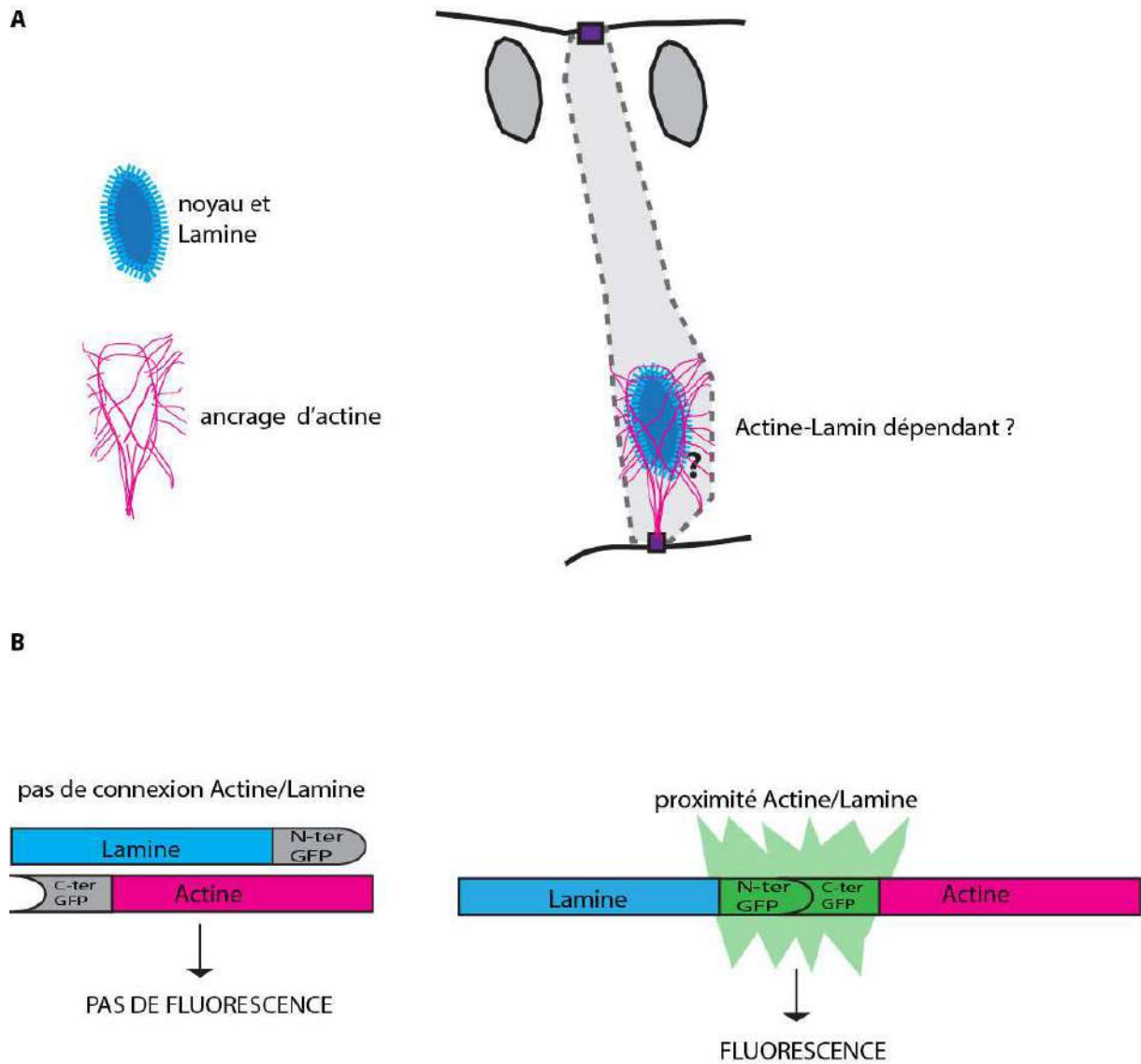


Figure 57. Le mécanisme d'ancrage basal de noyau.

(A) Organisation potentielle de l'ancrage nucléaire via un réseau d'actine. **(B)** Stratégie utilisant le BiFC pour tester l'interaction actine-lamine. Une moitié de la GFP est liée à l'actine l'autre extrémité est liée à la lamine. S'il y a interaction, ce qui nécessite *de facto* une proximité des deux membres du complexe, elle sera détectée par la fluorescence émise par la reconstitution du fluorophore.

connue à ce jour. Le noyau est au préalable systématiquement relocalisé par un couplage entre Klarsicht et une Kinésine, possiblement via un déplacement le long des microtubules. Ensuite, ce noyau va être ancré au pôle basal de la cellule mourante via l'actine et les attaches basales, afin de servir de point d'ancrage basal au câble de myosine. La relocalisation et l'ancrage du noyau sont essentiels à la génération d'une force efficace capable de déformer la surface apicale de l'épithélium. En effet, une mauvaise position du noyau entraîne un défaut de morphogénèse. Ainsi, nous avons identifié un nouveau rôle non-génomique du noyau. Dans ce contexte, le noyau jouerait un rôle essentiellement mécanique, notamment grâce à ses propriétés physiques. Il aurait la capacité de résister à la contraction du câble de myosine afin de générer la force apico-basale au niveau cellulaire.

3.1. *Par quel mécanisme le noyau est-il ancré au basal ?*

Une fois le noyau localisé basalement, nous avons mis en évidence qu'il est ancré par un réseau d'actine relié aux attaches basales. Cependant, la formation et l'organisation exacte du réseau d'actine reste floues. Une donnée préliminaire intéressante suggère que l'ancrage du noyau apoptotique ne pourrait ne pas être régi par le complexe LINC. En effet, il semble être démantelé à ce stade. En effet, j'ai pu observer que Klaoroïde après la relocalisation du noyau n'est plus visible à l'enveloppe nucléaire mais plus diffus dans le noyau, suggérant qu'à ce stade le LINC pourrait être démantelé. Le couplage physique du noyau au cytosquelette d'actine en absence du LINC a déjà été rapporté dans un autre contexte. Dans les cellules nourricières de la chambre ovarienne de drosophile, le noyau est maintenu à distance des canaux excréteurs par un mécanisme indépendant du LINC, ceci afin de garantir le déversement de leur contenu cytoplasmique dans l'oocyte (Huelsmann et al. 2013). Dans ce type de cellules, les filaments d'actine forment des câbles, reliés aux jonctions adhérentes et connectés au noyau, formant une sorte de cage autour du noyau (Huelsmann et al. 2013, Bernard, Lepasant and Guichet 2018). Ainsi le noyau est solidement ancré. Dans notre contexte, nous supposons que l'actine forme, de manière similaire, des sortes de câbles partant des adhérences basales qui pourraient s'entourer telle une cage autour du noyau afin de l'ancrer (**Figure 57A**). Cependant, des images préliminaires d'un quadruple marquage que j'ai réalisé afin de visualiser F-Actine, lamine, ADN et caspases suggère une situation plus complexe. Ces images montrent que, dans la cellule apoptotique, des filaments d'actine

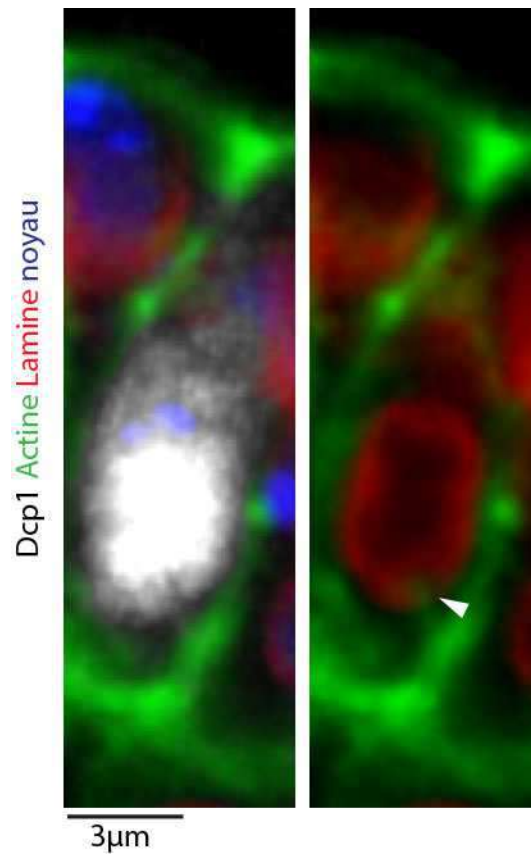


Figure 58. L'actine et la Lamine pourraient ancrer le noyau au basal.

Donnée préliminaire qui suggère que l'actine formerait une structure qui pourrait connecter la Lamine (Tête de flèche blanche).

semblent pénétrer dans le noyau (voir section 4.2 des résultats) et se localiser à proximité de zones où la lamine est présente (**Figure 58**). *In vitro*, il a été montré que les lamines pouvaient interagir avec l'actine (Simon, Zastrow and Wilson 2010). Une telle interaction est donc possible *in vivo*. Afin de vérifier cette hypothèse, la technique du BiFC peut être envisagée. Une moitié de la GFP serait fusionnée à l'actine et l'autre moitié serait fusionnée à la lamine. Ainsi une apparition de fluorescence dans les cellules apoptotiques révélerait une proximité de l'actine au nucléosquelette, soutenant l'hypothèse d'un ancrage direct de l'intérieur du noyau au basal des cellules par le cytosquelette d'actine (**Figure 57B**).

Mes marquages ont permis la détection nucléaire d'actine filamenteuse dans le noyau. Cependant comment l'actine y pénètre-t-elle ? Dans l'article que nous avons publié, nous avons montré que le niveau de lamine est diminué dans les cellules apoptotiques, suggérant que l'enveloppe serait fragilisée. En effet les lamines, tout comme les pores nucléaires, sont des cibles des caspases (Fischer et al. 2003). On peut alors supposer que le noyau devient plus perméable au cours de l'apoptose et que les filaments d'actine peuvent pénétrer à l'intérieur du noyau pour lier directement le nucléosquelette. Afin de tester la perméabilité du noyau au cours du processus apoptotique, il serait intéressant d'utiliser un senseur d'ADN cytoplasmique. Il s'agit d'une fusion entre une GFP et une protéine, cGAS, qui est cytoplasmique et qui peut interagir avec l'ADN. Lorsque la membrane nucléaire est perméable, le senseur s'accumule au site de rupture de la membrane nucléaire (Raab et al. 2016). Un tel outil pourrait être utile pour identifier la nature et la dynamique de l'ancrage, en le combinant à l'observation de l'actine et de l'enveloppe nucléaire en temps réel. Détecter spécifiquement l'actine et le noyau des cellules mourantes serait, pour cette expérience un avantage non négligeable. Tester l'hypothèse d'une interaction entre l'actine et la lamine dans le noyau pourrait aussi nécessiter l'utilisation d'outils permettant de visualiser spécifiquement l'actine nucléaire. Il s'agit de créer une fusion entre un domaine protéique liant l'actine, un fluorophore et une séquence d'adressage nucléaire (NLS). De tels outils, comme LifeAct-GFP-NLS-NES ou Actin-chromobody-tagGFP-NLS-NES, ont été utilisés pour caractériser l'actine nucléaire dans des cellules en culture (Plessner et al. 2015). Il serait intéressant d'utiliser ce genre d'outil afin d'analyser la dynamique de l'actine nucléaire avant et pendant l'apoptose. L'idée est que l'actine nucléaire présente dans le noyau apoptotique pourrait être polymérisée afin de connecter la lamine et de relier des filaments d'actine cytoplasmiques.

Enfin, afin d'analyser finement la régulation et la formation de ce réseau d'actine d'ancrage, il serait intéressant d'inhiber les différents régulateurs et les différentes protéines liant l'actine telles que le complexe Arp2/3, Formine, Profilin ou Cherrio par exemple. Ainsi, il faudrait suivre la mobilité des noyaux dans ces différents contextes.

Identifier le système d'ancrage du noyau apoptotique pourrait mettre en lumière un nouveau système d'ancrage nucléaire indépendant du LINC et aiderait également à mieux comprendre le rôle de résistance du noyau au cours de la génération de la force apico-basale. En effet, il est crucial que le noyau soit ancré au basal de la cellule apoptotique pour que la force apico-basale générée soit efficace (article 2).

3.2. L'ancrage basal du noyau et la formation du câble de Myosine sont-ils des évènements simultanés ou séquentiels ?

Dans notre modèle (article 2), nous supposons que le câble de myosine prend naissance en même temps que l'ancrage basal du noyau. Cependant nous n'avons en réalité aucune notion temporelle sur la formation du câble par rapport à celle du réseau d'ancrage. Le câble peut en effet grandir à mesure que l'actine ancre le noyau, puis une fois que le noyau est bien ancré, le câble de myosine va pouvoir se connecter au noyau. Le câble pourrait aussi connecter le noyau en même temps que l'actine ancre le noyau. Afin de trancher entre ces hypothèses, observer la dynamique en temps réel de l'actine basale et de la myosine dans la cellule apoptotique pourrait apporter une réponse. Cependant une limite à cette expérience vient de la difficulté à repérer des structures en profondeur du tissu, la résolution n'étant pas suffisante. Une solution serait de trouver les paramètres adéquats pour réaliser une observation en temps en réel avec le module d'airyscan qui permet une visualisation de meilleure résolution sur le microscope confocal. Ainsi, ce genre d'analyse pourrait nous donner une idée plus précise de la chronologie de la génération de la force apico-basale. Il faut noter que la formation du câble et le lien physique entre le noyau et le câble ne dépend pas de l'ancrage basal du noyau. En effet, une absence d'ancrage nucléaire (lors de la perte de fonction de Taline) n'empêche pas le lien de la myosine avec le noyau puisque le noyau remonte lors de la contraction du câble de myosine dans ce contexte. En revanche l'efficacité de la force apico-basale est amoindrie ou abolie, soulignant l'importance de l'ancrage. Ces

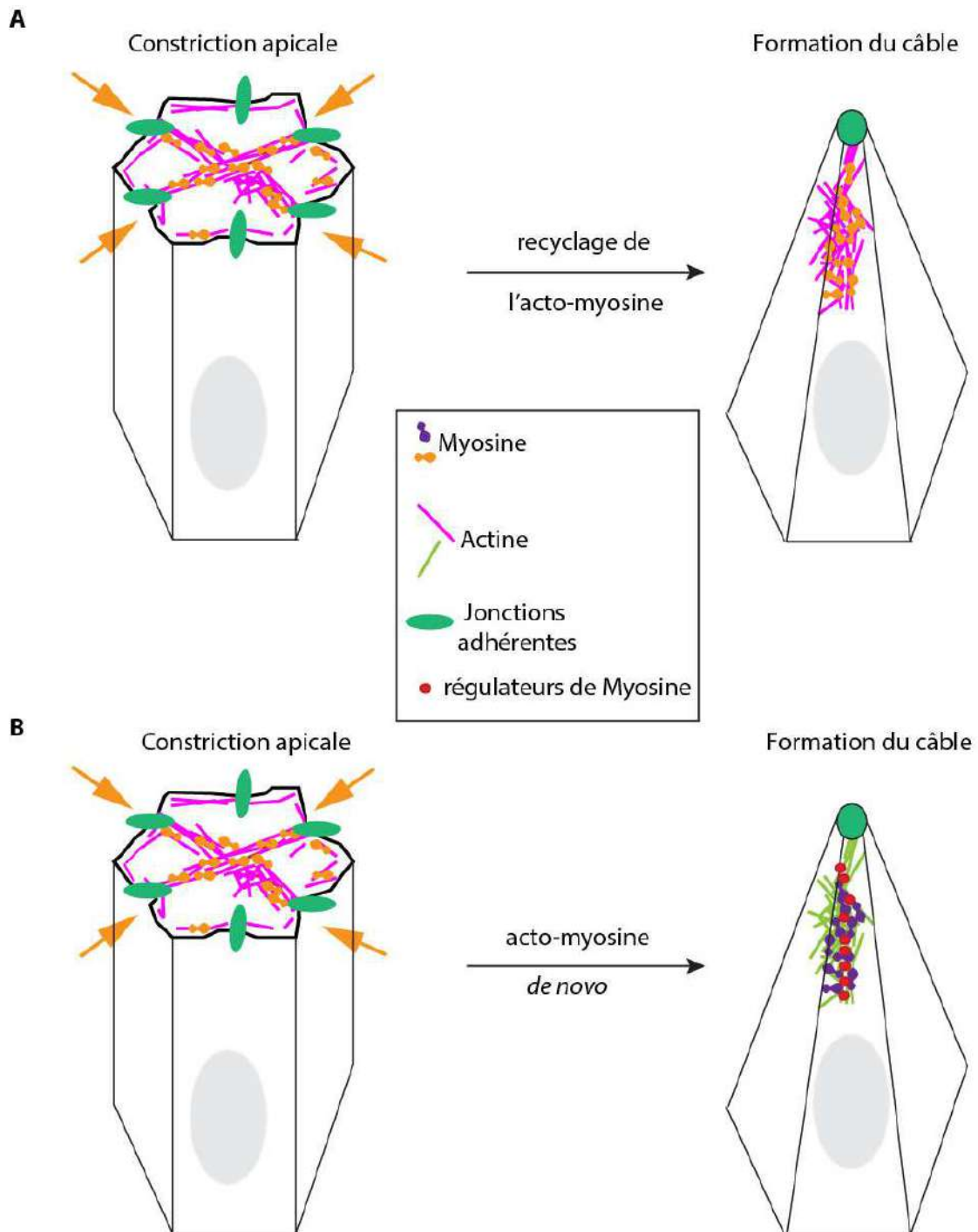


Figure 59. La formation du câble : recyclage de l'acto-myosine apicale ou création d'un réseau d'acto-myosine *de novo* ?

(A) Le réseau subapical requis pour la constriction apicale serait le même que celui qui forme le câble de Myosine. **(B)** Le câble d'acto-myosine est formé *de novo* par un recrutement et une activation spécifique de la Myosine via des régulateurs particuliers le long de l'axe apico-basal.

résultats suggèrent un mécanisme d'ancrage du câble de myosine au noyau basal indépendant du réseau d'actine requis pour l'ancrage du noyau.

3.3. *La rencontre du noyau avec le câble de myosine.*

3.3.1. L'émergence du câble de myosine.

Nous avons pu observer grâce à un double marquage, la dynamique de la myosine et des jonctions adhérentes, montrant qu'après la constriction apicale, le câble de myosine prend naissance au niveau des jonctions adhérentes. Il serait intéressant de déterminer l'origine du câble de myosine. S'agit-il d'un recyclage du réseau d'acto-myosine impliqué dans la constriction apicale ou s'agit-il d'une structure formée *de novo* ? En effet, on peut supposer que le réseau d'acto-myosine subapical, toujours relié aux jonctions adhérentes, est réutilisé par la cellule apoptotique en l'internalisant et *in fine* formant un câble (**Figure 59A**). On peut également supposer que le réseau d'acto-myosine subapical est démantelé et que le câble de myosine se forme de manière totalement indépendante (**Figure 59B**). Afin de tester ces différentes hypothèses, il serait intéressant d'une part de pouvoir visualiser spécifiquement l'acto-myosine subapicale grâce à des techniques de photoconversion. Cette méthode permet le changement du spectre d'émission d'un fluorophore après irradiation aux ultraviolets (Sattarzadeh et al. 2015, Baker, Buckheit and Falk 2010). Par exemple, une molécule telle que Dendra qui émet de la fluorescence dans le spectre du vert émettra, après photoconversion, de la fluorescence rouge (Baker et al. 2010). Il serait donc intéressant d'utiliser une protéine de fusion entre la Myosine et une protéine fluorescente photoconvertible telle que Dendra afin de suivre la dynamique de la myosine au cours de l'apoptose. Photoconvertir le réseau d'acto-myosine de vert en rouge au moment de constriction apicale pourrait permettre de déterminer l'origine du câble apico-basal. Si le câble est formé par le recyclage du réseau subapicale d'acto-myosine alors celui-ci sera rouge. Au contraire, il sera vert si c'est une structure nouvellement formée par un recrutement spécifique de la myosine le long de l'axe apico-basal. Il peut aussi apparaître jaune si la myosine médio-apicale et une autre source de myosine collaborent. Ainsi, cette méthode pourrait permettre de déterminer si le réseau subapical d'acto-myosine est à l'origine de la formation du câble. Poursuivre l'analyse nécessiterait de caractériser la localisation et la fonction de différents régulateurs de la

myosine, afin de déterminer si sa régulation est identique au niveau apical et le long de l'axe apico-basal. Chez l'ascidie, lors de la gastrulation, la régulation de la myosine apicale est différente de celle localisée au niveau baso-latéral des cellules de l'endoderme (Sherrard et al. 2010). Ainsi, dans les cellules apoptotiques, la myosine pourrait être régulée de manière indépendante lors de la constriction apicale et lors de la formation du câble. Si c'est le cas, cela suggèrera que la formation du câble de Myosine se forme *de novo* et donc indépendamment du réseau subapical. Ces études pourraient donc nous éclairer sur la régulation de la force apico-basale, une information qui paraît importante.

3.3.2. L'attraction du câble de myosine pour le noyau.

Nous avons par différentes expériences découvert l'existence d'un lien physique entre le câble de myosine et le noyau lors de la génération de la force apico-basale. L'observation sur tissu fixé montre en effet la proximité physique entre le câble de myosine et le noyau. L'imagerie en temps réel nous a permis de corrélérer la dynamique du noyau avec celle du câble de myosine. Ainsi, nous avons vu que le câble croît jusqu'à proximité de la surface apicale du noyau et qu'au moment de la contraction du câble le noyau remonte simultanément. Enfin, les expériences d'ablation laser sur le câble de myosine prouvent que le câble est physiquement attaché au noyau car il recule après coupure du câble. Toutes ces expériences mettent en évidence un lien physique entre le noyau et le câble de myosine, cependant comment le câble se dirige vers le noyau et la nature du lien câble-noyau restent encore totalement inconnus. Il serait intéressant de savoir si le noyau attire le câble par un quelconque signal. Il pourrait s'agir d'un signal chimique. Détruire le noyau basal juste avant la formation du câble de myosine et observer si le câble se forme pourraient aider à comprendre si le noyau joue un rôle dans l'attraction du câble. Caractériser la nature du lien physique entre le câble de myosine et le noyau serait aussi intéressant. L'une des hypothèses possible est que l'actine (nécessaire à la fonction de la myosine) formant le câble soit ancrée très localement au nucléosquelette, notamment, là où nous avons observé une déformation apicale du noyau lors de l'exercice de la force. De plus, j'ai pu observer de façon très préliminaire sur tissu fixé une accumulation de la lamine en apical du noyau apoptotique, là où le câble de myosine pourrait connecter le noyau. La lamine semble, en effet, être localisée de manière différentielle autour du noyau mourant. Mesurer précisément le niveau de lamine

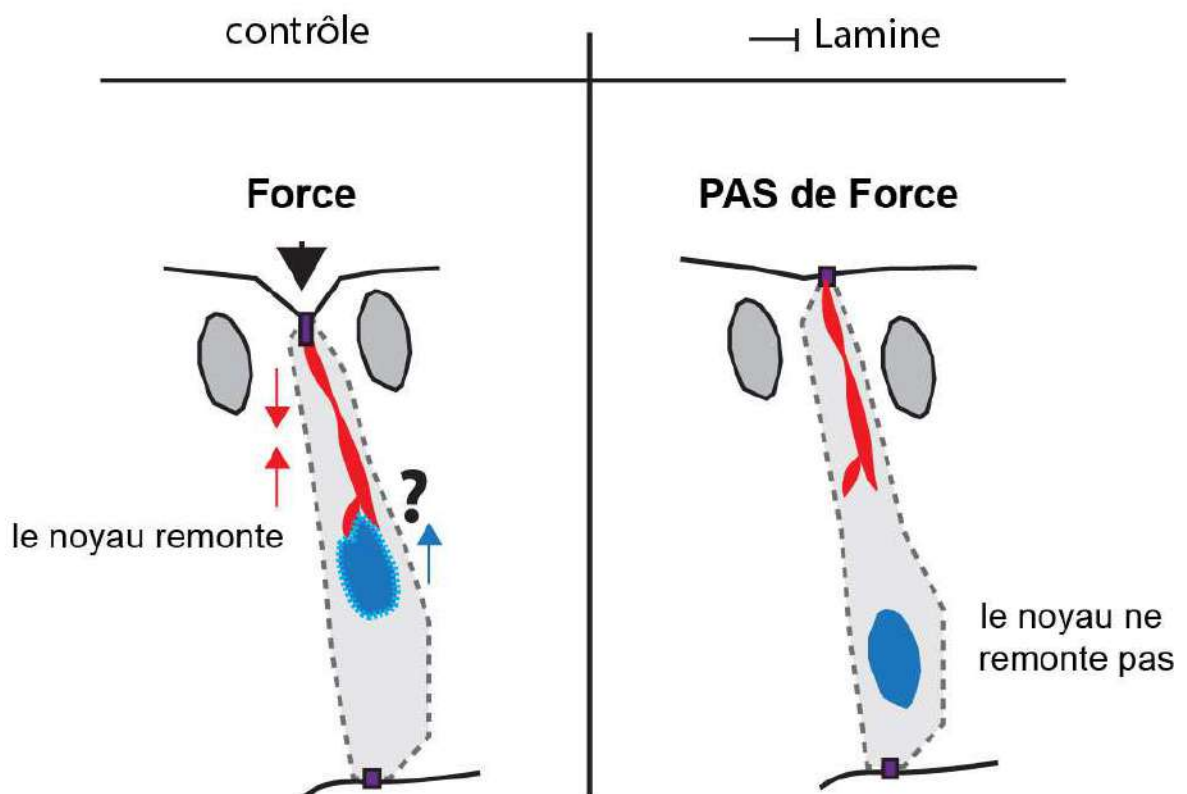


Figure 60. Nature du lien physique entre le câble de Myosine et l’ancrage du noyau.

Représentation de la dynamique du noyau en présence ou en absence de lamine. Dans le contrôle (à gauche), en présence de lamine, le noyau remonte (article 2). En revanche, sans lamine (à droite), le noyau resterait au pôle basal si le lien physique entre le noyau et le câble de myosine dépend d’un ancrage au nucléosquelette.

en apical versus en baso-latéral du noyau permettrait de confirmer cette observation. Ensuite, suivre la dynamique du noyau apoptotique (déformation locale du noyau) avec une résolution spatio-temporelle suffisante en absence de lamine pourrait fournir une première information sur la nature du lien physique. Si la lamine est en effet requise pour la connexion du câble de myosine avec le noyau, alors on s'attend à ce que le noyau ne remonte pas lors de la contraction du câble en absence de lamine (**Figure 60**). Le cas contraire suggérerait un autre mécanisme d'ancrage par une molécule intranucléaire ou périnucléaire à identifier. Ainsi, lié au noyau solidement ancré, le câble de myosine peut générer et transmettre efficacement la force apico-basale, entraînant la formation d'un pli dans l'épithélium.

3.4. Le noyau, résistance de la force : un nouveau rôle du noyau.

Le noyau est capable de répondre à des forces grâce à sa connexion au cytosquelette via le complexe LINC. Il peut sentir, intégrer et répondre au signal mécanique qui lui est transmis. (Guilluy et al. 2014, Belaadi et al. 2018, Belaadi, Aureille and Guilluy 2016, Guilluy and Burridge 2015). La plupart des études se concentrent seulement sur les conséquences intranucléaires des forces et non sur le rôle propre du noyau dans la génération d'une force. Mon travail a révélé, de manière surprenante, un nouveau rôle structural et non-génomique du noyau. En effet, une mauvaise localisation et un ancrage défectueux du noyau dans les cellules apoptotiques affecte l'efficacité de la force apico-basale lors de la morphogénèse de la patte (article 2). En absence de Klarsicht et de Taline, la surface apicale de l'épithélium reste plane jusqu'à la fin du processus d'apoptose. Ceci montre que la force apoptotique ne peut pas, ou que très faiblement, être transmise aux cellules voisines dans ces contextes. Ainsi le positionnement basal et l'ancrage sont des étapes essentielles à la génération d'une force apico-basale efficace. Le noyau, une sphère rigide et volumineuse, peut offrir au câble de myosine un point de résistance solide afin de pouvoir « tirer » efficacement sur la surface apicale de l'épithélium. En effet, une fois le câble bien ancré au noyau, il se contracte, provoquant une déformation locale du noyau, avant d'entraîner son déplacement vers la surface apicale. Cependant, le noyau va marquer « une pause » dans son ascension, suggérant une résistance à la force générée par le câble de myosine. Cette « pause » disparaît lorsque l'ancrage basal est absent, lors de la perte de fonction de la Taline. Ce phénotype est associé à un échec de la force apico-basale, elle n'est pas capable dans ce contexte de déformer la

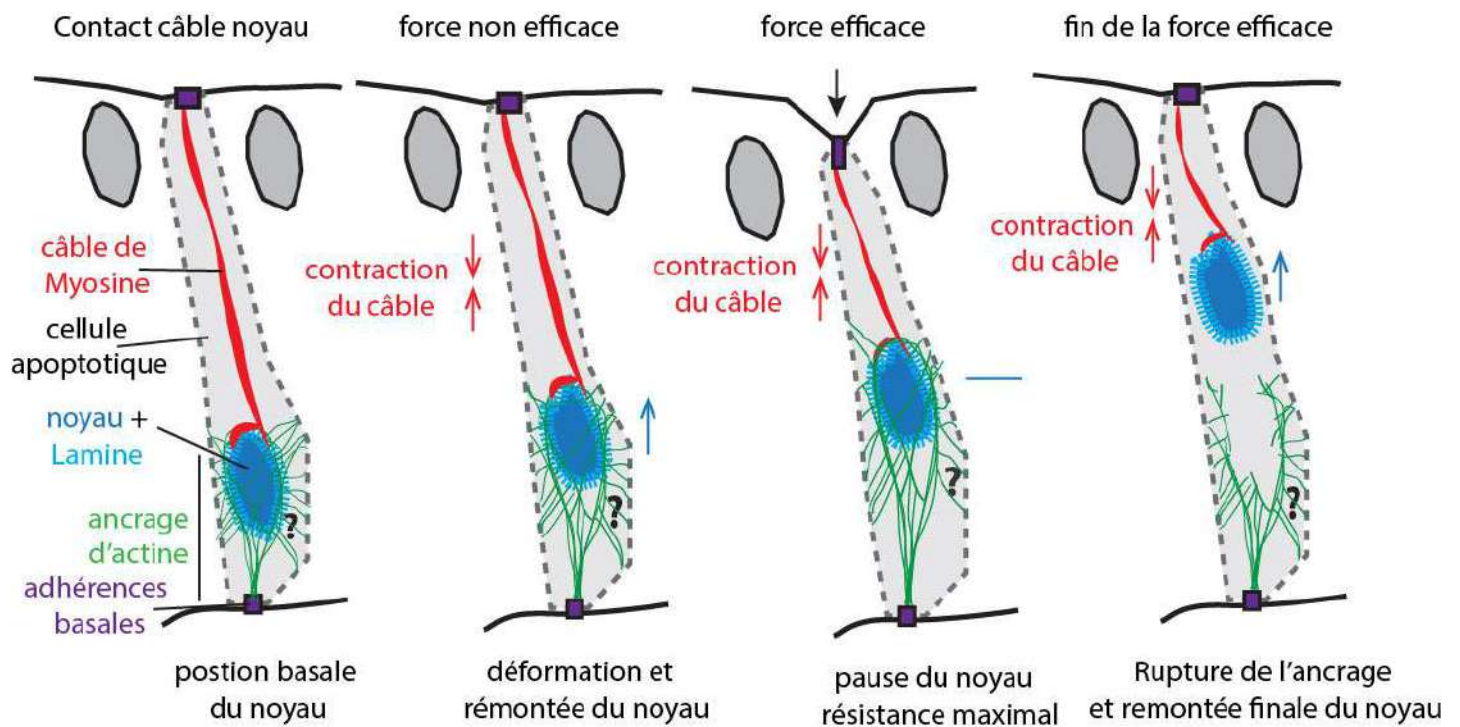


Figure 61. Modèle spéculatif du rôle de résistance du noyau lors de la force apico-basale générée par la cellule apoptotique.

surface apicale. Ces données montrent le rôle essentiel de l'ancrage du noyau dans l'efficacité de la force apico-basale. La « pause » du noyau serait vraisemblablement produite au moment où le câble de myosine déforme la surface apicale car l'ancrage ayant atteint une limite d'étirement, offre au câble de myosine la résistance nécessaire pour déformer l'épithélium. Enfin la force devenue supérieure à la résistance, l'ancrage basal se casserait, et le noyau n'étant plus ancré remonte à nouveau vers l'apical et la déformation transitoire disparaît (**Figure 61**). Afin de déterminer si, en effet, le temps de la pause du noyau correspond au moment où le câble déforme la surface apicale, il faudrait mesurer la déformation apicale en fonction de la dynamique du noyau grâce au marquage combiné de l'apoptosenseur, du noyau et des jonctions adhérentes.

Contrairement, à une perte de l'ancrage (par la méthode génétique), couper l'ancrage basal au moment de la force et donc au moment de la « pause » du noyau permettrait d'analyser plus directement le rôle de résistance du noyau. On s'attendrait à ce que le noyau remonte brutalement vers la surface apicale et que celle-ci se relâche. Enfin, pour aller plus loin dans l'analyse du rôle du noyau dans la force apico-basale, il serait intéressant de mesurer la résistance locale du noyau apoptotique, au point de contact du câble de myosine, à l'aide des pinces optiques, pour déterminer la résistance propre du noyau.

Ainsi, le noyau, à travers ses propriétés mécaniques, peut participer activement à la génération de la force apico-basale. Ce nouveau rôle non-génomique du noyau pourrait être conservé dans d'autres types cellulaires lors du développement animal ou dans d'autre contexte. Il pourrait participer plus généralement à la génération de la force apico-basale mais aussi à la génération d'autres types de forces.

De nombreuses études ont montré l'importance du positionnement nucléaire dans le fonctionnement des muscles. Une mauvaise position des noyaux dans les muscles est une caractéristique de certaines myopathies et cardiomyopathies telle que la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (Janin and Gache 2018). Dernièrement, il a été montré qu'une perte des Nesprines 1 et 2 chez la souris entraîne des noyaux mal localisés dans la fibre musculaire et une forme anormale des noyaux. Les Nesprines permettent la mécano-transduction du cytoplasme au noyau entraînant l'expression de certains gènes nécessaires à la fonction des muscles et du cœur. Ainsi, l'altération du lien entre le cytosquelette et le noyau empêche l'expression de ces gènes entraînant des cardiomyopathies (Banerjee et al. 2014).

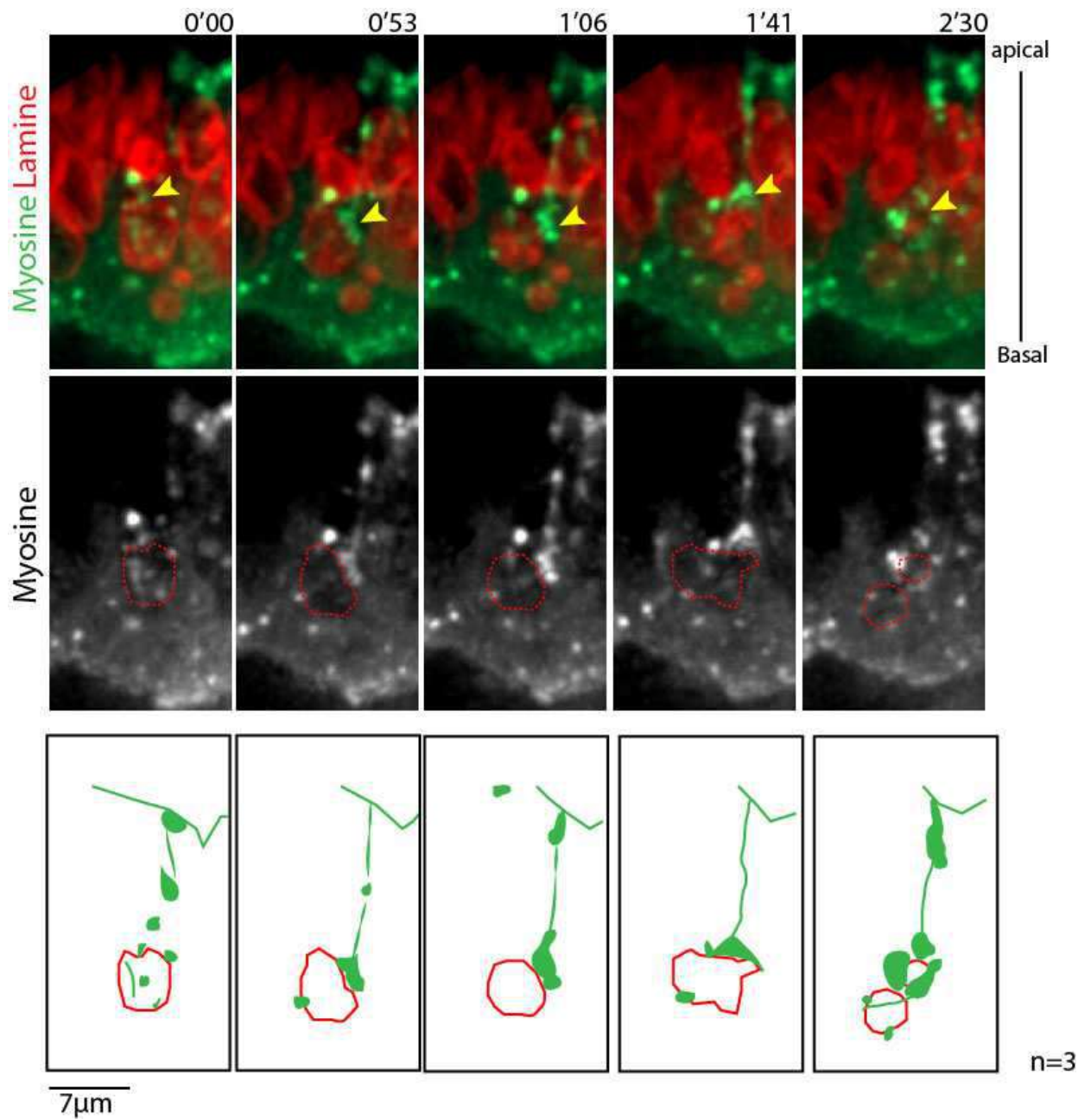


Figure 62. Le câble de Myosine pourrait participer à la fragmentation du noyau apoptotique.
 Le câble de myosine (vert) est à proximité du noyau (rouge) au cours de sa fragmentation (tête de flèches jaunes).

Une autre étude chez la drosophile, a montré que la position du noyau via le complexe LINC est importante pour l'assemblage et la stabilisation des sarcomères. Une mauvaise position des noyaux déstabilise l'organisation des sarcomères, affectant la fonction des muscles (Auld and Folker 2016) . A travers ces études, on comprend que la position du noyau est essentielle au bon fonctionnement des muscles. Cependant le rôle précis du noyau dans les muscles reste obscur. Il serait intéressant dans ce contexte de déterminer si le noyau joue un rôle dans la génération des forces émises dans le muscle, non pas d'investiguer l'impact des forces sur le noyau mais l'impact du noyau sur les forces.

De plus, une étude montre que, dans les fibroblastes, le noyau se comporterait comme un propagateur de forces. En effet il peut transmettre des forces depuis l'arrière de la cellule vers le front de migration. De manière intéressante ils ont constaté que le point d'équilibre de la force de traction lors de migration des fibroblastes coïncide fortement avec la position du noyau (Alam et al. 2015). Ainsi le noyau, dans divers contextes cellulaires, pourrait être un élément clé dans les mécanismes de génération de forces.

3.5. Le côté obscur de la force : La force apico-basale est-elle requise pour la fragmentation nucléaire ?

L'acto-myosine, requise pour la force apico-basale, pourrait être utilisée pour favoriser la destruction du noyau. Celui-ci est, en effet, fragilisé par une diminution de la lamine qui reste toutefois présente autour du noyau tout le long du processus. Lors de la remontée du noyau apoptotique l'enveloppe nucléaire est très dynamique, elle subit d'importants changements de forme, ressemblant à du « blebbing » (voir section 4.1 des résultats). Cette réorganisation de l'enveloppe aboutit à la segmentation du noyau en plusieurs morceaux. J'ai pu observer de façon préliminaire la dynamique conjointe du câble et l'enveloppe nucléaire (**Figure 62**). Cependant, lors de l'analyse de ce film, la difficulté était de repérer les cellules apoptotiques par l'apparition du câble de myosine. En effet, je ne pouvais pas, combiner l'apoptosenseur GFP avec la myosine-GFP et la lamine-RFP. D'autre part, suivre le noyau apoptotique parmi les autres noyaux était également compliqué. Une solution pour résoudre ces deux problèmes serait d'avoir un marquage spécifique du noyau dans cellules apoptotiques. Ainsi, il serait possible de repérer facilement les cellules mourantes grâce à la fluorescence spécifique de leur noyau et par conséquent de s'affranchir de la présence des autres noyaux qui

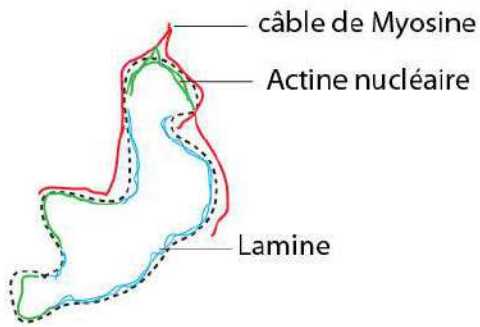
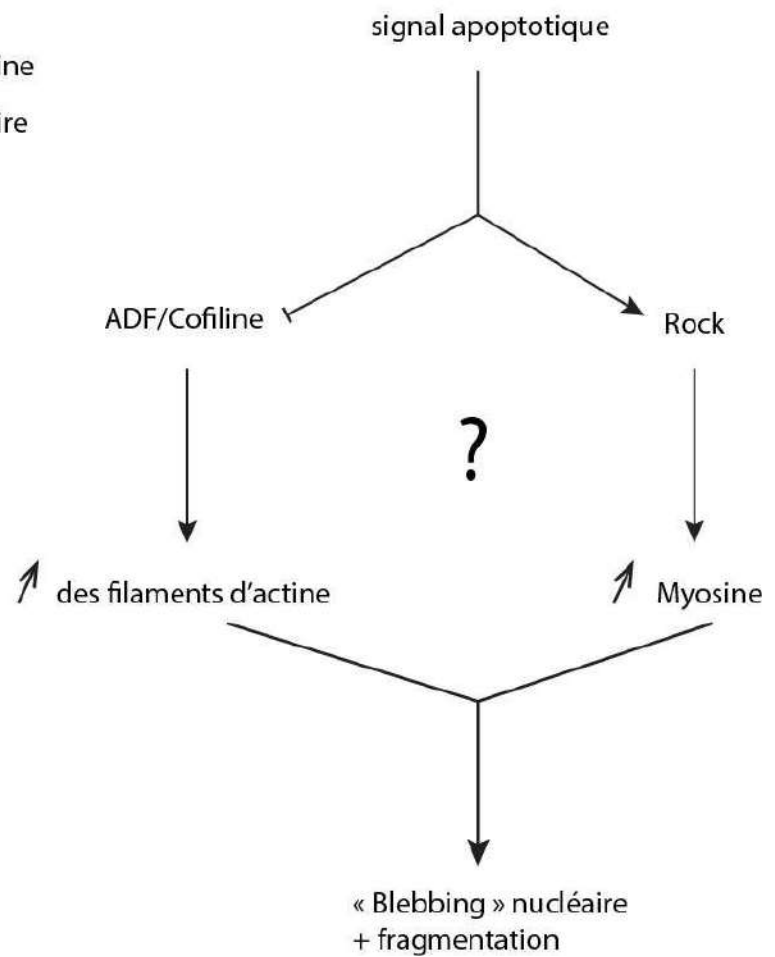
A**B**

Figure 63. Modèle spéculatif de la fragmentation nucléaire.

(A) Schéma du bourgeonnement nucléaire par l'actine nucléaire et le câble de myosine. **(B)** Hypothèse de la voie de régulation de la fragmentation du noyau.

compliquent l'analyse. Il serait alors possible et intéressant de tester l'impact de l'ablation du câble sur la fragmentation du noyau.

En parallèle, il serait intéressant de tester si l'actine nucléaire pourrait, en plus de permettre l'ancrage, servir à la fragmentation du noyau à la fin du processus d'apoptose. En effet, l'acto-myosine nucléaire pourrait, être responsable « du blebbing » nucléaire (**Figure 63A**). Le cortex nucléaire (nucleosquelette) étant potentiellement fragilisé par la diminution de lamine, l'enveloppe nucléaire serait plus sujette à la formation de blebs. Pourquoi et comment le noyau bourgeonne-t-il ? Est-ce parce qu'il est plus déformable ? Est-il d'avantage soumis à des forces dans les cellules apoptotiques ? Il serait intéressant de bloquer spécifiquement l'acto-myosine nucléaire pour voir si le noyau forme des blebs et se fragmente toujours. De plus, des expériences d'aspiration sur le noyau ont montré qu'en absence de lamine ou des protéines SUN, le noyau est plus sujet à être déformé (Neelam et al. 2015). Dans les cellules apoptotiques, la lamine semble être diminuée et la protéine SUN, Klaroide, semble être absente lors des stades tardifs de l'apoptose. Ainsi, le noyau apoptotique pourrait être moins rigide. Nous avons aussi montré que la tension apico-basale est plus forte dans les cellules apoptotiques que dans les cellules non apoptotiques (article 2). D'après l'étude de Croft et al. menée sur des cellules en culture, une combinaison de diminution de lamine et d'augmentation de l'activité de la myosine est nécessaire pour conduire à la fragmentation nucléaire (Croft et al. 2005). L'organisation du cytosquelette nécessaire au processus de fragmentation n'a toutefois pas été abordée dans ce travail.

Dans la patte de drosophile, il serait intéressant de mesurer, en variant l'intensité d'une force imposée à l'aide des pinces optiques, la déformabilité du noyau des cellules apoptotiques par rapport à celui des cellules non-apoptotiques. Cette expérience permettrait d'une part, d'apprécier la rigidité du noyau et d'autre part, de déterminer l'intensité de la force pouvant provoquer des déformations du noyau, notamment lors de la force apico-basale. Par exemple, si le noyau apoptotique est moins rigide que celui d'une cellule non apoptotique, on peut supposer qu'une faible intensité de force suffira à le déformer, alors que cette même force sera insuffisante pour déformer le noyau d'une cellule vivante. Mesurer les propriétés mécaniques du noyau au cours de l'apoptose pourrait aussi nous aider à mieux comprendre comment il se fragmente.

Finalement, des approches génétiques et chimiques pourraient compléter la compréhension de la fragmentation du noyau. En effet, des études intéressantes ont montré en culture de cellules qu'une inhibition de l'ADF/Cofiline, un complexe protéique permettant la dépolymérisation de l'actine, entraîne un défaut de morphologie du noyau (Kanellos et al. 2015, Wiggan et al. 2017). Dans ce contexte, l'absence de régulateurs négatifs de l'actine va promouvoir la formation de filaments d'actine contractiles qui, via le complexe LINC, déforme le noyau (Kanellos et al. 2015). La tension sur le noyau est augmentée, provoquant sa déformation. Cette augmentation de tension au sein de la cellule peut entraver la viabilité des cellules qui vont mourir par apoptose (Kanellos et al. 2015). En effet, la tension sur le noyau va induire des extensions nucléaires qui vont finir par former des sortes d'excroissances de membrane tels des blebs (Wiggan et al. 2017). Ainsi dans les cellules non mourantes ADF et Cofilin contrôlent l'intégrité du noyau en régulant négativement la formation des filaments d'actine (Kanellos et al. 2015). En revanche, dans les cellules apoptotiques, on pourrait imaginer que les protéines ADF et Cofiline sont inhibées soit par l'activation des caspases, soit par un autre mécanisme. En effet, une étude montre que lors de l'apoptose, ces deux régulateurs sont adressés à la mitochondrie (Rehklau et al. 2012), cela pourrait donc indirectement favoriser la formation des filaments d'actine. Ainsi l'absence de l'ADF/Cofiline et l'activité constitutive de Rock, pourrait promouvoir la destruction du noyau et de la cellule *in fine* (**figure 63B**). De plus, dans les cellules apoptotiques, le blocage de la polymérisation de l'actine par la Cytochalasine D empêche le noyau de se fragmenter (Croft et al. 2005). Ainsi, il serait intéressant de tester l'implication d'ADF/Cofiline dans la fragmentation lors de l'apoptose.

Peu d'informations sont disponibles à ce jour concernant la fragmentation nucléaire *in vivo*. Mon travail a permis de commencer à observer la dynamique de formation des « blebs » de l'enveloppe nucléaire. Caractériser précisément la dynamique du noyau et de la myosine lors des phases tardives de l'apoptose par différentes approches expérimentales pourrait permettre de savoir si la force apoptotique est requise *in fine* pour la fragmentation nucléaire ou si ce processus est contrôlé par un mécanisme indépendant, via l'actine nucléaire par exemple. Je propose un modèle très spéculatif qu'il faudrait tester à l'avenir : l'absence de régulateurs négatifs de l'actine (ADF/Cofiline), la diminution de la rigidité de la membrane

(diminution de la lamine) et l'activité de la myosine (le câble de myosine et/ou l'actine nucléaire) se combineraient pour mener à la fragmentation efficace du noyau.

IV. Que la force soit avec toi, toujours !

Est-ce que la force apoptotique est requise dans d'autres processus de morphogénèse dépendants de l'apoptose ? Par exemple, lors de la fermeture du tube neurale chez les vertébrés, des cellules vont mourir par apoptose dans les régions courbées du neuroépithélium (Nikolopoulou et al. 2017). De plus, l'absence d'apoptose affecte le bon déroulement de la fermeture du tube neural et peut conduire à des pathologies telles que des exencéphalies (Yamaguchi et al. 2011, Weil et al. 1997). Cependant le rôle exact de l'apoptose lors de la fermeture du tube neural n'est actuellement pas identifié. Il serait donc très intéressant d'étudier, dans ce contexte, si les cellules apoptotiques génèrent une force apico-basale par les mécanismes mis en jeu dans la patte de drosophile. L'équipe a donc choisi d'investiguer l'existence d'une force apoptotique sur des embryons de poulet. Ce travail est en cours et mené par une post-doctorante, Daniela Roellig. Ainsi, si le mécanisme de génération de forces apico-basales apoptotiques est retrouvé dans ce contexte, on pourra supposer que la génération d'une force apico-basale par les cellules mourantes, lors la morphogénèse de la patte de drosophile, n'est pas un cas isolé mais bien un processus conservé. Cette découverte pourrait à long terme permettre de comprendre le rôle non-autonome des cellules apoptotiques dans des contextes physiologiques et pathologiques.

V. Revisiter l'invagination.

Les forces planaires, notamment la constriction apicale, étaient considérées comme l'élément essentiel à la formation d'une invagination épithéliale. Cependant, un certain nombre d'études souligne qu'une autre composante est nécessaire pour obtenir une invagination complète (Monier et al. 2015, Sherrard et al. 2010, Yang et al. 2017). La constriction apicale serait nécessaire à l'initiation du processus d'invagination en induisant une légère courbure, telle une cupule. Cependant, ceci ne semble pas suffisant pour induire une invagination complète du tissu. Une étude très récente a montré *in silico* que la constriction apicale seule n'était pas suffisante à la formation d'un pli en 3D. En effet, mon

équipe d'accueil a montré en utilisant un modèle biophysique d'invagination du mésoderme de drosophile que l'application d'une force apico-basale est requise pour obtenir l'apparition d'un pli bien formé (Gracia et al. 2019). Il serait donc intéressant de revisiter certains processus d'invagination afin d'identifier si le mécanisme de force apico-basale que nous avons mis en évidence est conservé dans d'autres types cellulaires. Mon équipe d'accueil a donc poursuivi cette voie en revisitant le processus d'invagination du mésoderme de la drosophile *in vivo*, et notamment en cherchant l'existence d'une force additionnelle générée dans l'axe apico-basal. De manière intéressante, ils ont mis en évidence la présence d'un câble de myosine apico-basal dans les cellules du mésoderme. Suite à cette découverte, ils ont testé le rôle de ces câbles de myosine par ablation laser. Ces expériences montrent d'une part que ce câble de myosine est sous tension et, d'autre part, que l'invagination est sévèrement affectée lorsque les forces apico-basales sont absentes. Ainsi, ils montrent que l'invagination du mésoderme nécessite, en plus de la constriction apicale, une force apico-basale (Gracia et al. 2019) (**Figure 64**). Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier dans un avenir proche les mécanismes exacts mis en jeu dans ce contexte, et notamment tester le rôle du noyau et observer sa dynamique. Il serait intéressant en effet de savoir si le rôle morphogénétique du noyau est conservé dans différents contextes de morphogénèse.

Ainsi, ces travaux nous ouvrent l'opportunité de revisiter un certain nombre de processus important pour l'acquisition d'une forme en 3D de l'épithélium. Je pense notamment à la formation de tubes. Ils prennent souvent leur origine dans des groupes de cellules, ou placode, qui vont s'invaginer puis s'allonger afin de former un tube (Affolter et al. 2003, Girdler and Röper 2014) (**Figure 65**). De manière intéressante, une étude chez *C.elegans* sur la formation de la lumière de vulve implique à la fois une constriction apicale et une contraction latérale des cellules initiant l'invagination (Yang et al. 2017). Dans le même ordre d'idée, une étude sur le développement des glandes salivaires de la drosophile a montré dernièrement que bloquer la constriction apicale ne suffit pas à empêcher l'invagination de la placode. Ce résultat intéressant suggère l'existence d'une force apico-basale (Chung et al. 2017).

A la fin de ma quatrième année de thèse, j'ai voulu tester la présence potentielle d'une force apico-basale dans la morphogénèse des glandes salivaires de l'embryon de drosophile. J'ai donc cherché si des câbles de myosine sont présents dans ce tissu et j'ai observé la position des noyaux dans les cellules de la placode au début l'invagination. Malheureusement, je n'ai

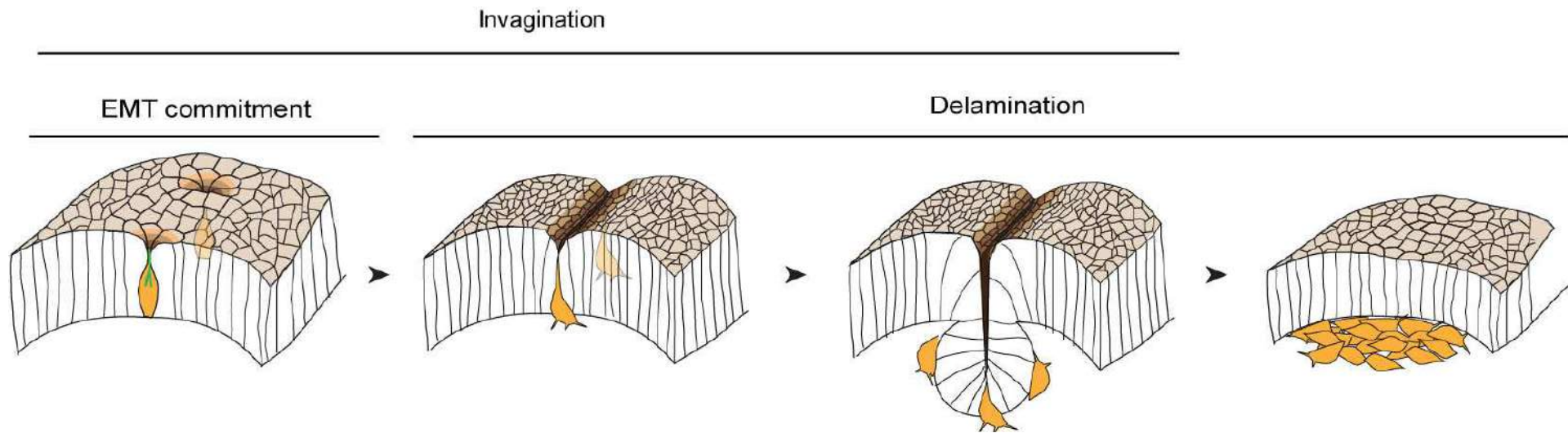


Figure 64. Modèle de la force apico-basale lors de l'invagination du Mésoderme de drosophile.

Cellule du mésoderme : jaune, câble de Myosine apico-basale : vert. Les cellules du mésoderme avant de délaminer génèrent une force apico-basale conduisant à l'invagination de l'épithélium. Tiré de (Gracia et al. 2019).

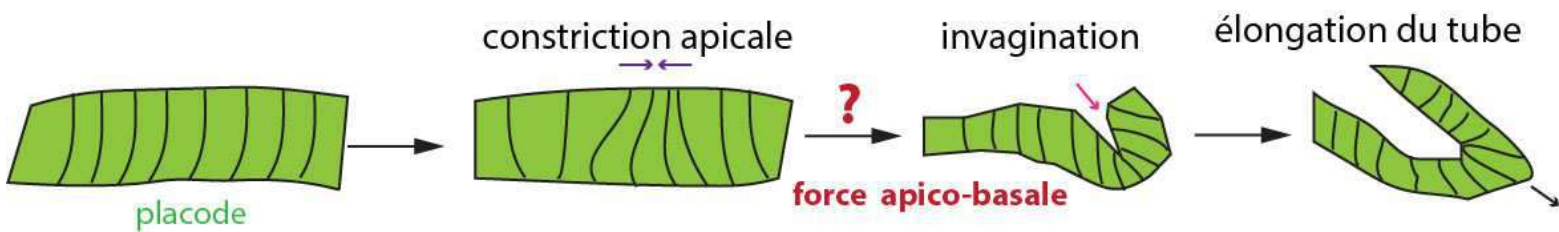
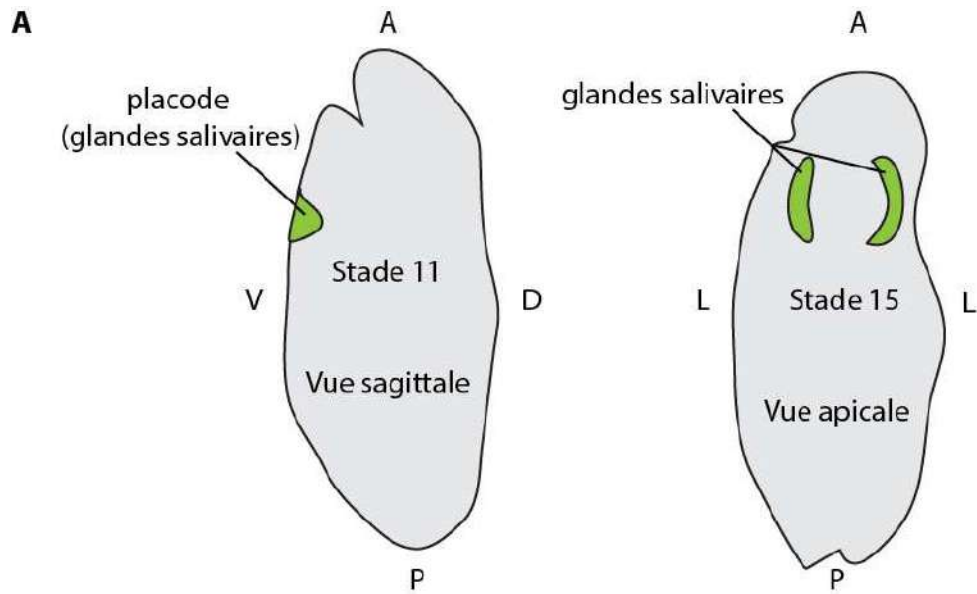


Figure 65. La formation de tubes.

Lors de la formation de tubes les cellules vont réduire leur apex (flèches violettes), invaginer (flèche rose), et le tissu va ensuite s'allonger (flèche noire). Le point d'interrogation pose la question de l'intervention d'une force apico-basale supplémentaire lors de l'invagination de la placode qui formera le tube.



B

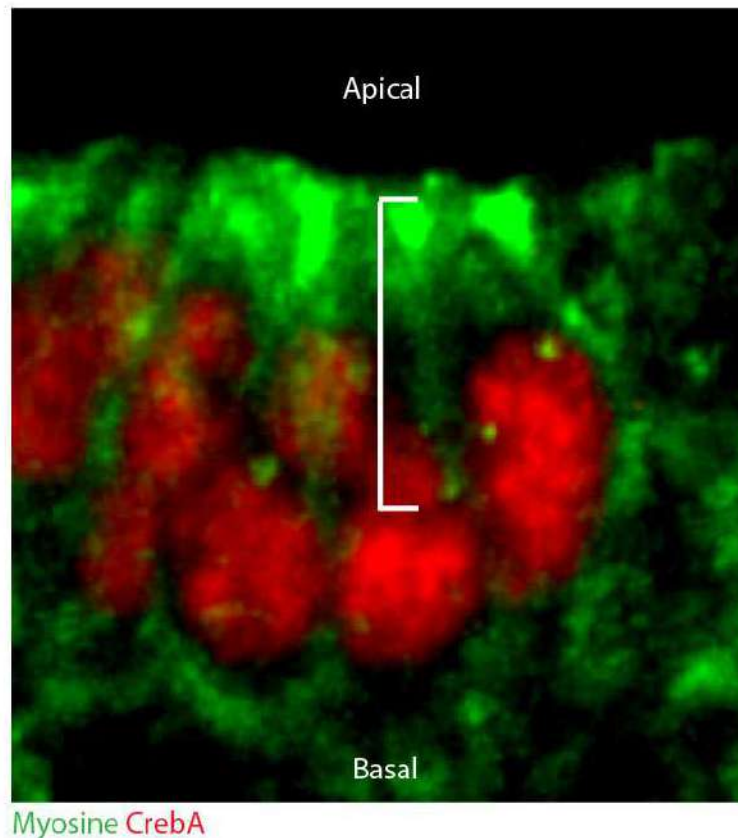


Figure 66. Est-ce que des câbles de myosine apico-basale se forment dans les cellules de la future glande salivaire ?

(A) Schématisation des glandes salivaires d'un embryon de drosophile stade 11 (vue sagittale) et stade 15 (vue apicale). (B) Résultats préliminaire montrant des structures apico-basales de myosine semblent se former dans les cellules de la placode (accolade blanche). Cette structure est à proximité du noyau.

pas eu le temps d'exploiter ce nouveau projet. J'ai toutefois réalisé un co-marquage d'embryons exprimant la myosine-GFP et utilisé un anticorps anti-CrebA, un facteur de transcription exprimé dans les noyaux de la placode (stade 11, **Figure 66**). Ainsi, j'ai pu observer, de manière très préliminaire, des structures de myosine à proximité des noyaux dans les cellules de la glande salivaire à un moment où l'invagination de la placode débute (**Figure 66B**). Ces structures de myosine sont très intenses en apical et semblent se prolonger vers le basal et contacter le noyau. Il serait très intéressant de réaliser des images en temps réel de la placode des glandes salivaires afin de repérer la formation de câbles apico-basaux de myosine. Il faudrait, ensuite, combiner la myosine-GFP avec CrebA afin de repérer les noyaux et d'analyser leur dynamique. De plus, une étude montre que Klarsicht semble jouer un rôle dans la morphogenèse des glandes salivaires (Myat et al. 2015, Myat and Andrew 2002). On peut donc supposer qu'il est requis pour le transport basal du noyau impliqué dans la génération de la force apico-basale dans ce contexte. Les résultats de ces expériences suggèrent une organisation similaire au mécanisme de génération de forces apico-basales retrouvé dans les cellules apoptotiques. En l'absence d'identification de régulateurs spécifiques de cette force apico-basale, il serait intéressant de sectionner les câbles de myosine et de déterminer les conséquences sur le développement des glandes salivaires. De telles expériences pourraient permettre de généraliser le mécanisme des forces apico-basales dans divers contextes d'invagination.

En résumé, ma thèse décrit un mécanisme de génération de force apico-basale important pour la morphogenèse d'épithéliums en 3D. Un tel mécanisme pourrait être conservé dans d'autres types cellulaires engagés dans des processus de morphogenèse. Mon travail a aussi permis de caractériser la dynamique des cellules apoptotiques dans un système intégré. Enfin, il met en évidence que le noyau est un acteur clé dans la génération d'une force cellulaire. Sa position est importante dans la transmission de la force apico-basale au reste du tissu. Ce rôle du noyau dans la génération d'une force pourrait être impliqué dans d'autres processus de morphogenèse mais aussi dans la transmission de forces dans d'autres contextes physiologiques et pathologiques.

MATERIELS ET

METHODES

Le matériel et méthodes ci-dessous est celui utilisé pour les résultats non publiés, ceux des résultats publiés sont inclus dans les articles.

- **Matériel vivant utilisé (*Drosophila melanogaster*) :**

Voici la liste des stocks additionnels utilisés pour les résultats complémentaires :

Issus de la banque de Bloomington Drosophila Stock Center :

UAS-Klc RNAi / UAS Khc RNAi / UAS DCTN1-GFP / UAS-DCTN1 RNAi (BL24751) / UAS EB1GFP / MSP300[ΔKASH] (BL26781)

La lignée Asterless-mCherry sous le contrôle du promoteur Asterless est un don du Dr Katja Röper (Cambridge, UK).

- **Immunofluorescence :**

Disques de pattes de la drosophile :

Les dissections des pupes (de 0h à 4h selon les expériences) sont réalisées dans du PBS 1X. Les tissus sont fixés à la paraformaldéhyde 4% diluée dans du PBS 1X sous une hotte durant 20 minutes. Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois sous la hotte puis lavés et saturés dans du tampon BBT composé de PBS 1X, 0,3% de Triton X-100 (perméabilisant), BSA 1% (bovin serum albumin) à 4 reprises pendant 15 minutes. Ensuite, les échantillons sont incubés toute la nuit à 4°C en présence des anticorps primaires dilués dans le BBT. Les échantillons sont ensuite lavés de nouveau 4 x 15minutes dans du BBT afin de retirer l'excédent d'anticorps primaires. Une fois rincés, ils sont incubés sous agitation pendant 2h avec les anticorps secondaires dilués dans le BBT. Les échantillons sont lavés une dernière fois (4x 15minute) dans du PBS1X, Triton 0,3%. Enfin, le milieu est remplacé par du milieu de montage Vectashield + DAPI et les tissus sont montés entre lame et lamelle en utilisant un « spacer » de 120 µm de diamètre (Secure-Seal™ from Sigma-Aldrich) afin de préserver la morphologie des tissus.

Embryon de drosophile (étude des glandes salivaires) :

Les embryons de stade 9 à 15 (le stade 11 étant idéal) sont délicatement récupérés à l'aide d'un pinceau après avoir versé de l'eau sur les pondeurs de gélose. Les embryons sont transférés dans un tamis et incubés 2 minutes 30 dans un mélange de 50% d'eau et de 50 % d'eau de javel. Cette étape permet de déchorionner les embryons. Les embryons sont ensuite récupérés sur le tamis avec un pinceau et ils sont transférés dans une fiole de fixation contenant 2ml d'Heptane et 2ml de formaldéhyde à 37%. Les embryons se localisent à l'interface entre l'heptane et la formaldéhyde. La fixation dure 5 minutes sous agitation.

Sous la hotte, la formaldéhyde est délicatement éliminée à l'aide d'un pipetman ou d'une pipette pasteur en prenant soin d'aspirer le moins d'embryons possible. Puis 2ml de méthanol sont ajoutés dans la fiole. La fiole est secouée vigoureusement afin que la membrane vitelline se retire des embryons. L'heptane est ensuite retiré puis les embryons sont récupérés avec le méthanol en utilisant une pipette pasteur. Ils sont transférés dans un eppendorf, lavés 3 fois dans du méthanol puis 2 fois avec de l'éthanol. Sur la paillasse, les échantillons sont encore lavés avec de l'éthanol puis réhydratés dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Enfin, ils sont lavés dans du BBT à 3 reprises pendant 15 minutes.

Après fixation, les embryons sont incubés dans les anticorps primaires dilués dans du BBT, sur la nuit. Le lendemain, l'excès d'anticorps primaires est éliminé par 4 lavages successifs de 15 minutes. Les embryons sont ensuite incubés avec les anticorps secondaires durant 2h puis lavés (4 x 15min) dans du BBT. Les embryons peuvent enfin être montés dans du vectashield (avec ou sans DAPI) entre lame et lamelle, au centre du « spacer » préalablement collé sur la lamelle.

Anticorps primaires : anti-Dcp1 activé (#958, rabbit, 1/200), CrebA (DSHB, rabbit, 1/50).

Anticorps secondaires : Alexa647 (Iterchim, 1/100) et Alexa555 (Iterchim, 1/200).

Agent chimiques : Phalloïdine Rhodamine (Fischer Scientific) dilué au 1/200, utilisée pour visualiser l'actine.

- **Culture des disques de pattes, et traitements par agents chimiques.**

Pour les expériences d'imagerie en temps réel, les disques de pattes sont mis en culture et disséqués, avec du matériel préalablement lavé, dans du milieu de culture permettant leur

développement. Le Schneider et le Shield and Sang (commercialisés par Sigma-Aldrich) sont les deux milieux de culture pour cellules ou tissus de drosophile que j'ai utilisés. Ils sont supplémentés avec 15% de sérum foetal de veau, 0,5 % de pénicilline et de streptomycine pour éviter les contaminations et avec de l'hydroxyecdysone à 2µg/mL (Sigma-Aldrich, H5142, diluée au 1/100), une hormone nécessaire à la métamorphose des insectes. Les disques sont ensuite transférés délicatement à l'aide d'un pipetman sur une lame dans le « spacer » (identique à celui décrit dans la section immunofluorescence), puis une lamelle est déposée au-dessus. Une couche d'huile d'halocarbone est glissée autour de la lamelle afin d'éviter la déshydratation des échantillons. Ainsi les échantillons peuvent être observés au microscope. Lors de traitements chimiques, les agents sont ajoutés au milieu précédemment décrits.

Coloration des membranes par le FM4-64 : c'est un agent chimique pénétrant dans les membranes lipidiques et qui fluoresce notamment dans le spectre de la RFP. Les disques sont incubés avec le FM4-64 dilué au 1/1000 pendant 30 minutes dans l'obscurité. La méthode de montage est identique à celle décrite ci-dessus.

- **Microscopie.**

Les échantillons vivants ont été observés soit avec :

- Le microscope confocal LSM880 Zeiss inversé avec des objectifs à eau 40x / 1,2 ou 63x / 1,3 et équipé d'une platine piézo. Ce microscope possède également un module d'ablation laser permettant la dissection optique de certains échantillons. Ce module est composé d'un laser DPSS pulsé (532 nm, longueur d'impulsion 1,5 ns, taux de répétition jusqu'à 1 kHz, 3,5 µJ / impulsion) piloté par un dispositif de balayage laser à base optique (DPSS-532 et UGA-42, de Rapp OptoElectronic, Hambourg, Allemagne). Le laser est focalisé à travers une lentille à forte ouverture numérique à immersion dans l'eau (Plan-Apochromat 63x de Zeiss).
- Le microscope « spinning disk » (disque tournant, CSU-X1, Yokogawa, couplé à un microscope Zeiss) équipé de LEDs 405 nm, 488 nm and 561 nm, d'une caméra Hamamatsu EMCCD et d'une platine piézo sous le contrôle du programme Zen blue.

- **Analyse des images.**

L'analyse des images a été réalisée grâce au logiciel Imaris qui permet de manipuler les images en 3D avec aisance. Ce logiciel a permis d'extraire des éléments cellulaires afin de mieux les observer. Par exemple pour isoler le noyau des cellules apoptotiques, il faut créer une surface (avec l'onglet surface) sur le canal de Dcp1 ou GC3Ai puis aller dans l'onglet « mask all » et cliquer sur le canal du noyau. Ainsi un nouveau canal est créé permettant la visualisation spécifique du noyau de la cellule apoptotique.

Les logiciels Zen black et imageJ ont également été utilisés pour l'analyse des images.

- **Quantifications et statistiques.**

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel PRISM.

- Mesure de la position des noyaux dans le disque de patte.

La position des noyaux le long de l'axe apico-basal de l'épithélium a été quantifiée par le calcul du ratio de la distance entre le centre du noyau et la surface basale de l'épithélium divisé par la hauteur totale de la cellule. (100% = apical, 0% = basal). Les distances ont été mesurées dans le logiciel Imaris. La significativité a été calculée avec le test Mann-Whitney, un test non-apparié (les deux populations d'échantillons comparées évoluent dans des conditions différentes : contrôles vs perte de fonction du gène d'intérêt) et non paramétrique.

- Mesure de la circularité et de la solidité de l'enveloppe nucléaire pendant la fragmentation de la cellule.

La circularité est définie par la formule suivante :

$$\text{circularity} = 4\pi \times \frac{[\text{area}]}{[\text{perimeter}]^2}$$

La solidité est définie par la formule suivante :

$$\text{solidity} = \frac{[\text{area}]}{[\text{convex.area}]}$$

Ces formules sont issues de plugin disponible sur le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Elles ont été utilisées par exemple dans les articles suivants : (Takaki et al. 2017, Matsumoto et al. 2015).

La circularité a été quantifiée dans le logiciel ImageJ en créant une ligne de type « segmented line » qui suit l'enveloppe nucléaire. Ensuite ces tracés ont été analysés par ImageJ grâce au plugin « measure ».

La solidité a été quantifiée de la même manière.

Ces analyses ont été réalisées après acquisition de films sur la lignée Lamine-TagRFPT. Pour un des cas, les mesures ont été réalisées toutes les 30 secondes sur 30 minutes (un seul film de 30 minutes). Des graphiques radar ont été générés pour visualiser le mouvement de l'enveloppe nucléaire en fonction du temps. Pour tous les cas, la circularité et la solidité ont été mesurées en prenant une image toutes les 30 secondes sur 8 minutes afin de calculer la moyenne de ces deux paramètres et comparer ainsi la circularité et la solidité des noyaux apoptotiques *versus* non-apoptotiques. Un test statistique Mann-Whitney a permis de comparer ces deux populations.

ANNEXES



Review

Apoptotic forces in tissue morphogenesis

Arnaud Ambrosini¹, Mélanie Gracia¹, Amscha Proag¹, Mégane Rayer¹, Bruno Monier¹, Magali Suzanne*

LBCMCP UMR5088, Centre de Biologie Integrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2016

Received in revised form 13 September 2016

Accepted 18 October 2016

Available online 19 October 2016

ABSTRACT

It is now well established that apoptosis is induced in response to mechanical strain. Indeed, increasing compressive forces induces apoptosis in confined spheroids of tumour cells, whereas releasing stress reduces apoptosis in spheroids cultivated in free suspension (Cheng et al., 2009). Apoptosis can also be induced by applying a 100 to 250 MPa pressure, as shown in different cultured cells (for review, see (Frey et al., 2008)). During epithelium development, the pressure caused by a fast-growing clone can trigger apoptosis at the vicinity of the clone, mediating mechanical cell competition (Levayer et al., 2016).

While the effect of strain has long been known for its role in apoptosis induction, the reciprocal mechanism has only recently been highlighted. First demonstrated at the cellular level, the effect of an apoptotic cell on its direct neighbours has been analysed in different kinds of monolayer epithelium (Gu et al., 2011; Rosenblatt et al., 2001; Kuipers et al., 2014; Lubkov & Bar-Sagi, 2014). More recently, the concept of a broader impact of apoptotic cell behaviours on tissue mechanical strain has emerged from the characterisation of tissue remodelling during *Drosophila* development (Toyama et al., 2008; Monier et al., 2015). In the present review, we summarize our current knowledge on the mechanical impact of apoptosis during tissue remodelling.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Apoptotic force	33
1.1. Apoptotic force at a local scale.	33
1.2. Apoptotic forces at the tissue scale.	34
2. Modelling apoptosis	35
3. The need to revisit other morphogenetic movements.	37
3.1. Migration	38
3.1.1. Wound healing	38
3.1.2. Abdomen morphogenesis.	38
3.2. Invagination.	39
4. A forgotten actor in tissue mechanics: The extracellular matrix	39
5. Conclusion	41
Funding.	42
Acknowledgements	42
References	42

1. Apoptotic force

1.1. Apoptotic force at a local scale

At the cellular level, it was first described (in MDCK cells, chicken and zebrafish embryonic epithelia) that, on the one hand, an apoptotic

cell reorganizes its cytoskeleton at the onset of apoptosis to form an intracellular acto-myosin ring (*i.e.* inner ring), and on the other, it sends a biochemical signal to its neighbours, through the sphingosine-1-phosphate pathway, for them to induce the formation of a supracellular acto-myosin cable around the dying cell (*i.e.* outer ring) (Gu et al., 2011; Rosenblatt et al., 2001). This signalling event has been well documented; conclusions supported the view that neighbouring cells were responsible for dying cell extrusion through the generation of the outer supracellular ring of acto-myosin, whereas the dying cell merely provided a biochemical signal for its neighbours without playing a

* Corresponding author.

E-mail address: magali.suzanne@univ-tlse3.fr (M. Suzanne).¹ These authors contributed equally to this work.

mechanical role in its own extrusion (Gu et al., 2011; Rosenblatt et al., 2001) (Fig. 1A). However, a more recent study has shown that, at least in the MDCK model, the removal of dying cells is a multistep process involving distinct actomyosin pools, where the inner ring created in the apoptotic cell and detected before the outer ring is responsible for the apoptotic cell's apical constriction (Kuipers et al., 2014). In summary, dying cell extrusion includes two steps, i) apical constriction which depends on the inner apoptotic acto-myosin ring, ii) extrusion *per se* which depends on the outer acto-myosin ring created by apoptotic cell neighbours in response to an apoptotic biochemical signal. Interestingly, the reorganisation of apoptotic cell neighbours into a rosette is observed at the end of apical constriction, indicating that the force generated by the apoptotic cell is most probably responsible for this apical reorganisation. Consistently, apoptotic cells keep strong adhesion with their neighbours until the completion of cell extrusion (Lubkov and Bar-Sagi, 2014). A recent report suggests that junctional cortex supports actin architectural reorganisation and contractility around the apoptotic cell; cell-cell adhesion allows the recruitment of Coronin 1B, the subsequent organization of F-actin in bundles and Myosin II in aligned minifilaments. This creates efficient contractility at the interface between apoptotic cells and their neighbours (Michael et al., 2016). This way, E-cadherin adhesion would play an important role at the apoptotic/neighbour interface by transmitting contractile stress from the apoptotic cell, thus inducing a mechano-sensitive response in neighbours. Altogether, these recent results highlight the reciprocal mechanical influence between apoptotic cells and their neighbours.

1.2. Apoptotic forces at the tissue scale

The above results considered the influence of apoptosis at a very local scale, focusing on the apoptotic cell and its direct neighbours. However, the notion of force transmission from the apoptotic cell to the surrounding tissue, affecting living cells at a broader scale, was

revealed more recently studying two different morphogenetic processes taking place during *Drosophila* development: dorsal closure in the embryo and fold formation in the developing leg (Toyama et al., 2008; Monier et al., 2015).

Dorsal closure is a robust morphogenetic process taking place at the end of *Drosophila* embryogenesis, which corresponds to the migration of two lateral epithelial cell sheets that progressively cover an eye-shaped opening transiently occupied by the amnioserosa, an extra-embryonic tissue. The first row of epithelial migrating cells, or leading edge, form an acto-myosin cable also called the purse-string, which generates one of the driving forces of dorsal closure. Another driving force comes from the amnioserosa (Kiehart et al., 2000).

Although apoptosis has long been known as taking place during dorsal closure (Abrams et al., 1993), it is only recently that its role in this phenomenon has been described. The apoptotic pattern during dorsal closure was initially described by Reed and colleagues (Reed et al., 2004). During dorsal closure, close apposition of yolk sac and amnioserosa is thought to prevent premature anoikis, a particular form of apoptosis induced by loss of adhesion. Then, at the end of dorsal closure, this contact is lost and the whole amnioserosa degenerates through developmentally programmed anoikis (Reed et al., 2004). More recently, it was shown that a subset of amnioserosa cells undergo apoptosis earlier than initially thought (Toyama, 2008). Indeed, they contract their apical surface, extrude, bleb and fragment during the migration of the lateral epithelium (Toyama et al., 2008; Sokolow et al., 2012). In parallel to the extrusion of apoptotic cells, the direct neighbours are distorted and adopt a “rosette” geometry. Rosettes are the consequence of the elongation of neighbouring cells towards the delaminating apoptotic cell, as is the case in monolayer epithelia in culture (Rosenblatt, 2001; Lubkov and Bar-Sagi, 2014). Although the respective contribution of apoptotic cells and neighbouring cells in these morphological changes has yet to be determined, it was proposed that both contribute to this cellular remodelling (Fig. 1B). It was further

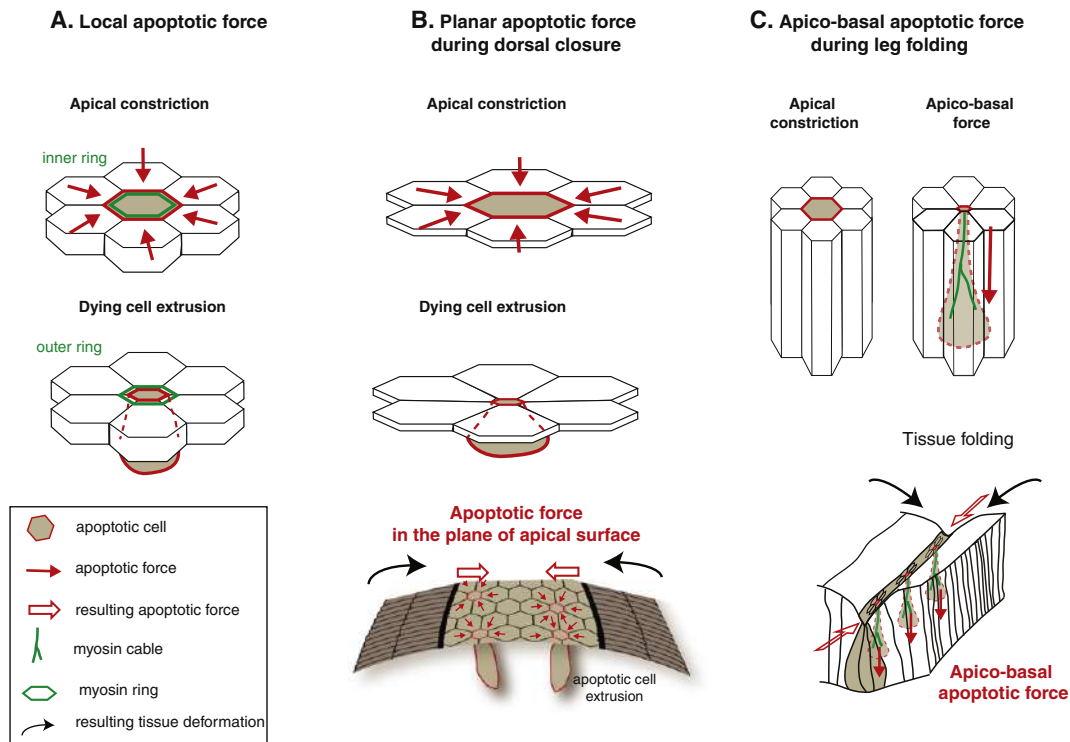


Fig. 1. Apoptotic force at cellular and tissue scale. (A) Apoptotic forces exerted at the cellular level, inner ring responsible for apical constriction and outer ring for cell extrusion. (B) Planar apoptotic force exerted during dorsal closure (force in the plane of apical surface). (C) Apico-basal force exerted by apoptotic cells during leg folding. (B, —C) Upper panels shows the cellular reorganisation during apical constriction and cell extrusion, lower panel shows the resulting apoptotic force (open red arrows) and tissue movement (black arrows).

showed that the effect of an apoptotic cell is not restricted to the one row of juxtaposing neighbouring cells but can reach several rows of cells. Thus, it is likely that all amnioserosa cells are influenced by the elimination of a subset of the tissue, suggesting that apoptosis could contribute actively to closure. Indeed, both reducing and enhancing apoptosis affects the dynamics of dorsal closure. Either an inhibitor (*p35*) or an inducer (*grim*) of apoptosis were specifically expressed in the amnioserosa and the speed of the process analysed. This showed that apoptosis inhibition slows down the process whereas apoptosis enhancement accelerates it. The force exerted by the amnioserosa on the leading edge was further measured by laser ablation experiments in a control versus an apoptosis inhibition context, demonstrating that about one third of the force exerted by the amnioserosa on the leading edge is due to apoptosis (Toyama et al., 2008).

The recent discovery that neighbouring cells intervene for extrusion only once the apical surface of dying cells has totally shrunk (Kuipers et al., 2014) suggests that neighbouring cells themselves might not play a crucial role in the lateral epithelium movement. Therefore, the force generated by apoptotic cells and leading to their own constriction could in fact be responsible for generating the amnioserosa-dependent pulling force important for dorsal closure. Thus, apoptotic cells could contribute to the general movement of lateral epithelium not only by reducing the surface of the amnioserosa but also by actively generating the morphogenetic force required for dorsal closure. Alternatively, both apoptotic cells and their neighbours could play a part, influencing one another by mechanical communication through adherens junctions (Michael, 2016).

The apoptosis pattern is quite similar during dorsal closure in spiders, suggesting that the use of apoptosis as a driving force in epithelial sheet migration could be a conserved feature through evolution (Prpic and Damen, 2005).

More recently, another model emerged for studying apoptosis-dependent morphogenesis: the epithelial folding of the developing fly leg (Greenhalgh, 1998). This tissue is a circumferential epithelial monolayer around which folds develop, thus forming presumptive joints that separate each tarsal segment of the future leg. In this cylindrical tissue, apoptosis occurs in a very restricted and stereotyped pattern, forming ring-like domains defined by the expression of the pro-apoptotic genes *reaper* and *hid* and corresponding to each presumptive joint of the distal part of the leg. Within each ring, apoptosis follows a particular spatio-temporal pattern: (Cheng et al., 2009) (i) it is detected before and during fold formation and no longer once folds are formed; (ii) its rate follows a decreasing gradient from ventral to dorsal and (iii) it appears first in ventral and then progresses to more lateral and dorsal regions. Its role is critical since blocking apoptosis using drugs or genetic approaches abolishes fold formation, while ectopic induction of apoptosis in several rows of cells in a flat epithelium, such as the developing wing, creates an ectopic fold (Monier et al., 2015; Manjon et al., 2007). Interestingly, loss-of-function of the transcription factor *Dysfusion* affects the distribution of apoptotic events: rather than being localised in the presumptive fold domain, dying cells are randomly distributed within the developing leg. In this genetic background, despite the same number of apoptotic events, epithelial folds do not form (Cordoba and Estella, 2014). This supports the idea that local concentration of apoptotic events is of prime importance for apoptotic cells to trigger tissue folding. A corpus of evidence supports the notion that apoptotic cells generate a mechanical force in *Drosophila* imaginal tissues. First, apoptotic cells reduce their apical surface while keeping strong adhesion to their neighbours. Then, an apico-basal cable-like structure of actomyosin forms, concomitant with the apico-basal deformation of the surrounding epithelium, as shown by live imaging (Fig. 1C). Since inhibition of myosin II specifically within dying cells prevents apical surface deformation, apoptotic cells appear to be responsible for generating these transient apico-basal forces. Second, in response to apoptosis, actomyosin accumulates apically in surrounding cells which stretch during folding; both cell shape changes and actomyosin accumulation are

lost when apoptosis is blocked. This myosin II accumulation which extends from the closest apoptotic cell neighbours to the farthest ones along the fold line, sometimes even connecting different apoptotic cells, is a non-autonomous effect of dying cells (Monier et al., 2015). Interestingly, when ectopic apoptosis is induced in the wing disc, apical accumulation of myosin II is observed within the tissue, but lost when myosin II is specifically inhibited in apoptotic cells. These data indicate that myosin II accumulation depends on the apoptotic force and corresponds to transmission of this force to neighbours. Importantly, this pool of myosin has to be distinguished from the outer ring involved in apoptotic cell extrusion. Indeed, with or without myosin II activity in apoptotic cells, extrusion still occurs following the formation of an actomyosin cortical belt at the neighbours' adherens junctions, as described in other systems (Rosenblatt et al., 2001; Kuipers et al., 2014). These data thus support the notion that, in columnar epithelia, the apoptotic apico-basal force, and not the extrusion process, triggers local recruitment of myosin II in the surrounding tissue prior to cell shape change and fold formation (Monier et al., 2015). Therefore, the apico-basal apoptotic force could constitute the initial mechanical signal responsible for the accumulation of myosin II in the whole fold domain required for tissue folding (Fig. 1C).

2. Modelling apoptosis

It has been proposed that apoptosis may dissipate tissue mechanical stress during development (Lecuit & Le Goff, 2007; Shraiman, 2005; Hutson et al., 2003). Conversely, as reported in Section 1, recent experimental findings have made it necessary to take into account the direct action of apoptotic cells on their neighbours. Therefore, physical descriptions of apoptosis-induced changes in tissue properties have been developed to account for morphogenetic phenomena. First, the balance between death and growth may contribute to maintaining a homeostatic pressure (p_h) inside the tissue. Joanny and colleagues have modelled this relationship using a continuum mechanical model where small variations of pressure $p - p_h$ are equated to the net rate of cell production that results from cell division (k_d) and apoptosis (k_a) as per $\chi(p - p_h) = \alpha(k_d - k_a)$, where χ denotes the compressibility of the tissue. They have shown in this way that an epithelium monolayer able to deform vertically will form villi and crypts in correlation with low and high levels of cell death (Ranft et al., 2010; Hannezo et al., 2011).

In addition, apoptotic events are associated with increased local contractility around the dying cells, as detailed in Section 1. It has been suggested that the subsequent tension may propagate throughout the tissue and thus produce large-scale deformation. This hypothesis has been mostly tested in model epithelia, the best-documented tissue in the field.

At the coarsest scale, continuum mechanics is an approach to model mechanical changes without precise biological cell behaviour input. For instance, dorsal closure in the *Drosophila* embryo (see Section 1) has been described by Kiehart and colleagues as a supracellular purse-string that separates the amnioserosa region from the surrounding epidermis (Toyama et al., 2008; Kiehart et al., 2000). This purse-string, consisting of a contractile actin cable, acts in the model with its own tension (T) as well as with specific zipping dynamics derived from velocity measurements, and is supported by a difference in stress between the internal and external regions, ultimately yielding the closure of the amnioserosa (Fig. 2A). Evidence of a correlation between the occurrence of apoptosis in the amnioserosa, and higher amnioserosa stress (σ_{AS}) and cable zipping rate (k_z) has been established (Toyama et al., 2008): apoptosis is represented in the model by an increase in these two parameters (Hutson et al., 2003; Layton et al., 2009). Thus, until now, in mechanical models of dorsal closure, the contribution of apoptotic force has been only integrated in more global parameters (Wang, Feng and Pismen, Biophysical journal, 2012). This calls for additional knowledge about the mechanisms whereby apoptotic cells influence tissue mechanical properties.

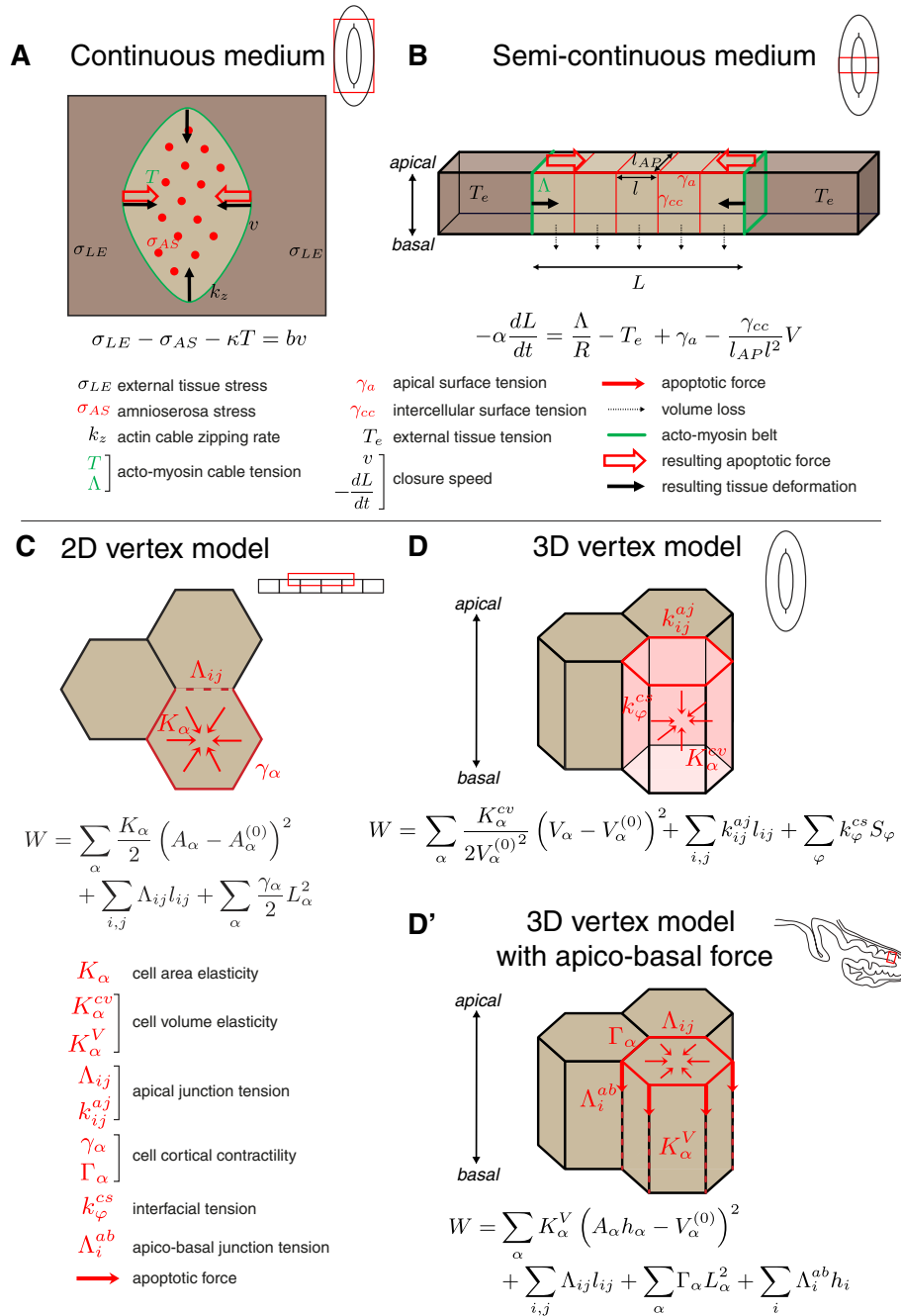


Fig. 2. Modelling approaches for apoptosis. (A) Continuous medium approach for dorsal closure in the *Drosophila* embryo. Force balance involves stress within the amnioserosa (σ_{AS}) and in the surrounding lateral epidermis (σ_{LE}), as well as the tension T applied by the supracellular contractile acto-myosin purse-string. Apoptosis (red dots) in the amnioserosa is modelled by increasing both σ_{AS} and the zipping rate k_z , which accelerates the closure. κ denotes the curvature of the purse-string, v the closure speed and b an effective viscosity (Hutson et al., 2003; Layton et al., 2009). (B) Semi-continuous approach for dorsal closure based on experimental measurements of cell shrinkage and acto-myosin cable dynamics. Force balance relates closure speed $-dL/dt$ to the tension Λ of the acto-myosin cable, the tension within the lateral epidermis T_e , the apical surface tension γ_a and the intracellular pressure γ_{cc}/l . V denotes cell volume, l and l_{AP} cell lateral and antero-posterior dimensions respectively and $1/R$ the curvature of the acto-myosin cable (Saia et al., 2015). (C) 2D vertex approach for apical constriction in a monolayer epithelium. The shape of cells results from three physical contributions: cell elasticity (K) and cortical junction contractility (spring constant γ) pertaining to a given cell (α) and junctional line tension Λ corresponding to a given pair of vertices (ij). A and L denote cell area and perimeter respectively and l denotes junction length; $A^{(0)}$ corresponds to the preferred area of a given cell. The minimisation of the energy function W over all vertices yields cell shape in the tissue at equilibrium (Farhadifar et al., 2007). Apoptosis may then be modelled by altering either of the three components in one or several cells (Kuipers et al., 2014). (D) 3D vertex approach with surface energy. The energy function involves the volume elasticity K^{cv} of a cell α , the apical junction line tension k^{aj} of a junction (ij) and the surface tension k^{cs} relative to an interface φ . Here V , l and S denote respectively cell volume, apical junction length and interface area. Apoptosis is modelled by changes in the interfacial energy in one or several cells which leads to gradual shrinkage and then fusion with the nearest cell neighbour (Okuda et al., 2015). (D') 3D vertex approach with apico-basal force for fold formation in the *Drosophila* leg disc. This model extends the 2D vertex model by the addition of an apico-basal line tension Λ^{ab} that operates on the vertical cell-cell junctions. Λ and Γ correspond to the line tension and cortical contractility respectively as in the 2D vertex model (C) and K^V denotes cell volume elasticity. A , h , L and $V^{(0)}$ denote the area, height, perimeter and preferred volume of a cell α ; l the length of an apical junction (ij) and h the height of an apico-basal junction i . Apoptotic cells undergo shrinkage as in the previous vertex models, but this one also includes increased apico-basal tension in apoptotic cells and apical contractility in the neighbours, both necessary for cell shape remodelling and fold formation (Monier et al., 2015).

For instance, Salbreux, Solon and colleagues have recently reported a physical description of the morphogenetic role of cell shrinkage in the context of dorsal closure (Saia et al., 2015). Following previous work (Toyama et al., 2008; Hutson et al., 2003), they model the amnioserosa region as an array of cuboidal cells, each of which is subjected to the force balance of apical surface tension γ_a and intracellular pressure $P = \gamma_{cc}/l$ (Fig. 2B). Closure of the amnioserosa as a whole ($-dL/dt$) is hampered by tension in the epidermis (T_e) but favoured by the contractile actin cable characterized by its line tension (Λ) and curvature radius (R). The dynamics of this system are further guided by an empirical shrinkage of amnioserosa cells during dorsal closure, based on temporal measurements of cell volume (V). Simulations suggest that changes in cell shrinkage and cable tension disrupt the equilibrium state between the two regions, thus favouring dorsal closure (Saia et al., 2015).

These models consider mechanical forces at the tissue scale without translating the molecular mechanisms identified at the cellular scale. In order to take into account cell-scale processes and study their long-range effects on the tissue, vertex models have been developed, following the recent experimental advances in apoptotic cell behaviour. They serve to translate, in terms of cell geometrical and mechanical properties, processes such as actomyosin rosette formation, apical constriction, cell extrusion (Rosenblatt et al., 2001; Kuipers et al., 2014) and apico-basal deformation (Monier et al., 2015) while taking into account the maintenance of adhesive forces, which have been shown to be essential for apoptotic cell extrusion (Lubkov and Bar-Sagi, 2014). Most of these models rely on the description of a monolayer as a two-dimensional (2D) polygonal tiling with an energy function W , as proposed by Jülicher and colleagues (Farhadifar et al., 2007). More precisely, three energy terms of distinct physical origins are involved: (i) area elasticity (K), which relates to the cost of a cell moving away from the preferred cell size ($A^{(0)}$); (ii) line tension (Λ), accounting for the cohesion forces at the junctions of neighbouring cells and which may involve both adhesion and cortex tension; and (iii) contractility (γ) of the cell perimeter, where cortical components such as junctional actomyosin and adhesion molecules are modelled as elastic elements (Fig. 2C). The principle of this approach consists in minimising the energy over all vertices in order to derive the configuration that corresponds to force balance. This way, cell shape at stationary conditions may be related to specific mechanical contributions within the cell as well as to the topology of the network. Moreover, this approach may be advantageously used to follow discrete-time evolution of the monolayer towards equilibrium, or to connect different epithelial processes within a tissue, such as morphogenesis and apoptosis.

Based on this 2D vertex model, Charras and colleagues have altered the three energy terms one by one in a given cell to replicate its apoptosis-driven apical constriction (Kuipers et al., 2014) (Fig. 2C). By performing numerical simulations of a monolayer with a realistic set of parameter values retrieved from experiments, they were able to show that a halved elastic modulus of the apoptotic cell or higher elastic modulus of the cells neighbouring the dying cell cannot account alone for apical surface reduction, nor can mere loss of intercellular adhesion. In contrast, observations on apical constriction were found to be compatible with a fivefold increase in cortical contractility or, alternately, an increase of junctional adhesion energy in the neighbouring cells (Kuipers et al., 2014). In addition to discriminating between different mechanical contributions at the cellular scale, the Jülicher 2D vertex model has also been used to examine the role of cell death in tissue size control (Kursawe et al., 2015). Fletcher and colleagues implemented cell death in a monolayer tissue by removing cells, the apical surface area of which had decreased below a given threshold during the course of the evolution of the system towards equilibrium. Without explicitly referring to any specific apoptotic process, cell removal led to a reorganisation of the cell network. Ultimately, removal, division and intercalation achieve regulation of tissue size in this context where only passive mechanical forces are assumed to be present in the tissue (Kursawe et al., 2015).

Due to its powerful means of comparing mechanical processes over cellular and tissular scales, the vertex model has recently been extended to three dimensions (3D) in order to describe experimental reports of 3D apoptosis-induced epithelial morphogenesis, *i.e.* including deformation along the apico-basal direction. Different approaches have been followed, depending on the physical variables the models emphasize.

Thus, Okuda and co-workers have proposed a 3D vertex description based on interfacial interactions (Fig. 2D) (Okuda et al., 2015). The energy to be minimised is expressed as a general function of three terms: it preserves cell elasticity K^{cv} (relative to volume instead of area) and apical junction line tension K^{lj} but acquires an additional term of extracellular interaction related to surface tension K^{cs} of the cell-cell or cell-substrate interfaces, which makes it possible to include basal adhesion. In this setting, the apoptotic process of a cell is modelled by gradual shrinkage and then fusion with the nearest cell neighbour, *i.e.* disappearance without loss of network integrity. Okuda and co-workers apply this vertex model to a spherical monolayer epithelium and show localised flattening driven by region-specific apoptosis.

Alternatively, Gay and colleagues have kept the junctional basis of the vertex description (Fig. 2D') (Monier et al., 2015): this model retains the fundamental partition of the Jülicher model into cell elasticity (K^V) (with volume instead of area as well), apical junction line tension (Λ) and apical cortex spring-like contractility (Γ). However, it is completed by a fourth component that accounts for the observed apico-basal deformation (see Section 1) and is modelled as line tension on the apico-basal intercellular junctions (Λ^{ab}). Thus this approach focuses on the putative actors of cell shape change that are the junctional actomyosin structures and the apico-basal myosin cable. This description was instrumental in highlighting the importance of the spatial pattern of apoptotic events to deform the tissue, and predicting a relationship between the density of apoptotic cells and the extent of the fold (Monier et al., 2015). These numerical simulations have also been able to uncouple the relative roles of apical contractility and apico-basal force in cell shape and tissue remodelling respectively; and point at an essential role of an apico-basal force to form a fold in a cylindrical monolayer epithelium model.

Overall, a few distinct physical models have been used to account for morphogenesis driven by apoptotic forces. At the tissue scale, the active contribution of apoptosis has often been translated as higher stress. Only following experimental demonstration has the actual mechanism responsible for such a connection been explicitly included, as for instance cell shrinkage during dorsal closure of the *Drosophila* embryo. At cellular scale, the vertex model allows a much more detailed description of intercellular interactions. Indeed, it highlights the geometry of the cells within the tissue, which helps assign specific parameter values to an individual cell, or even to its parts. This has made it possible to evaluate the contribution of distinct processes (junction contractility, cell elasticity or apico-basal force generation) towards a particular morphological behaviour such as apical constriction or fold formation. Interestingly, most models tend to be wrought in accordance with experimental results, ensuring better adequacy between data and theory. This tendency will undoubtedly benefit the study of the apoptotic force, as this process is thought to be involved in several other contexts that have not yet received a physical description (Teng & Toyama, 2011).

3. The need to revisit other morphogenetic movements

Recent evidence that the elimination of cells by apoptosis is far from being neutral for its surrounding, influencing tissue mechanical properties, led us to reassess the different cellular aspects characterized in other model systems in which apoptosis is known to be involved. Namely, we will summarize in this part of the review our current knowledge on the influence of apoptosis on (i) migration and (ii) invagination processes.

3.1. Migration

As discussed previously, apoptotic cells can influence the migration speed of an epithelial sheet by changing the mechanical properties of the neighbouring tissue, a role that has been studied exclusively during dorsal closure in *Drosophila*. However, it is tempting to speculate that apoptosis could be actively involved in other migration processes. Indeed, apoptosis is known to occur in different processes such as wound healing and abdomen morphogenesis. Similarly to dorsal closure, these processes include concentric migration and fusion of two epithelial sheets that move towards one another concomitantly with the elimination of the tissue in-between.

3.1.1. Wound healing

Wound healing involves a well-characterized sequence of events including rapid increase of specific cell populations that prepare the healing. These are neutrophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts which drive resistance to infection, phagocytosis, production of growth factors and extracellular matrix components, proliferation and vascularity - populations that ultimately need to be eliminated for the

wound to close properly. Although these cells can be eliminated by different mechanisms, apoptosis seems to be their main means of disappearance, avoiding tissue damage or inflammation (Brown et al., 1997; Greenhalgh, 1998). Interestingly, apoptosis is mainly limited to the wound edge and follows the advancing epithelial edge as healing progresses (Fig. 3B). Dysregulation of apoptosis induces pathological forms of healing such as excessive scarring and fibrosis (Brown et al., 1997; Greenhalgh, 1998). Although nothing is known about a potential mechanical role of apoptotic cells in this process, dorsal closure has long been proposed as a model of wound healing based on important similarities (Belacortu & Paricio, 2011) (including the presence of apoptosis between two migrating epithelial and of a contractile actin cable at the leading edge). Thus, it would be interesting to push the analogy further by testing the potential role of the apoptotic force in wound healing.

3.1.2. Abdomen morphogenesis

During *Drosophila* metamorphosis, the epidermis of the adult abdomen forms through cell proliferation, migration, fusion, extrusion and apoptosis with the progeny of histoblasts replacing larval epidermal cells (LECs). Histoblasts are already present in the larval tissue and are

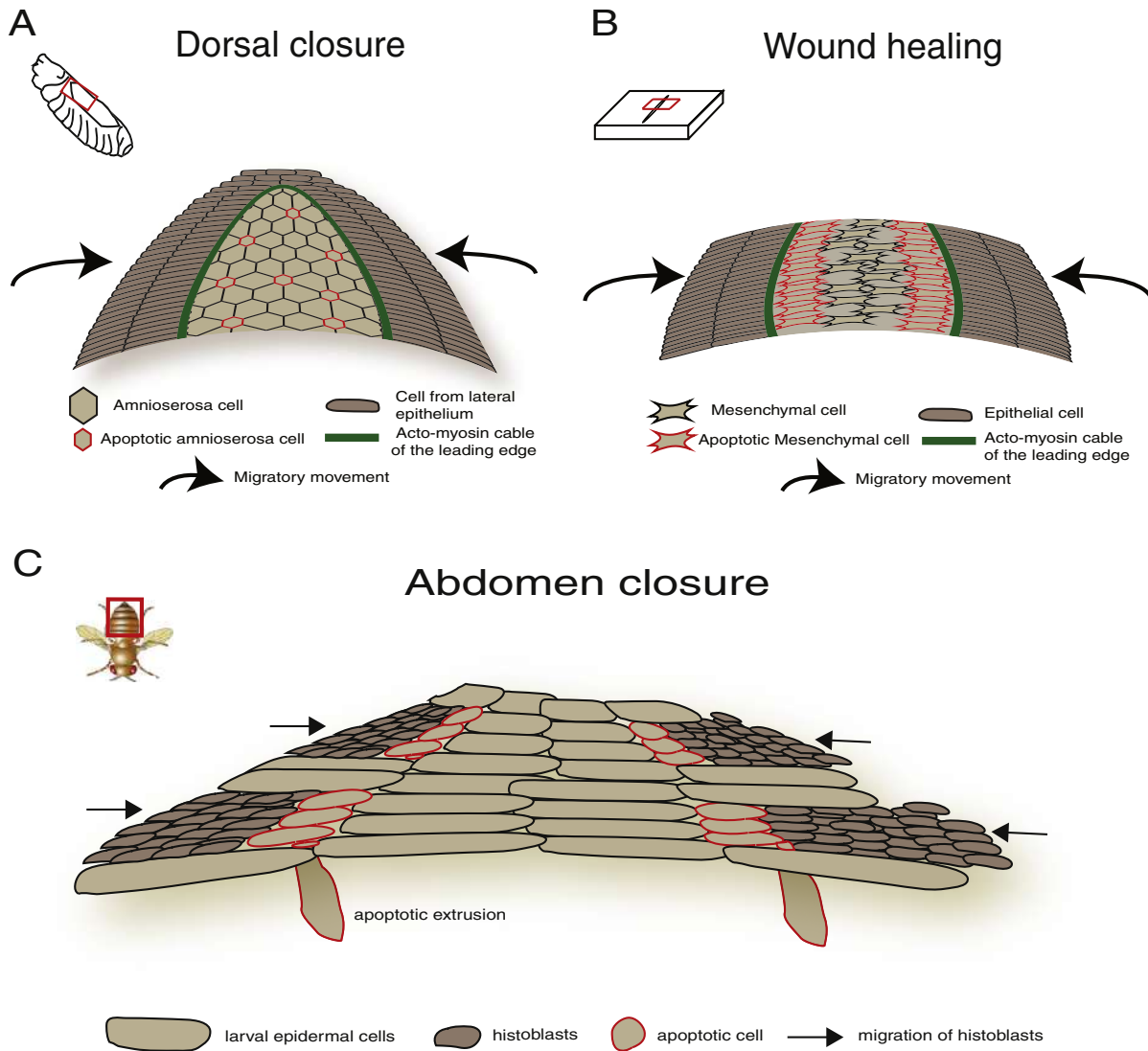


Fig. 3. Apoptosis-dependent migration. (A) *Dorsal closure* – In the dorsal part of the *Drosophila* embryo, the amnioserosa (light brown) is replaced by the neighbouring epithelium (dark brown) through a migratory process (arrows) driven by the leading edge (green). Some amnioserosa cells undergo apoptosis (red), causing apical constriction and the appearance of “rosette” like structures. (B) *Wound healing* – After wounding, mesenchymal cells (light brown) are recruited before being degraded by apoptosis (red) at the boundary with the neighbouring epithelium (dark brown). (C) *Abdomen closure* – During *Drosophila* abdomen morphogenesis, histoblasts nests (dark brown) expand and replace the Larval Epidermal Cells (LECs – light brown). At the interface between the two cell populations, LECs will undergo apoptosis (red) and be extruded out of the tissue.

organized in nests embedded amongst LECs. Four histoblast nests exist amongst each hemisegment of the larva: the anterior dorsal, the posterior dorsal, the ventral and finally the spiracular one; all nests expand at the onset of metamorphosis, then fuse and migrate towards the ventral and dorsal midlines, replacing larval cells (Madhavan & Madhavan, 1980; Ninov et al., 2007). Interestingly, it has been described that, similarly to dorsal closure, histoblasts from each hemisegment align along midlines (Bischoff and Cseresnyes, 2009). Concomitantly, LECs undergo extensive and orientated migration before being extruded from the epithelium and eliminated by apoptosis (Bischoff, 2012). This apoptotic phenomenon appears to be essential for proper abdomen morphogenesis as the inhibition of LEC apoptosis induces defects in the adult organ (Kester & Nambu, 2011).

At the cellular scale, LEC apoptosis correlates with their apical constriction and their extrusion out of the epithelium (Ninov et al., 2007). Moreover, this apoptosis occurs principally at the interface between histoblasts and LECs. Close coordination is required between the two types of cells as absence of histoblast proliferation induces a delay in triggering LEC apoptosis while apoptosis is needed for proper histoblast nest expansion (Ninov et al., 2007; Nakajima et al., 2011). Thus, histoblasts and apoptotic LECs both actively contribute to abdomen closure (Fig. 3C).

Considering the similarities between abdomen morphogenesis and dorsal closure, one may hypothesize that apical constriction of apoptotic LECs might induce both the reorganisation of apical surfaces in neighbouring cells, as well as the generation of forces contributing to histoblast migration and abdomen closing (Fig. 3). Another point in favour of this hypothesis is the fact that in some cases, a fold is present at the boundary between histoblasts and LECs (Bischoff & Cseresnyes, 2009). Such a deformation is reminiscent of the generation of a fold in the epithelium by the apoptotic force during *Drosophila* leg morphogenesis (Monier et al., 2015) and suggests that forces are most probably exerted at the histoblast/LEC boundary. Future work will be required to test this hypothesis.

3.2. Invagination

Tissue invagination or folding converts 2D into 3D structures and constitutes a fundamental morphogenetic event. Thus, animal morphogenesis could be compared to origami (Joshi & Davidson, 2012), which consists in the creation of a 3D shape by transforming an initially flat sheet of paper through sequential folding actions. Similarly, during animal morphogenesis, simple flat epithelia are converted into complex three-dimensional structures following a series of local tissue folding. Obviously, the analogy is incomplete as, contrary to the sheet of paper, animal tissues grow, die and other events such as cell intercalation and migration also take place during morphogenesis. Yet, the fundamental principle of converting 2D into 3D structures by local folding is common.

Epithelium folding is usually associated with cell apical constriction (Sawyer et al., 2010). Mesoderm invagination in *Drosophila*, a well-studied model of tissue invagination, has led to the discovery that pulsed contractions of actomyosin at the subapical cortex drive cell surface constriction, provided that a second pool of actomyosin stabilises the constricted shape (Martin et al., 2009). This necessitates a tight coupling with adherens junctions (Martin et al., 2010; Roh-Johnson et al., 2012). This ratchet mechanism, generated in each mesodermal cell, provides the force to create tissue bending and eventually invagination. Tissue bending may also occur through alternative strategies such as basal adherens junction repositioning (Wang, Kahn, Kaschube & Wieschaus, 2012) or force generation by apoptotic cells (Monier et al., 2015), as discussed in section 1 with *Drosophila* leg folding. Interestingly, apoptosis is also involved in tissue folding in other model systems: segmental groove formation in the fly embryonic epithelium and neural tube folding in vertebrates (Lohmann et al., 2002; Yamaguchi et al., 2011; Weil et al., 1997).

During *Drosophila* embryogenesis, evenly spaced grooves appear at stage 12, dividing the embryo into segmental units. In the head, morphogenesis of the groove that separates mandibular and maxillary segments is under the control of the homeotic gene *Deformed* which regulates expression of the proapoptotic gene *reaper* (Lohmann et al., 2002). Just prior to groove formation, *reaper* expression is detected between those head segments. Local apoptosis is both necessary and sufficient for groove formation in this region since absence of cell death prevents tissue remodelling and local expression of *Reaper* in *Deformed* mutant embryos restores groove formation (Lohmann et al., 2002). In the posterior region of the embryo, the homeotic gene *Abdominal-B* (*Abd-B*) also regulates *reaper* expression. This local induction of apoptosis contributes to the correct formation of the folds that separates the posterior abdominal segments (Lohmann et al., 2002) (Fig. 4A) However, the cellular mechanism by which cell death triggers folding has not been addressed yet.

Another model of tissue folding involving a yet unknown apoptosis-dependent mechanism is the bending of the neural tube (Fig. 4B). Formation of the neural tube starts with thickening of the neuroectoderm. Then, local apical constriction is associated with bending first at the medial hinge point (MHP) and in a second step, at the dorsolateral hinge points (DLHP), bringing together the two dorsal edges that eventually fuse. Apoptosis takes place essentially in the DLHP and in the dorsal-most region where fusion takes place. Both in chicken and mice, blocking apoptosis impairs closure of at least some regions of the neural tube while others close properly (Yamaguchi et al., 2011; Weil et al., 1997; Massa et al., 2009). Live imaging of murine neural tube closure suggests that apoptosis modulates the speed of closure. This led to the hypothesis that, in addition to apoptosis, other mechanisms may collaborate with actomyosin apical constriction to drive neural tube closure in a defined time window (Yamaguchi et al., 2011).

Cytoskeletal dynamics during apoptosis in mammalian tissues is currently unknown. However, in *Drosophila*, the apico-basal cable-like structure of myosin forms both in embryonic tissue as well as in developing adult tissue (Monier et al., 2015). This supports the hypothesis that the apico-basal force is a general property of apoptotic cells in columnar epithelia, providing a mechanical signal transmitted to the neighbouring cells to modify their mechanical properties and to induce tissue remodelling. Further research on these model systems should provide insight into generic versus specific mechanical properties of apoptotic cells during invagination processes.

4. A forgotten actor in tissue mechanics: The extracellular matrix

Another important actor in tissue remodelling is the extracellular matrix (ECM). Indeed, extracellular matrix composition and organization are key factors of the mechanical properties of tissues (Haigo & Bilder, 2011; Pastor-Pareja & Xu, 2011; Harunaga et al., 2014). The extracellular matrix is mainly composed of four major components: laminin, nidogen, perlecan and collagen. Some of them are already known to play a mechanical role in maintaining tissue shape (Haigo & Bilder, 2011; Pastor-Pareja & Xu, 2011). Indeed, at least in *Drosophila*, collagen increases matrix rigidity whereas perlecan lowers it, favouring tissue resistance to stretching forces (Pastor-Pareja & Xu, 2011). Thus, the physical properties inherent to the matrix depend directly on its composition and on the relative proportion of each component. One efficient way to mechanically affect cells could therefore be to modify their extracellular matrix. Most of the studies investigating the link between apoptotic cells and extracellular matrix have focused on the anoikis phenomenon, which corresponds to a particular type of apoptosis induced by adhesion loss. Thus, the common view is that apoptotic cells are not active effectors of matrix remodelling. However, few studies have revealed different relations between extracellular matrix and apoptosis and may be used as a stepping-stone to redefine the role of apoptotic cells in modifying the mechanical properties of a tissue by acting upon the extracellular matrix.

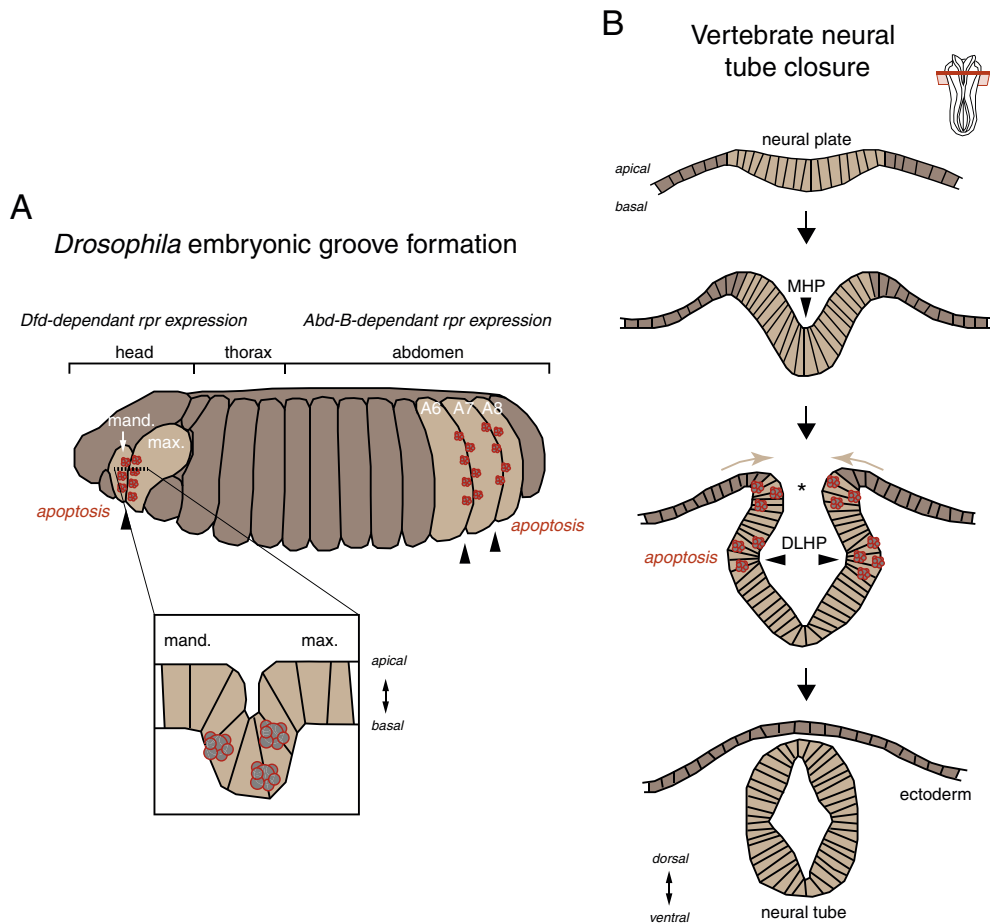


Fig. 4. Apoptosis-dependent invagination. (A) In the *Drosophila* embryo, the homeotic gene *Dfd* triggers apoptosis (red) between mandibular (mand.) and maxillary (max.) segments while the *Abd-B* gene induces apoptosis between abdominal segments A6, A7 and A8. Apoptosis is necessary for the correct formation of grooves between those segments (arrowheads). Note that apoptosis taking place in other regions of the embryo is not depicted for simplicity. (B) During formation of the vertebrate neural tube, the neuroectoderm initially thickens to form the neural plate that first bends at the medial hinge point (MHP, arrowhead). The neuroepithelium then bends at dorsolateral hinge points (DLHP, arrowheads) and the dorsal sides eventually fuse to form the neural tube (region indicated by the star). Apoptosis (red) takes place in the dorsal region and contributes to the stereotyped closure of the tube.

One example is the *Drosophila* embryo, where it has been shown that deposition of the proteoglycan-like molecule Papilin within the extracellular matrix surrounding the nerve cord, the gut and the trachea can be modulated by apoptosis (Hortsch et al., 1998). Hortsch and colleagues show that haemocytes are the main producers of Papilin in the embryo. As Papilin deposition occurs preferentially around organs where apoptosis is present, the authors postulate that this deposition might be linked to the role of haemocytes in clearing apoptotic corpses. Indeed, when apoptosis is blocked, Papilin deposition is reduced around organs such as the gut, malpighian tubules or tracheal system; this reduction correlates with the level of apoptosis normally present in these organs, suggesting that apoptosis may in fact influence ECM composition. Interestingly, Papilin deposition around the central nervous system is thought to help restrict axon pathfinding. Growing evidence indicates that orientation and growth of axons and nervous system related cells may be regulated by mechanical cues (Koser et al., 2015; Franze et al., 2009; Moshayedi et al., 2014). Therefore, apoptosis-dependent Papilin deposition could modify the mechanical properties of the neural lamina and participates in axon pathfinding regulation and nervous system development (Fig. 5A).

A second relevant example is palate fusion during mammal development (Shuler, 1995). During this process, two shelves of epithelial cells fuse to create the secondary palate. This requires adhesion of the medial edge of each epithelial layer and creates a medial edge seam which eventually undergoes apoptosis to allow both shelves to fuse. Apoptosis

has long been known to take place during palate fusion (Smiley & Dixon, 1968; Pratt & Greene, 1976). More recently a study unveiled an unexpected relationship between apoptosis and the extracellular matrix during this process (Cuervo et al., 2002). In this study, the authors show by using an elegant culture system, that apoptosis promotes degradation of the basal lamina. They show that the basal lamina remains intact when apoptosis is blocked. Moreover, by blocking matrix metalloproteases (MMPs), they ensured that matrix degradation did not promote apoptosis and observed that mesenchymal cells degenerate normally. The authors named this new process “catapoptosis” and proposed this mechanism as a way to remove the excess of extracellular matrix. Here again, apoptosis appears to actively remodel the extracellular matrix and thus potentially alters tissue mechanical properties (Fig. 5B).

In the light of these examples, we hypothesize that apoptosis may influence tissue mechanics by affecting the extracellular matrix, influencing its composition and modifying its degradation rate. Thus, apoptotic cells may affect the tension of the surviving cells through matrix modifications. Interestingly, this could be a long lasting effect since matrix proteins are thought to have a long half-life within an organism (Toyama & Hetzer, 2013). Nevertheless, in these examples, the matrix and apoptosis have yet never been regarded as potent mechanical actors. Albeit tempting, this hypothesis still needs to be tested.

Considering that apoptosis potentially influences matrix remodeling in many different model systems, it would be interesting to test

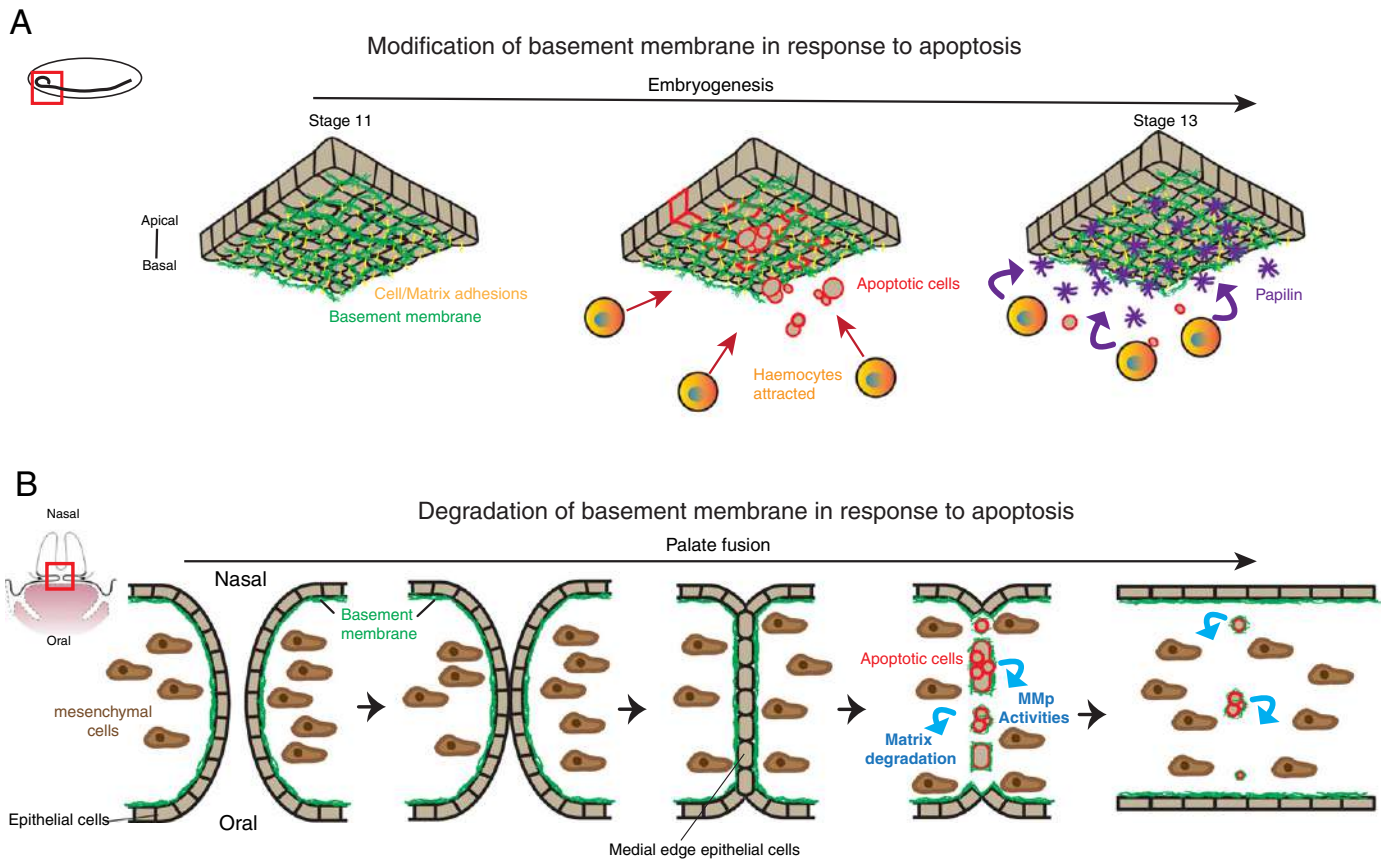


Fig. 5. Apoptosis-dependent matrix modifications. (A) *Drosophila* Embryogenesis: schematic frieze of the apoptosis occurring during *Drosophila* embryogenesis. Apoptosis is first detected during late stage 11. In the central nervous system epithelium (light brown), apoptotic cells appear (cells circle in red) and haemocytes (orange) are attracted by apoptotic corpse. Haemocytes then deposit papilin (purple) around the CNS, thus modifying the basement membrane (green) and potentially its physical properties. (B) *Palate fusion during mammal's development*: schematic frieze of the palate fusion with apoptosis and basement membrane degradation (adapted from (Cuervo & Covarrubias, 2004)). During palate fusion, two epithelial shelves (light brown) enter in contact and fuse in order to form the secondary palate. After the two shelves meet, a transitory structure appears, the Medial Edge Epithelium (MEE). Those MEE cells enter apoptosis (cells circled in red) and promote the degradation of the basement membrane (green) associated with the MEE, allowing a correct fusion process to occur.

whether apoptosis-dependent matrix remodelling is used as a general mechanism to modify tissue mechanical properties. For example, a model worth revisiting is digit individualisation in vertebrates, a well-known apoptosis-dependent morphogenetic event which involves important matrix remodelling (McCulloch et al., 2009; Montero & Hurlé, 2010).

5. Conclusion

Altogether, these data indicate that, rather than being passively eliminated as initially thought, apoptotic cells participate actively in their own elimination and further impact tissue dynamics by modifying the mechanical properties of their surroundings. From epithelial monolayers in culture to developing epithelia *in vivo*, a similar sequence of events have been reported: first, a particular acto-myosin structure is formed in the apoptotic cell (either an inner acto-myosin ring at the junction level or an apico-basal acto-myosin cable-like structure), then the apoptotic cell sends a signal to its neighbours (either biochemical or biophysical or both) eventually leading to a local change in tissue tension (formation of an outer ring or accumulation of junctional myosin between apoptotic cells). A tempting hypothesis to explain the differences observed in acto-myosin dynamics (apical junctional belt *versus* apico-basal structure) in the model systems described above is that cell geometry (flat *versus* columnar epithelium) could be responsible for acto-myosin network organization in apoptotic cells. Thus, it would be interesting to determine whether apoptotic cells tend to create a planar force in a flat epithelium and an apico-basal force in

columnar cells. An important step will be to establish the respective contributions of the different pools of acto-myosin involved in apoptotic force generation and transmission as well as the contribution of the extracellular matrix.

Morphogenesis relies on several basic cellular mechanisms including cell division, cell intercalation, cell extrusion and cell death, most of which have been shown to participate mechanically in morphogenetic processes. Cell intercalation is now well known to play an important role in tissue elongation (Bertet et al., 2004). Cell division has been shown to favour tracheal pit invagination in *Drosophila* embryos which led to the proposal that cell shape change associated with mitosis could help an epithelium buckle under pressure (Kondo & Hayashi, 2013). Cell extrusion is essential for tissue homeostasis: the extruded cell pulls on its neighbours similarly to apoptotic cells when they reduce their apex, but it also responds to pressure (Sokolow et al., 2012; Ninov et al., 2007; Eisenhoffer et al., 2012). As for apoptosis, until only recently, it was regarded as a clean, neutral way to eliminate cells that are no longer required without releasing any intracellular content (avoiding inflammation) and without impacting the surrounding cells. A large number of studies now sustain a role for apoptosis in influencing the environment through biochemical pathways (for a review, see (Fuchs & Steller, 2015)). Complementing this view, an increasing number of studies, both in cultured epithelial monolayers and developing tissues, also support the notion that apoptotic cells have an important mechanical impact on the surrounding tissue and constitute one of the key factors involved in force generation during tissue remodelling.

Funding

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement EAPF: 648001) and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

Acknowledgements

We thank Corinne Benassayag, Guillaume Gay and Melanie Gettings for comments on the manuscript.

References

- Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.L., Steller, H., 1993. *Development* 117, 29–43.
- Belacortu, Y., Paricio, N., 2011. *Dev. Dyn.* 240, 2379–2404.
- Bertet, C., Sulak, L., Lecuit, T., 2004. *Nature* 429, 667–671.
- Bischoff, M., 2012. *Dev. Biol.* 363, 179–190.
- Bischoff, M., Cseresnyés, Z., 2009. *Development* 136, 2403–2411.
- Brown, D.L., Kao, W.W., Greenhalgh, D.G., 1997. *Surgery* 121, 372–380.
- Cheng, G., Tse, J., Jain, R.K., Munn, L.L., 2009. *PLoS One* 4, e4632.
- Córdoba, S., Estella, C., 2014. *PLoS Genet.* 10, e1004621.
- Cuervo, R., Covarrubias, L., 2004. *Development* 131, 15–24.
- Cuervo, R., Valencia, C., Chandraratna, R.A., Covarrubias, L., 2002. *Dev. Biol.* 245, 145–156.
- Eisenhoffer, G.T., Loftus, P.D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C.B., Morcos, P.A., Rosenblatt, J., 2012. *Nature* 484, 546–549.
- Farhadifar, R., Röper, J.C., Aigouy, B., Eaton, S., Jülicher, F., 2007. *Curr. Biol.* 17, 2095–2104.
- Franze, K., Gerdelmann, J., Weick, M., Betz, T., Pawlizak, S., Lakadamyali, M., Bayer, J., Rillich, K., Gögler, M., Lu, Y.B., Reichenbach, A., Janmey, P., Käs, J., 2009. *Biophys. J.* 97, 1883–1890.
- Frey, B., Janko, C., Ebel, N., Meister, S., Schlücker, E., Meyer-Pittroff, R., Fietkau, R., Herrmann, M., Gaip, U.S., 2008. *Curr. Med. Chem.* 15, 2329–2336.
- Fuchs, Y., Steller, H., 2015. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 329–344.
- Greenhalgh, D.G., 1998. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1019–1030.
- Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R., Rosenblatt, J., 2011. *J. Cell Biol.* 193, 667–676.
- Haigo, S.L., Bilder, D., 2011. *Science* 331, 1071–1074.
- Hannezo, E., Prost, J., Joanny, J.F., 2011. *Phys. Rev. Lett.* 107, 078104.
- Harunaga, J.S., Doyle, A.D., Yamada, K.M., 2014. *Dev. Biol.* 394, 197–205.
- Hortsch, M., Olson, A., Fishman, S., Soneral, S.N., Marikar, Y., Dong, R., Jacobs, J.R., 1998. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 33–42.
- Hutson, M.S., Tokutake, Y., Chang, M.S., Bloor, J.W., Venakides, S., Kiehart, D.P., Edwards, G.S., 2003. *Science* 300, 145–149.
- Joshi, S.D., Davidson, L.A., 2012. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 11, 1109–1121.
- Kester, R.S., Nambu, J.R., 2011. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 109–119.
- Kiehart, D.P., Galbraith, C.G., Edwards, K.A., Rickoll, W.L., Montague, R.A., 2000. *J. Cell Biol.* 149, 471–490.
- Kondo, T., Hayashi, S., 2013. *Nature* 494, 125–129.
- Koser, D.E., Moendarbary, E., Hanne, J., Kuersten, S., Franze, K., 2015. *Biophys. J.* 108, 2137–2147.
- Kuipers, D., Mehonic, A., Kajita, M., Peter, L., Fujita, Y., Duke, T., Charras, G., Gale, J.E., 2014. *J. Cell Sci.* 127, 1229–1241.
- Kursawe, J., Brodskiy, P.A., Zartman, J.J., Baker, R.E., Fletcher, A.G., 2015. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004679.
- Layton, A.T., Toyama, Y., Yang, G.Q., Edwards, G.S., Kiehart, D.P., Venakides, S., 2009. *HFSP J.* 3, 441–460.
- Lecuit, T., Le Goff, L., 2007. *Nature* 450, 189–192.
- Levayer, R., Dupont, C., Moreno, E., 2016. *Curr. Biol.* 26, 670–677.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M., McGinnis, W., 2002. *Cell* 110, 457–466.
- Lubkov, V., Bar-Sagi, D., 2014. *Curr. Biol.* 24, 868–874.
- Madhavan, M.M., Madhavan, K., 1980. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 60, 1–31.
- Manjón, C., Sánchez-Herrero, E., Suzanne, M., 2007. *Nat. Cell Biol.* 9, 57–63.
- Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., Wieschaus, E.F., 2010. *J. Cell Biol.* 188, 735–749.
- Martin, A.C., Kaschube, M., Wieschaus, E.F., 2009. *Nature* 457, 495–499.
- Massa, V., Savery, D., Ybot-Gonzalez, P., Ferraro, E., Rongvaux, A., Cecconi, F., Flavell, R., Greene, N.D., Copp, A.J., 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8233–8238.
- McCulloch, D.R., Nelson, C.M., Dixon, L.J., Silver, D.L., Wylie, J.D., Lindner, V., Sasaki, T., Cooley, M.A., Argraves, W.S., Apte, S.S., 2009. *Dev. Cell* 17, 687–698.
- Michael, M., Meiring, J.C., Acharya, B.R., Matthews, D.R., Verma, S., Han, S.P., Hill, M.M., Parton, R.G., Gomez, G.A., Yap, A.S., 2016. *Dev. Cell* 37, 58–71.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A., Suzanne, M., 2015. *Nature* 518, 245–248.
- Montero, J.A., Hurlé, J.M., 2010. *Apoptosis* 15, 365–375.
- Moshayedi, P., Ng, G., Kwok, J.C., Yeo, G.S., Bryant, C.E., Fawcett, J.W., Franze, K., Guck, J., 2014. *Biomaterials* 35, 3919–3925.
- Nakajima, Y., Kurunaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A., Miura, M., 2011. *Mol. Cell Biol.* 31, 2499–2512.
- Ninov, N., Chiarelli, D.A., Martín-Blanco, E., 2007. *Development* 134, 367–379.
- Okuda, S., Inoue, Y., Eiraku, M., Adachi, T., Sasai, Y., 2015. *Biomech Model Mechanobiol.*
- Pastor-Pareja, J.C., Xu, T., 2011. *Dev. Cell* 21, 245–256.
- Pratt, R.M., Greene, R.M., 1976. *Dev. Biol.* 54, 135–145.
- Prpic, N.M., Damen, W.G., 2005. *Dev. Dyn.* 234, 222–228.
- Ranf, J., Basan, M., Elgeti, J., Joanny, J.F., Prost, J., Jülicher, F., 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20863–20868.
- Reed, B.H., Wilk, R., Schöck, F., Lipshitz, H.D., 2004. *Curr. Biol.* 14, 372–380.
- Roh-Johnson, M., Shemer, G., Higgins, C.D., McClellan, J.H., Werts, A.D., Tulu, U.S., Gao, L., Betzig, E., Kiehart, D.P., Goldstein, B., 2012. *Science* 335, 1232–1235.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., Cramer, L.P., 2001. *Curr. Biol.* 11, 1847–1857.
- Saias, L., Swoger, J., D'Angelo, A., Hayes, P., Colombelli, J., Sharpe, J., Salbreux, G., Solon, J., 2015. *Dev. Cell* 33, 611–621.
- Sawyer, J.M., Harrell, J.R., Shemer, G., Sullivan-Brown, J., Roh-Johnson, M., Goldstein, B., 2010. *Dev. Biol.* 341, 5–19.
- Shraiman, B.I., 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3318–3323.
- Shuler, C.F., 1995. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 202–217.
- Smiley, G.R., Dixon, A.D., 1968. *Anat. Rec.* 161, 293–310.
- Sokolow, A., Toyama, Y., Kiehart, D.P., Edwards, G.S., 2012. *Biophys. J.* 102, 969–979.
- Teng, X., Toyama, Y., 2011. *Develop. Growth Differ.* 53, 269–276.
- Toyama, B.H., Heltzer, M.W., 2013. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 55–61.
- Toyama, Y., Peralta, X.G., Wells, A.R., Kiehart, D.P., Edwards, G.S., 2008. *Science* 321, 1683–1686.
- Wang, Q., Feng, J.J., Pismen, L.M., 2012a. *Biophys. J.* 103, 2265–2274.
- Wang, Y.C., Khan, Z., Kaschube, M., Wieschaus, E.F., 2012b. *Nature* 484, 390–393.
- Weil, M., Jacobson, M.D., Raff, M.C., 1997. *Curr. Biol.* 7, 281–284.
- Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yosida, H., Miura, M., 2011. *J. Cell Biol.* 195, 1047–1060.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, M. K. & J. A. Lengyel (1991) Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective. *Genetics*, 129, 783-9.
- Abercrombie, M., J. E. Heaysman & S. M. Pegrum (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. 3. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. *Exp Cell Res*, 62, 389-98.
- Abrams, J. M., K. White, L. I. Fessler & H. Steller (1993) Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 117, 29-43.
- Adam, S. A. (2017) The Nucleoskeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle & L. Gerace (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*, 323, 560-4.
- Affolter, M., S. Bellusci, N. Itoh, B. Shilo, J. P. Thiery & Z. Werb (2003) Tube or not tube: remodeling epithelial tissues by branching morphogenesis. *Dev Cell*, 4, 11-8.
- Alam, S. G., D. Lovett, D. I. Kim, K. J. Roux, R. B. Dickinson & T. P. Lele (2015) The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci*, 128, 1901-11.
- Alatortsev, V. E., I. A. Kramerova, M. V. Frolov, S. A. Lavrov & E. D. Westphal (1997) Vinculin gene is non-essential in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, 413, 197-201.
- Alberlts, B., K. Hopkin, A. Johnson, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2019. *Essential Cell Biology*.
- Ambrosini, A., M. Gracia, A. Proag, M. Rayer, B. Monier & M. Suzanne (2016) Apoptotic forces in tissue morphogenesis. *Mech Dev*.
- Arikawa-Hirasawa, E., H. Watanabe, H. Takami, J. R. Hassell & Y. Yamada (1999) Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet*, 23, 354-8.
- Arnold, T. R., R. E. Stephenson & A. L. Miller (2017) Rho GTPases and actomyosin: Partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. *Exp Cell Res*, 358, 20-30.
- Arsenovic, P. T., I. Ramachandran, K. Bathula, R. Zhu, J. D. Narang, N. A. Noll, C. A. Lemmon, G. G. Gundersen & D. E. Conway (2016) Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys J*, 110, 34-43.
- Asano, A., K. Asano, H. Sasaki, M. Furuse & S. Tsukita (2003) Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium. *Curr Biol*, 13, 1042-6.
- Askari, J. A., P. A. Buckley, A. P. Mould & M. J. Humphries (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci*, 122, 165-70.
- Atkin-Smith, G. K. & I. K. H. Poon (2017) Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends Cell Biol*, 27, 151-162.
- Auld, A. L. & E. S. Folker (2016) Nucleus-dependent sarcomere assembly is mediated by the LINC complex. *Mol Biol Cell*, 27, 2351-9.
- Bacallao, R., C. Antony, C. Dotti, E. Karsenti, E. H. Stelzer & K. Simons (1989) The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol*, 109, 2817-32.
- Baena-Lopez, L. A., L. Arthurton, M. Bischoff, J. P. Vincent, C. Alexandre & R. McGregor (2018) Novel initiator caspase reporters uncover previously unknown features of caspase-activating cells. *Development*, 145.
- Baker, P. C. & T. E. Schroeder (1967) Cytoplasmic filaments and morphogenetic movement in the amphibian neural tube. *Dev Biol*, 15, 432-50.
- Baker, S. M., R. W. Buckheit & M. M. Falk (2010) Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biol*, 11, 15.
- Banerjee, I., J. Zhang, T. Moore-Morris, E. Pfeiffer, K. S. Buchholz, A. Liu, K. Ouyang, M. J. Stroud, L. Gerace, S. M. Evans, A. McCulloch & J. Chen (2014) Targeted ablation of nesprin 1 and nesprin 2 from murine myocardium results in cardiomyopathy, altered nuclear morphology and inhibition of the biomechanical gene response. *PLoS Genet*, 10, e1004114.
- Bays, J. L. & K. A. DeMali (2017) Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci*, 74, 2999-3009.

- Becalska, A. N. & E. R. Gavis (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development*, 136, 2493-503.
- Behr, M., D. Riedel & R. Schuh (2003) The claudin-like megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev Cell*, 5, 611-20.
- Belaadi, N., J. Aureille & C. Guilluy (2016) Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus. *Cells*, 5.
- Belaadi, N., A. Millon-Frémillon, J. Aureille & C. Guilluy (2018) Analyzing Mechanotransduction Through the LINC Complex in Isolated Nuclei. *Methods Mol Biol*, 1840, 73-80.
- Bernard, F., J. A. Lepesant & A. Guichet (2018) Nucleus positioning within *Drosophila* egg chamber. *Semin Cell Dev Biol*, 82, 25-33.
- Bertet, C., L. Sulak & T. Lecuit (2004) Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature*, 429, 667-71.
- Blanchoin, L., T. D. Pollard & R. D. Mullins (2000) Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*, 10, 1273-82.
- Bobinnec, Y., M. Fukuda & E. Nishida (2000) Identification and characterization of *Caenorhabditis elegans* gamma-tubulin in dividing cells and differentiated tissues. *J Cell Sci*, 113 Pt 21, 3747-59.
- Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner & L. Shapiro (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, 296, 1308-13.
- Bolsover, S. R., J. S. Hyams, E. A. Shephard, H. A. White & C. G. Wiedemann. 2006. *Biologie Cellulaire et Moléculaire*.
- Borghi, N., M. Sorokina, O. G. Shcherbakova, W. I. Weis, B. L. Pruitt, W. J. Nelson & A. R. Dunn (2012) E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 12568-73.
- Brady, S. T. (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 317, 73-5.
- Braga, V. M. (2002) Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 546-56.
- Braga, V. M., A. Del Maschio, L. Machesky & E. Dejana (1999) Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell*, 10, 9-22.
- Braga, V. M., L. M. Machesky, A. Hall & N. A. Hotchin (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 137, 1421-31.
- Brenner, M. D., R. Zhou, D. E. Conway, L. Lanzano, E. Gratton, M. A. Schwartz & T. Ha (2016) Spider Silk Peptide Is a Compact, Linear Nanospring Ideal for Intracellular Tension Sensing. *Nano Lett*, 16, 2096-102.
- Brodu, V., A. D. Baffet, P. M. Le Droguen, J. Casanova & A. Guichet (2010) A developmentally regulated two-step process generates a noncentrosomal microtubule network in *Drosophila* tracheal cells. *Dev Cell*, 18, 790-801.
- Broers, J. L., N. M. Bronnenberg, H. J. Kuijpers, B. Schutte, C. J. Hutchison & F. C. Ramaekers (2002) Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *Eur J Cell Biol*, 81, 677-91.
- Brown, N. H. (2011) Extracellular matrix in development: insights from mechanisms conserved between invertebrates and vertebrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Brown, N. H., S. L. Gregory, W. L. Rickoll, L. I. Fessler, M. Prout, R. A. White & J. W. Fristrom (2002) Talin is essential for integrin function in *Drosophila*. *Dev Cell*, 3, 569-79.
- Brüser, L. & S. Bogdan (2017) Adherens Junctions on the Move-Membrane Trafficking of E-Cadherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Buendia, B., A. Santa-Maria & J. C. Courvalin (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci*, 112 (Pt 11), 1743-53.
- Burridge, K. & L. Connell (1983) A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J Cell Biol*, 97, 359-67.

- Butler, L. C., G. B. Blanchard, A. J. Kabla, N. J. Lawrence, D. P. Welchman, L. Mahadevan, R. J. Adams & B. Sanson (2009) Cell shape changes indicate a role for extrinsic tensile forces in *Drosophila* germ-band extension. *Nat Cell Biol*, 11, 859-64.
- Cadigan, K. M. & M. Peifer (2009) Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002881.
- Cai, D., S. C. Chen, M. Prasad, L. He, X. Wang, V. Choesmel-Cadamuro, J. K. Sawyer, G. Danuser & D. J. Montell (2014) Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157, 1146-59.
- Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes & M. H. Ginsberg (1999) The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, 274, 28071-4.
- Campbell, I. D. & M. J. Humphries (2011) Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Campàs, O. (2016) A toolbox to explore the mechanics of living embryonic tissues. *Semin Cell Dev Biol*, 55, 119-30.
- Canel, M., A. Serrels, M. C. Frame & V. G. Brunton (2013) E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*, 126, 393-401.
- Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua & D. Pantaloni (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136, 1307-22.
- Cartwright, S. & I. Karakesisoglou (2014) Nesprins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 29, 169-79.
- Charras, G. T. (2008) A short history of blebbing. *J Microsc*, 231, 466-78.
- Charras, G. T., J. C. Yarrow, M. A. Horton, L. Mahadevan & T. J. Mitchison (2005) Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435, 365-9.
- Chen, X., S. Kojima, G. G. Borisy & K. J. Green (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol*, 163, 547-57.
- Chowdhury, S., S. A. Ketcham, T. A. Schroer & G. C. Lander (2015) Structural organization of the dynein-dynactin complex bound to microtubules. *Nat Struct Mol Biol*, 22, 345-7.
- Chugh, P., A. G. Clark, M. B. Smith, D. A. D. Cassani, K. Dierkes, A. Ragab, P. P. Roux, G. Charras, G. Salbreux & E. K. Paluch (2017) Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat Cell Biol*, 19, 689-697.
- Chung, S., S. Kim & D. J. Andrew (2017) Uncoupling apical constriction from tissue invagination. *Elife*, 6.
- Cianfrocco, M. A., M. E. DeSantis, A. E. Leschziner & S. L. Reck-Peterson (2015) Mechanism and regulation of cytoplasmic dynein. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 31, 83-108.
- Coleman, M. L. & M. F. Olson (2002) Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ*, 9, 493-504.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar & M. F. Olson (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, 3, 339-45.
- Coopman, P. & A. Djiane (2016) Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell Mol Life Sci*, 73, 3535-53.
- Coravos, J. S. & A. C. Martin (2016) Apical Sarcomere-like Actomyosin Contracts Nonmuscle *Drosophila* Epithelial Cells. *Dev Cell*, 39, 346-358.
- Costa, M., W. Raich, C. Agbunag, B. Leung, J. Hardin & J. R. Priess (1998) A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol*, 141, 297-308.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J. B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P. D. Stahl & D. Hodzic (2006) Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*, 172, 41-53.
- Croft, D. R., M. L. Coleman, S. Li, D. Robertson, T. Sullivan, C. L. Stewart & M. F. Olson (2005) Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol*, 168, 245-55.

- Córdoba, S. & C. Estella (2014) The bHLH-PAS transcription factor dysfusion regulates tarsal joint formation in response to Notch activity during drosophila leg development. *PLoS Genet*, 10, e1004621.
- Dahl, K. N., S. M. Kahn, K. L. Wilson & D. E. Discher (2004) The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci*, 117, 4779-86.
- Davis, M. A., R. C. Ireton & A. B. Reynolds (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*, 163, 525-34.
- de Leeuw, R., Y. Gruenbaum & O. Medalia (2018) Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol*, 28, 34-45.
- Denais, C. M., R. M. Gilbert, P. Isermann, A. L. McGregor, M. te Lindert, B. Weigelin, P. M. Davidson, P. Friedl, K. Wolf & J. Lammerding (2016) Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science*, 352, 353-8.
- Denton, D., M. T. Aung-Htut & S. Kumar (2013) Developmentally programmed cell death in Drosophila. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3499-3506.
- Driver, E. C., A. Northrop & M. W. Kelley (2017) Cell migration, intercalation and growth regulate mammalian cochlear extension. *Development*, 144, 3766-3776.
- Ducuing, A. & S. Vincent (2016) The actin cable is dispensable in directing dorsal closure dynamics but neutralizes mechanical stress to prevent scarring in the Drosophila embryo. *Nat Cell Biol*, 18, 1149-1160.
- Duess, J. W., P. Puri & J. Thompson (2016) Impaired cytoskeletal arrangements and failure of ventral body wall closure in chick embryos treated with rock inhibitor (Y-27632). *Pediatr Surg Int*, 32, 45-58.
- Dupre-Crochet, S., A. Figueroa, C. Hogan, E. C. Ferber, C. U. Bialucha, J. Adams, E. C. Richardson & Y. Fujita (2007) Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol*, 27, 3804-16.
- Elhanany-Tamir, H., Y. V. Yu, M. Shnyder, A. Jain, M. Welte & T. Volk (2012) Organelle positioning in muscles requires cooperation between two KASH proteins and microtubules. *J Cell Biol*, 198, 833-46.
- Ellis, H. M. & H. R. Horvitz (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-29.
- Elosegui-Artola, A., I. Andreu, A. E. M. Beedle, A. Lezamiz, M. Uroz, A. J. Kosmalska, R. Oria, J. Z. Kechagia, P. Rico-Lastres, A. L. Le Roux, C. M. Shanahan, X. Trepas, D. Navajas, S. Garcia-Manyès & P. Roca-Cusachs (2017) Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*, 171, 1397-1410.e14.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu & S. Nagata (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 43-50.
- Fackler, O. T. & R. Grosse (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol*, 181, 879-84.
- FARQUHAR, M. G. & G. E. PALADE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17, 375-412.
- Favaloro, B., N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio & V. De Laurenzi (2012) Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4, 330-49.
- Finer, J. T., R. M. Simmons & J. A. Spudis (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368, 113-9.
- Fischer, J. A., S. Acosta, A. Kenny, C. Cater, C. Robinson & J. Hook (2004) Drosophila klarsicht has distinct subcellular localization domains for nuclear envelope and microtubule localization in the eye. *Genetics*, 168, 1385-93.
- Fischer, U., R. U. Jänicke & K. Schulze-Osthoff (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.

- Fristrom, D. & J. W. Fristrom. 1993. The metamorphic development of the adult epidermis. In *The development of Drosophila melanogaster*, eds. M. Bate & A. Martinez Arias. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fuchs, Y. & H. Steller (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147, 742-58.
- (2015) Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 329-44.
- Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H. E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer & W. Birchmeier (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol*, 4, 222-31.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto & S. Tsukita (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141, 1539-50.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura & S. Tsukita (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123, 1777-88.
- García-Alvarez, B., J. M. de Pereda, D. A. Calderwood, T. S. Ulmer, D. Critchley, I. D. Campbell, M. H. Ginsberg & R. C. Liddington (2003) Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell*, 11, 49-58.
- Gaspar, I., Y. V. Yu, S. L. Cotton, D. H. Kim, A. Ephrussi & M. A. Welte (2014) Klar ensures thermal robustness of oskar localization by restraining RNP motility. *J Cell Biol*, 206, 199-215.
- Gauger, A. K. & L. S. Goldstein (1993) The Drosophila kinesin light chain. Primary structure and interaction with kinesin heavy chain. *J Biol Chem*, 268, 13657-66.
- Gayraud, C. & N. Borghi (2016) FRET-based Molecular Tension Microscopy. *Methods*, 94, 33-42.
- Gelbart, M. A., B. He, A. C. Martin, S. Y. Thiberge, E. F. Wieschaus & M. Kaschube (2012) Volume conservation principle involved in cell lengthening and nucleus movement during tissue morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19298-303.
- Georgiou, M., E. Marinari, J. Burden & B. Baum (2008) Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol*, 18, 1631-8.
- Gill, S. R., T. A. Schroer, I. Szilak, E. R. Steuer, M. P. Sheetz & D. W. Cleveland (1991) Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol*, 115, 1639-50.
- Girdler, G. C. & K. Röper (2014) Controlling cell shape changes during salivary gland tube formation in Drosophila. *Semin Cell Dev Biol*, 31, 74-81.
- Goult, B. T., M. Bouaouina, P. R. Elliott, N. Bate, B. Patel, A. R. Gingras, J. G. Grossmann, G. C. Roberts, D. A. Calderwood, D. R. Critchley & I. L. Barsukov (2010) Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation. *EMBO J*, 29, 1069-80.
- Gracia, M., S. Theis, A. Proag, G. Gay, C. Benassayag & M. Suzanne (2019) Mechanical impact of epithelial-mesenchymal transition on epithelial morphogenesis in Drosophila. *Nat Commun*, 10, 2951.
- Grashoff, C., B. D. Hoffman, M. D. Brenner, R. Zhou, M. Parsons, M. T. Yang, M. A. McLean, S. G. Sligar, C. S. Chen, T. Ha & M. A. Schwartz (2010) Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466, 263-6.
- Green, D. R. & F. Llambi (2015) Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- Gressin, L., A. Guillotin, C. Guérin, L. Blanchoin & A. Michelot (2015) Architecture dependence of actin filament network disassembly. *Curr Biol*, 25, 1437-47.
- Grether, M. E., J. M. Abrams, J. Agapite, K. White & H. Steller (1995) The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death. *Genes Dev*, 9, 1694-708.
- Grusche, F. A., J. L. Degoutin, H. E. Richardson & K. F. Harvey (2011) The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in Drosophila melanogaster. *Dev Biol*, 350, 255-66.
- Grzanka, A. (2001) Actin distribution patterns in HL-60 leukemia cells treated with etoposide. *Acta Histochem*, 103, 453-64.

- Grzanka, A., D. Grzanka & M. Orlikowska (2003) Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol*, 66, 1611-7.
- Grzanka, D., M. Gagat & M. Izdebska (2013) Actin is required for cellular death. *Acta Histochem*, 115, 775-82.
- Gu, Y., T. Forostyan, R. Sabbadini & J. Rosenblatt (2011) Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J Cell Biol*, 193, 667-76.
- Gu, Y. & J. Rosenblatt (2012) New emerging roles for epithelial cell extrusion. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 865-70.
- Guerreiro, I. & J. Kind (2019) Spatial chromatin organization and gene regulation at the nuclear lamina. *Curr Opin Genet Dev*, 55, 19-25.
- Guilak, F. (2000) The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology*, 37, 27-44.
- Guillot, C. & T. Lecuit (2013) Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science*, 340, 1185-9.
- Guilluy, C. & K. Burridge (2015) Nuclear mechanotransduction: forcing the nucleus to respond. *Nucleus*, 6, 19-22.
- Guilluy, C., L. D. Osborne, L. Van Landeghem, L. Sharek, R. Superfine, R. Garcia-Mata & K. Burridge (2014) Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol*, 16, 376-81.
- Gumbiner, B. M. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 622-34.
- Gundersen, G. G. & H. J. Worman (2013) Nuclear positioning. *Cell*, 152, 1376-89.
- Guo, Y., S. Jangi & M. A. Welte (2005) Organelle-specific control of intracellular transport: distinctly targeted isoforms of the regulator Klar. *Mol Biol Cell*, 16, 1406-16.
- Güiza, J., I. Barría, J. C. Sáez & J. L. Vega (2018) Innexins: Expression, Regulation, and Functions. *Front Physiol*, 9, 1414.
- Hah, J. & D. H. Kim (2019) Deciphering Nuclear Mechanobiology in Laminopathy. *Cells*, 8.
- Haigo, S. L., J. D. Hildebrand, R. M. Harland & J. B. Wallingford (2003) Shroom induces apical constriction and is required for hinge-point formation during neural tube closure. *Curr Biol*, 13, 2125-37.
- Hall, E. R. & R. J. Slack (2019) The effect of divalent metal cations on the α integrin binding site is ligand and integrin specific. *Biomed Pharmacother*, 110, 362-370.
- Hampoelz, B. & T. Lecuit (2011) Nuclear mechanics in differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 668-75.
- Haque, F., D. J. Lloyd, D. T. Smallwood, C. L. Dent, C. M. Shanahan, A. M. Fry, R. C. Trembath & S. Shackleton (2006) SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*, 26, 3738-51.
- Harada, T., J. Swift, J. Irianto, J. W. Shin, K. R. Spinler, A. Athirasala, R. Diegmiller, P. C. Dingal, I. L. Ivanovska & D. E. Discher (2014) Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J Cell Biol*, 204, 669-82.
- Hartl, L., G. Huelsz-Prince, J. van Zon & S. J. Tans (2019) Apical constriction is necessary for crypt formation in small intestinal organoids. *Dev Biol*, 450, 76-81.
- Hatch, E. M. & M. W. Hetzer (2016) Nuclear envelope rupture is induced by actin-based nucleus confinement. *J Cell Biol*, 215, 27-36.
- Hay, B. A., D. A. Wassarman & G. M. Rubin (1995) Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell*, 83, 1253-62.
- Hayes, P. & J. Solon (2017) Drosophila dorsal closure: An orchestra of forces to zip shut the embryo. *Mech Dev*, 144, 2-10.
- He, B., K. Doubrovinski, O. Polyakov & E. Wieschaus (2014) Apical constriction drives tissue-scale hydrodynamic flow to mediate cell elongation. *Nature*, 508, 392-6.

- Herbomel, G., G. Hatte, J. Roul, S. Padilla-Parra, J. P. Tassan & M. Tramier (2017) Actomyosin-generated tension on cadherin is similar between dividing and non-dividing epithelial cells in early *Xenopus laevis* embryos. *Sci Rep*, 7, 45058.
- Herrmann, H. & U. Aebi (2016) Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Hildebrand, J. D. (2005) Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J Cell Sci*, 118, 5191-203.
- Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka & S. Niwa (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 682-96.
- Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, N. Kobayashi, K. K. Pfister, G. S. Bloom & S. T. Brady (1991) Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol*, 114, 295-302.
- Hodzic, D. M., D. B. Yeater, L. Bengtsson, H. Otto & P. D. Stahl (2004) Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem*, 279, 25805-12.
- Hohmann, T. & F. Deghani (2019) The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8.
- Horn, H. F. (2014) LINC complex proteins in development and disease. *Curr Top Dev Biol*, 109, 287-321.
- Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M. C. Beckerle & K. Burridge (1986) Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*, 320, 531-3.
- Huber, A. H. & W. I. Weis (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, 105, 391-402.
- Huelsmann, S., J. Yläne & N. H. Brown (2013) Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in *Drosophila* nurse cells. *Dev Cell*, 26, 604-15.
- Huh, J. R., M. Guo & B. A. Hay (2004) Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol*, 14, 1262-6.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- Irvine, K. D. & E. Wieschaus (1994) Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development*, 120, 827-41.
- Ishiyama, N., R. Sarpal, M. N. Wood, S. K. Barrick, T. Nishikawa, H. Hayashi, A. B. Kobb, A. S. Flozak, A. Yemelyanov, R. Fernandez-Gonzalez, S. Yonemura, D. E. Leckband, C. J. Gottardi, U. Tepass & M. Ikura (2018) Force-dependent allostery of the α -catenin actin-binding domain controls adherens junction dynamics and functions. *Nat Commun*, 9, 5121.
- Iwamoto, D. V. & D. A. Calderwood (2015) Regulation of integrin-mediated adhesions. *Curr Opin Cell Biol*, 36, 41-7.
- Janin, A. & V. Gache (2018) Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal Muscles. *Front Physiol*, 9, 1277.
- Jankovics, F. & D. Brunner (2006) Transiently reorganized microtubules are essential for zippering during dorsal closure in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*, 11, 375-85.
- Kametani, Y. & M. Takeichi (2007) Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat Cell Biol*, 9, 92-8.
- Kanellos, G., J. Zhou, H. Patel, R. A. Ridgway, D. Huels, C. B. Gurniak, E. Sandilands, N. O. Carragher, O. J. Sansom, W. Witke, V. G. Brunton & M. C. Frame (2015) ADF and Cofilin1 Control Actin Stress Fibers, Nuclear Integrity, and Cell Survival. *Cell Rep*, 13, 1949-64.
- Kang, F., D. L. Purich & F. S. Southwick (1999) Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration. *J Biol Chem*, 274, 36963-72.
- Karess, R. E., X. J. Chang, K. A. Edwards, S. Kulkarni, I. Aguilera & D. P. Kiehart (1991) The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by spaghetti-squash, a gene required for cytokinesis in *Drosophila*. *Cell*, 65, 1177-89.
- Keller, R., L. Davidson, A. Edlund, T. Elul, M. Ezin, D. Shook & P. Skoglund (2000) Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355, 897-922.
- Keller, R. E., M. Danilchik, R. Gimlich & J. Shih (1985) The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 89 Suppl, 185-209.

- Kerr, J. F., A. H. Wyllie & A. R. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Kiehart, D. P., C. G. Galbraith, K. A. Edwards, W. L. Rickoll & R. A. Montague (2000) Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 149, 471-90.
- Kihlmark, M., G. Imreh & E. Hallberg (2001) Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J Cell Sci*, 114, 3643-53.
- Kim, S. H., Z. Li & D. B. Sacks (2000) E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem*, 275, 36999-7005.
- King, S. J. & T. A. Schroer (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol*, 2, 20-4.
- Kiraz, Y., A. Adan, M. Kartal Yandim & Y. Baran (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*, 37, 8471-86.
- Klapholz, B. & N. H. Brown (2017) Talin - the master of integrin adhesions. *J Cell Sci*, 130, 2435-2446.
- Kobielak, A. & E. Fuchs (2004) Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 614-25.
- Kobielak, A., H. A. Pasolli & E. Fuchs (2004) Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*, 6, 21-30.
- Kojima, T. (2017) Developmental mechanism of the tarsus in insect legs. *Curr Opin Insect Sci*, 19, 36-42.
- Kondo, S., N. Senoo-Matsuda, Y. Hiromi & M. Miura (2006) DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. *Mol Cell Biol*, 26, 7258-68.
- Kong, D., F. Wolf & J. Großhans (2017) Forces directing germ-band extension in *Drosophila* embryos. *Mech Dev*, 144, 11-22.
- Kracklauer, M. P., S. M. Banks, X. Xie, Y. Wu & J. A. Fischer (2007) *Drosophila* klaroid encodes a SUN domain protein required for Klarsicht localization to the nuclear envelope and nuclear migration in the eye. *Fly (Austin)*, 1, 75-85.
- Kracklauer, M. P., H. M. Wiora, W. J. Deery, X. Chen, B. Bolival, D. Romanowicz, R. A. Simonette, M. T. Fuller, J. A. Fischer & K. M. Beckingham (2010) The *Drosophila* SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *J Cell Sci*, 123, 2763-72.
- Kreis, T. E. & W. Birchmeier (1980) Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell*, 22, 555-61.
- Kuipers, D., A. Mehonic, M. Kajita, L. Peter, Y. Fujita, T. Duke, G. Charras & J. E. Gale (2014) Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J Cell Sci*, 127, 1229-41.
- Kumar, A., M. Ouyang, K. Van den Dries, E. J. McGhee, K. Tanaka, M. D. Anderson, A. Groisman, B. T. Goult, K. I. Anderson & M. A. Schwartz (2016) Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. *J Cell Biol*, 213, 371-83.
- Lammerding, J., L. G. Fong, J. Y. Ji, K. Reue, C. L. Stewart, S. G. Young & R. T. Lee (2006) Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem*, 281, 25768-80.
- Lane, J. D., V. J. Allan & P. G. Woodman (2005) Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *J Cell Sci*, 118, 4059-71.
- Lane, J. D., M. A. Vergnolle, P. G. Woodman & V. J. Allan (2001) Apoptotic cleavage of cytoplasmic dynein intermediate chain and p150(Glued) stops dynein-dependent membrane motility. *J Cell Biol*, 153, 1415-26.
- Lecuit, T., P. F. Lenne & E. Munro (2011) Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 157-84.
- Lee, K. K., D. Starr, M. Cohen, J. Liu, M. Han, K. L. Wilson & Y. Gruenbaum (2002) Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, 13, 892-901.
- Lee, Y. L. & B. Burke (2018) LINC complexes and nuclear positioning. *Semin Cell Dev Biol*, 82, 67-76.

- Lei, K., X. Zhang, X. Ding, X. Guo, M. Chen, B. Zhu, T. Xu, Y. Zhuang, R. Xu & M. Han (2009) SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 10207-12.
- Lele, T. P., R. B. Dickinson & G. G. Gundersen (2018) Mechanical principles of nuclear shaping and positioning. *J Cell Biol*, 217, 3330-3342.
- Leptin, M. & B. Grunewald (1990) Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development*, 110, 73-84.
- Li, Y., D. Lovett, Q. Zhang, S. Neelam, R. A. Kuchibhotla, R. Zhu, G. G. Gundersen, T. P. Lele & R. B. Dickinson (2015) Moving Cell Boundaries Drive Nuclear Shaping during Cell Spreading. *Biophys J*, 109, 670-86.
- Lickert, H., A. Bauer, R. Kemler & J. Stappert (2000) Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 275, 5090-5.
- Lloyd, T. E., J. Machamer, K. O'Hara, J. H. Kim, S. E. Collins, M. Y. Wong, B. Sahin, W. Imlach, Y. Yang, E. S. Levitan, B. D. McCabe & A. L. Kolodkin (2012) The p150(Glued) CAP-Gly domain regulates initiation of retrograde transport at synaptic termini. *Neuron*, 74, 344-60.
- Long, J. B., M. Bagonis, L. A. Lowery, H. Lee, G. Danuser & D. Van Vactor (2013) Multiparametric analysis of CLASP-interacting protein functions during interphase microtubule dynamics. *Mol Cell Biol*, 33, 1528-45.
- Lowe, J. S. & P. G. Anderson. 2015. *Chapter 3 - Epithelial Cells*.
- Lubkov, V. & D. Bar-Sagi (2014) E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion. *Curr Biol*, 24, 868-74.
- Luxton, G. W., E. R. Gomes, E. S. Folker, E. Vintinner & G. G. Gundersen (2010) Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science*, 329, 956-9.
- Lyakhovetsky, R. & Y. Gruenbaum (2014) Studying lamins in invertebrate models. *Adv Exp Med Biol*, 773, 245-62.
- Machleidt, T., P. Geller, R. Schwandner, G. Scherer & M. Krönke (1998) Caspase 7-induced cleavage of kinectin in apoptotic cells. *FEBS Lett*, 436, 51-4.
- Mahajan, R. K. & J. D. Pardee (1996) Assembly mechanism of Dictyostelium myosin II: regulation by K⁺, Mg²⁺, and actin filaments. *Biochemistry*, 35, 15504-14.
- Malone, C. J., W. D. Fixsen, H. R. Horvitz & M. Han (1999) UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development*, 126, 3171-81.
- Maninova, M., J. Caslavsky & T. Vomastek (2017) The assembly and function of perinuclear actin cap in migrating cells. *Protoplasma*, 254, 1207-1218.
- Maninová, M., M. P. Iwanicki & T. Vomastek (2014) Emerging role for nuclear rotation and orientation in cell migration. *Cell Adh Migr*, 8, 42-8.
- Maninová, M., Z. Klímová, J. T. Parsons, M. J. Weber, M. P. Iwanicki & T. Vomastek (2013) The reorientation of cell nucleus promotes the establishment of front-rear polarity in migrating fibroblasts. *J Mol Biol*, 425, 2039-2055.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen & D. E. Ingber (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 849-54.
- Manjón, C., E. Sánchez-Herrero & M. Suzanne (2007) Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 9, 57-63.
- Marston, S. (2018) The Molecular Mechanisms of Mutations in Actin and Myosin that Cause Inherited Myopathy. *Int J Mol Sci*, 19.
- Martin, A. C. (2010) Pulsation and stabilization: contractile forces that underlie morphogenesis. *Dev Biol*, 341, 114-25.
- Martin, A. C., M. Gelbart, R. Fernandez-Gonzalez, M. Kaschube & E. F. Wieschaus (2010) Integration of contractile forces during tissue invagination. *J Cell Biol*, 188, 735-49.

- Martin, A. C. & B. Goldstein (2014) Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development*, 141, 1987-98.
- Martin, A. C., M. Kaschube & E. F. Wieschaus (2009) Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature*, 457, 495-9.
- Mason, F. M., M. Tworoger & A. C. Martin (2013) Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction. *Nat Cell Biol*, 15, 926-36.
- Massa, V., D. Savery, P. Ybot-Gonzalez, E. Ferraro, A. Rongvaux, F. Cecconi, R. Flavell, N. D. Greene & A. J. Copp (2009) Apoptosis is not required for mammalian neural tube closure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8233-8.
- Maurer, M. & J. Lammerding (2019) The Driving Force: Nuclear Mechanotransduction in Cellular Function, Fate, and Disease. *Annu Rev Biomed Eng*, 21, 443-468.
- Maurer, S. P., N. I. Cade, G. Bohner, N. Gustafsson, E. Boutant & T. Surrey (2014) EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Curr Biol*, 24, 372-84.
- McGrail, M., J. Gepner, A. Silvanovich, S. Ludmann, M. Serr & T. S. Hays (1995) Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the Drosophila Glued complex. *J Cell Biol*, 131, 411-25.
- Metzstein, M. M., G. M. Stanfield & H. R. Horvitz (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet*, 14, 410-6.
- Meyerzon, M., H. N. Fridolfsson, N. Ly, F. J. McNally & D. A. Starr (2009) UNC-83 is a nuclear-specific cargo adaptor for kinesin-1-mediated nuclear migration. *Development*, 136, 2725-33.
- Meşe, G., G. Richard & T. W. White (2007) Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127, 2516-24.
- Michael, M., J. C. Meiring, B. R. Acharya, D. R. Matthews, S. Verma, S. P. Han, M. M. Hill, R. G. Parton, G. A. Gomez & A. S. Yap (2016) Coronin 1B Reorganizes the Architecture of F-Actin Networks for Contractility at Steady-State and Apoptotic Adherens Junctions. *Dev Cell*, 37, 58-71.
- Miller, K. E., Y. Kim, W. K. Huh & H. O. Park (2015) Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *J Mol Biol*, 427, 2039-2055.
- Mills, J. C., N. L. Stone, J. Erhardt & R. N. Pittman (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*, 140, 627-36.
- Mockrin, S. C. & E. D. Korn (1980) Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, 19, 5359-62.
- Monier, B., M. Gettings, G. Gay, T. Mangeat, S. Schott, A. Guarner & M. Suzanne (2015) Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature*, 518, 245-8.
- Monier, B. & M. Suzanne (2015) The Morphogenetic Role of Apoptosis. *Curr Top Dev Biol*, 114, 335-62.
- Montero, J. A. & J. M. Hurlé (2010) Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis*, 15, 365-75.
- Morimoto, A., H. Shibuya, X. Zhu, J. Kim, K. Ishiguro, M. Han & Y. Watanabe (2012) A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol*, 198, 165-72.
- Morone, N., T. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura & A. Kusumi (2006) Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol*, 174, 851-62.
- Mosley-Bishop, K. L., Q. Li, L. Patterson & J. A. Fischer (1999) Molecular analysis of the klarsicht gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the Drosophila eye. *Curr Biol*, 9, 1211-20.
- Moss, D. K., V. M. Betin, S. D. Malesinski & J. D. Lane (2006) A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J Cell Sci*, 119, 2362-74.
- Moss, D. K. & J. D. Lane (2006) Microtubules: forgotten players in the apoptotic execution phase. *Trends Cell Biol*, 16, 330-8.
- Moughamian, A. J. & E. L. Holzbaur (2012) Dynactin is required for transport initiation from the distal axon. *Neuron*, 74, 331-43.

- Muguruma, M., S. Matsumura & T. Fukazawa (1990) Direct interactions between talin and actin. *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 1217-23.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser & T. D. Pollard (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6181-6.
- Muroyama, A. & T. Lechler (2017) Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development*, 144, 3012-3021.
- Mustyatsa, V. V., A. V. Boyakhchyan, F. I. Ataulkhanov & N. B. Gudimchuk (2017) EB-Family Proteins: Functions and Microtubule Interaction Mechanisms. *Biochemistry (Mosc)*, 82, 791-802.
- Myat, M. M. & D. J. Andrew (2000) Organ shape in the Drosophila salivary gland is controlled by regulated, sequential internalization of the primordia. *Development*, 127, 679-91.
- (2002) Epithelial tube morphology is determined by the polarized growth and delivery of apical membrane. *Cell*, 111, 879-91.
- Myat, M. M., R. N. Rashmi, D. Manna, N. Xu, U. Patel, M. Galiano, K. Zielinski, A. Lam & M. A. Welte (2015) Drosophila KASH-domain protein Klarsicht regulates microtubule stability and integrin receptor localization during collective cell migration. *Dev Biol*, 407, 103-14.
- Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura & J. M. Rini (1996) Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, 380, 360-4.
- Nakagawa, M., M. Fukata, M. Yamaga, N. Itoh & K. Kaibuchi (2001) Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci*, 114, 1829-38.
- Nashchekin, D., A. R. Fernandes & D. St Johnston (2016) Patronin/Shot Cortical Foci Assemble the Noncentrosomal Microtubule Array that Specifies the Drosophila Anterior-Posterior Axis. *Dev Cell*, 38, 61-72.
- Neelam, S., T. J. Chancellor, Y. Li, J. A. Nickerson, K. J. Roux, R. B. Dickinson & T. P. Lele (2015) Direct force probe reveals the mechanics of nuclear homeostasis in the mammalian cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 5720-5.
- Negoescu, A., C. Guillermet, P. Lorimier, E. Brambilla & F. Labat-Moleur (1998) Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother*, 52, 252-8.
- Negoescu, A., P. Lorimier, F. Labat-Moleur, C. Drouet, C. Robert, C. Guillermet, C. Brambilla & E. Brambilla (1996) In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*, 44, 959-68.
- Nehlig, A., A. Molina, S. Rodrigues-Ferreira, S. Honoré & C. Nahmias (2017) Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci*, 74, 2381-2393.
- Newell-Litwa, K. A., R. Horwitz & M. L. Lamers (2015) Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis Model Mech*, 8, 1495-515.
- Nikolopoulou, E., G. L. Galea, A. Rolo, N. D. Greene & A. J. Copp (2017) Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*, 144, 552-566.
- Nishida, N., C. Xie, M. Shimaoka, Y. Cheng, T. Walz & T. A. Springer (2006) Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity*, 25, 583-94.
- Nishimura, M., Y. Inoue & S. Hayashi (2007) A wave of EGFR signaling determines cell alignment and intercalation in the Drosophila tracheal placode. *Development*, 134, 4273-82.
- Nishimura, T. & M. Takeichi (2008) Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development*, 135, 1493-502.
- Nollet, F., P. Kools & F. van Roy (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299, 551-72.
- Noren, N. K., B. P. Liu, K. Burrige & B. Kreft (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol*, 150, 567-80.
- Noren, N. K., C. M. Niessen, B. M. Gumbiner & K. Burrige (2001) Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem*, 276, 33305-8.

- Nüsslein-Volhard, C. & E. Wieschaus (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287, 795-801.
- Oda, H. & S. Tsukita (1999) Nonchordate classic cadherins have a structurally and functionally unique domain that is absent from chordate classic cadherins. *Dev Biol*, 216, 406-22.
- Ojima, K. (2019) Myosin: Formation and maintenance of thick filaments. *Anim Sci J*.
- Orlando, K. A., N. L. Stone & R. N. Pittman (2006) Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res*, 312, 5-15.
- Oropesa Ávila, M., A. Fernández Vega, J. Garrido Maraver, M. Villanueva Paz, I. De Laverá, M. De La Mata, M. D. Cordero, E. Alcocer Gómez, A. Delgado Pavón, M. Álvarez Córdoba, D. Cotán & J. A. Sánchez-Alcázar (2015) Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 72, 435-46.
- Pacquelet, A., L. Lin & P. Rorth (2003) Binding site for p120/delta-catenin is not required for *Drosophila* E-cadherin function in vivo. *J Cell Biol*, 160, 313-9.
- Padmakumar, V. C., T. Libotte, W. Lu, H. Zaim, S. Abraham, A. A. Noegel, J. Gotzmann, R. Foisner & I. Karakesiosoglou (2005) The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*, 118, 3419-30.
- Pajerowski, J. D., K. N. Dahl, F. L. Zhong, P. J. Sammak & D. E. Discher (2007) Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15619-24.
- Papagrigoriou, E., A. R. Gingras, I. L. Barsukov, N. Bate, I. J. Fillingham, B. Patel, R. Frank, W. H. Ziegler, G. C. Roberts, D. R. Critchley & J. Emsley (2004) Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *EMBO J*, 23, 2942-51.
- Parisini, E., J. M. Higgins, J. H. Liu, M. B. Brenner & J. H. Wang (2007) The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol*, 373, 401-11.
- Pasakarnis, L., E. Frei, E. Caussinus, M. Affolter & D. Brunner (2016) Amnioserosa cell constriction but not epidermal actin cable tension autonomously drives dorsal closure. *Nat Cell Biol*, 18, 1161-1172.
- Pastor-Pareja, J. C. & T. Xu (2011) Shaping cells and organs in *Drosophila* by opposing roles of fat body-secreted Collagen IV and perlecan. *Dev Cell*, 21, 245-56.
- Patterson, K., A. B. Molofsky, C. Robinson, S. Acosta, C. Cater & J. A. Fischer (2004) The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol Biol Cell*, 15, 600-10.
- Pearl, E. J., J. Li & J. B. Green (2017) Cellular systems for epithelial invagination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372.
- Plastino, J. & L. Blanchoin (2018) Dynamic stability of the actin ecosystem. *J Cell Sci*, 132.
- Plessner, M., M. Melak, P. Chinchilla, C. Baarlink & R. Grosse (2015) Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *J Biol Chem*, 290, 11209-16.
- Pokutta, S. & W. I. Weis (2000) Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell*, 5, 533-43.
- Pollard, T. D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103, 2747-54.
- (2016) Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Pollard, T. D. & J. A. Cooper (1984) Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry*, 23, 6631-41.
- Prout, M., Z. Damania, J. Soong, D. Fristrom & J. W. Fristrom (1997) Autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 146, 275-85.
- Pérez-Garijo, A., Y. Fuchs & H. Steller (2013) Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *Elife*, 2, e01004.
- Pérez-Garijo, A., F. A. Martín & G. Morata (2004) Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development*, 131, 5591-8.
- Pérez-Garijo, A. & H. Steller (2015) Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 142, 3253-62.

- Pöschl, E., U. Schlötzer-Schrehardt, B. Brachvogel, K. Saito, Y. Ninomiya & U. Mayer (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*, 131, 1619-28.
- Raab, M., M. Gentili, H. de Belly, H. R. Thiam, P. Vargas, A. J. Jimenez, F. Lautenschlaeger, R. Voituriez, A. M. Lennon-Duménil, N. Manel & M. Piel (2016) ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science*, 352, 359-62.
- Ramos-Lewis, W. & A. Page-McCaw (2019) Basement membrane mechanics shape development: Lessons from the fly. *Matrix Biol*, 75-76, 72-81.
- Rao, L., D. Perez & E. White (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, 135, 1441-55.
- Rauskolb, C., S. Sun, G. Sun, Y. Pan & K. D. Irvine (2014) Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell*, 158, 143-156.
- Rauzi, M., A. Hočevár Brezavšček, P. Zihler & M. Leptin (2013) Physical models of mesoderm invagination in *Drosophila* embryo. *Biophys J*, 105, 3-10.
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Bäse, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg & H. M. Holden (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, 261, 50-8.
- Reed, B. H., R. Wilk, F. Schöck & H. D. Lipshitz (2004) Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Curr Biol*, 14, 372-80.
- Rehklau, K., C. B. Gurniak, M. Conrad, E. Friauf, M. Ott & M. B. Rust (2012) ADF/cofilin proteins translocate to mitochondria during apoptosis but are not generally required for cell death signaling. *Cell Death Differ*, 19, 958-67.
- Ridley, A. J. & A. Hall (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70, 389-99.
- Rimm, D. L., E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci & J. S. Morrow (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8813-7.
- Robaye, B., R. Mosselmans, W. Fiers, J. E. Dumont & P. Galand (1991) Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*, 138, 447-53.
- Roh-Johnson, M., G. Shemer, C. D. Higgins, J. H. McClellan, A. D. Werts, U. S. Tulu, L. Gao, E. Betzig, D. P. Kiehart & B. Goldstein (2012) Triggering a cell shape change by exploiting preexisting actomyosin contractions. *Science*, 335, 1232-5.
- Rolo, A., P. Skoglund & R. Keller (2009) Morphogenetic movements driving neural tube closure in *Xenopus* require myosin IIB. *Dev Biol*, 327, 327-38.
- Rosenblatt, J., B. J. Agnew, H. Abe, J. R. Bamburg & T. J. Mitchison (1997) *Xenopus* actin depolymerizing factor/cofilin (XAC) is responsible for the turnover of actin filaments in *Listeria monocytogenes* tails. *J Cell Biol*, 136, 1323-32.
- Rosenblatt, J., M. C. Raff & L. P. Cramer (2001) An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol*, 11, 1847-57.
- Roux, K. J., M. L. Crisp, Q. Liu, D. Kim, S. Kozlov, C. L. Stewart & B. Burke (2009) Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2194-9.
- Rozario, T. & D. W. DeSimone (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol*, 341, 126-40.
- Rusiñol, A. E. & M. S. Sinensky (2006) Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci*, 119, 3265-72.
- Ryoo, H. D., T. Gorenc & H. Steller (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell*, 7, 491-501.

- Saias, L., J. Swoger, A. D'Angelo, P. Hayes, J. Colombelli, J. Sharpe, G. Salbreux & J. Solon (2015) Decrease in Cell Volume Generates Contractile Forces Driving Dorsal Closure. *Dev Cell*, 33, 611-21.
- Salvermoser, M., D. Begandt, R. Alon & B. Walzog (2018) Nuclear Deformation During Neutrophil Migration at Sites of Inflammation. *Front Immunol*, 9, 2680.
- Sanchez-Corrales, Y. E., G. B. Blanchard & K. Röper (2018) Radially patterned cell behaviours during tube budding from an epithelium. *Elife*, 7.
- Sarkissian, T., A. Timmons, R. Arya, E. Abdelwahid & K. White (2014) Detecting apoptosis in Drosophila tissues and cells. *Methods*, 68, 89-96.
- Sattarzadeh, A., R. Saberianfar, W. R. Zipfel, R. Menassa & M. R. Hanson (2015) Green to red photoconversion of GFP for protein tracking in vivo. *Sci Rep*, 5, 11771.
- Sauer, F. (1935) Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol*, 62 377-405.
- Schott, S., A. Ambrosini, A. Barbaste, C. Benassayag, M. Gracia, A. Proag, M. Rayer, B. Monier & M. Suzanne (2017) A fluorescent toolkit for spatiotemporal tracking of apoptotic cells in living. *Development*, 144, 3840-3846.
- Sebbagh, M., C. Renvoizé, J. Hamelin, N. Riché, J. Bertoglio & J. Bréard (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3, 346-52.
- Sedzinski, J., M. Biro, A. Oswald, J. Y. Tinevez, G. Salbreux & E. Paluch (2011) Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature*, 476, 462-6.
- Shahbazi, M. N., D. Megias, C. Epifano, A. Akhmanova, G. G. Gundersen, E. Fuchs & M. Perez-Moreno (2013) CLASP2 interacts with p120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions. *J Cell Biol*, 203, 1043-61.
- Sherrard, K., F. Robin, P. Lemaire & E. Munro (2010) Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination. *Curr Biol*, 20, 1499-510.
- Shindo, A. (2018) Models of convergent extension during morphogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 7.
- Simon, D. N., M. S. Zastrow & K. L. Wilson (2010) Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. *Nucleus*, 1, 264-72.
- Singh, A., T. Saha, I. Begemann, A. Ricker, H. Nüsse, O. Thorn-Seshold, J. Klingauf, M. Galic & M. Matis (2018) Polarized microtubule dynamics directs cell mechanics and coordinates forces during epithelial morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 20, 1126-1133.
- Skinner, B. M. & E. E. Johnson (2017) Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. *Chromosoma*, 126, 195-212.
- Sokolow, A., Y. Toyama, D. P. Kiehart & G. S. Edwards (2012) Cell ingression and apical shape oscillations during dorsal closure in Drosophila. *Biophys J*, 102, 969-79.
- Sosa, B. A., A. Rothballer, U. Kutay & T. U. Schwartz (2012) LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell*, 149, 1035-47.
- Spear, P. C. & C. A. Erickson (2012) Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Dev Biol*, 370, 33-41.
- Starr, D. A. & M. Han (2002) Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science*, 298, 406-9.
- Stroud, M. J., W. Feng, J. Zhang, J. Veevers, X. Fang, L. Gerace & J. Chen (2017) Nesprin 1 α 2 is essential for mouse postnatal viability and nuclear positioning in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 216, 1915-1924.
- Sugimura, K., P. F. Lenne & F. Graner (2016) Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*, 143, 186-96.

- Sun, G. & K. D. Irvine (2011) Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol*, 350, 139-51.
- Suzanne, M. (2016) Molecular and cellular mechanisms involved in leg joint morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 55, 131-8.
- Suzanne, M., A. G. Petzoldt, P. Spéder, J. B. Coutelis, H. Steller & S. Noselli (2010) Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping. *Curr Biol*, 20, 1773-8.
- Svitkina, T. M. & G. G. Borisy (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145, 1009-26.
- Sánchez-Alcázar, J. A., A. Rodríguez-Hernández, M. D. Cordero, D. J. Fernández-Ayala, G. Brea-Calvo, K. Garcia & P. Navas (2007) The apoptotic microtubule network preserves plasma membrane integrity during the execution phase of apoptosis. *Apoptosis*, 12, 1195-208.
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg & D. A. Calderwood (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302, 103-6.
- Tajik, A., Y. Zhang, F. Wei, J. Sun, Q. Jia, W. Zhou, R. Singh, N. Khanna, A. S. Belmont & N. Wang (2016) Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater*, 15, 1287-1296.
- Takada, Y., X. Ye & S. Simon (2007) The integrins. *Genome Biol*, 8, 215.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz & T. A. Springer (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110, 599-11.
- Takaki, T., M. Montagner, M. P. Serres, M. Le Berre, M. Russell, L. Collinson, K. Szuhai, M. Howell, S. J. Boulton, E. Sahai & M. Petronczki (2017) Actomyosin drives cancer cell nuclear dysmorphia and threatens genome stability. *Nat Commun*, 8, 16013.
- Takeichi, M. (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol*, 75, 464-74.
- (1988) Cadherins: key molecules for selective cell-cell adhesion. *IARC Sci Publ*, 76-9.
- Takemoto, K., T. Nagai, A. Miyawaki & M. Miura (2003) Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 160, 235-43.
- Tamada, M., T. D. Perez, W. J. Nelson & M. P. Sheetz (2007) Two distinct modes of myosin assembly and dynamics during epithelial wound closure. *J Cell Biol*, 176, 27-33.
- Tamkun, J. W., D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz & R. O. Hynes (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46, 271-82.
- Technau, M. & S. Roth (2008) The Drosophila KASH domain proteins Msp-300 and Klarsicht and the SUN domain protein Klaroid have no essential function during oogenesis. *Fly (Austin)*, 2, 82-91.
- Tepass, U. (1999) Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 540-8.
- Theocharis, A. D., S. S. Skandalis, C. Gialeli & N. K. Karamanos (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4-27.
- Thiam, H. R., P. Vargas, N. Carpi, C. L. Crespo, M. Raab, E. Terriac, M. C. King, J. Jacobelli, A. S. Alberts, T. Stradal, A. M. Lennon-Dumenil & M. Piel (2016) Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat Commun*, 7, 10997.
- Tissot, N., J. A. Lepesant, F. Bernard, K. Legent, F. Bosveld, C. Martin, O. Faklaris, Y. Bellaïche, M. Coppey & A. Guichet (2017) Distinct molecular cues ensure a robust microtubule-dependent nuclear positioning in the Drosophila oocyte. *Nat Commun*, 8, 15168.
- Toya, M., S. Kobayashi, M. Kawasaki, G. Shioi, M. Kaneko, T. Ishiuchi, K. Misaki, W. Meng & M. Takeichi (2016) CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 332-7.
- Toya, M. & M. Takeichi (2016) Organization of Non-centrosomal Microtubules in Epithelial Cells. *Cell Struct Funct*, 41, 127-135.

- Toyama, Y., X. G. Peralta, A. R. Wells, D. P. Kiehart & G. S. Edwards (2008) Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science*, 321, 1683-6.
- Tsai, J. W., W. N. Lian, S. Kemal, A. R. Kriegstein & R. B. Vallee (2010) Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nat Neurosci*, 13, 1463-71.
- Tsujikawa, M., Y. Omori, J. Biyanwila & J. Malicki (2007) Mechanism of positioning the cell nucleus in vertebrate photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14819-24.
- Tsukita, S., H. Tanaka & A. Tamura (2019) The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem Sci*, 44, 141-152.
- Uhler, C. & G. V. Shivashankar (2017) Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 717-727.
- Umemoto, S., A. R. Bengur & J. R. Sellers (1989) Effect of multiple phosphorylations of smooth muscle and cytoplasmic myosins on movement in an in vitro motility assay. *J Biol Chem*, 264, 1431-6.
- Urnavicius, L., K. Zhang, A. G. Diamant, C. Motz, M. A. Schlager, M. Yu, N. A. Patel, C. V. Robinson & A. P. Carter (2015) The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science*, 347, 1441-1446.
- Vale, R. D., T. S. Reese & M. P. Sheetz (1985a) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42, 39-50.
- Vale, R. D., B. J. Schnapp, T. Mitchison, E. Steuer, T. S. Reese & M. P. Sheetz (1985b) Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell*, 43, 623-32.
- Varmark, H., S. Llamazares, E. Rebollo, B. Lange, J. Reina, H. Schwarz & C. Gonzalez (2007) Asterless is a centriolar protein required for centrosome function and embryo development in *Drosophila*. *Curr Biol*, 17, 1735-45.
- Vasquez, C. G., S. M. Heissler, N. Billington, J. R. Sellers & A. C. Martin (2016) non-muscle myosin II motor activity determines the rate of tissue folding. *Elife*, 5.
- Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow & J. Qin (2002) A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell*, 110, 587-97.
- Vinson, V. K., E. M. De La Cruz, H. N. Higgs & T. D. Pollard (1998) Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry*, 37, 10871-80.
- Virtanen, J. A. & M. K. Vartiainen (2017) Diverse functions for different forms of nuclear actin. *Curr Opin Cell Biol*, 46, 33-38.
- Volk, T. (2013) Positioning nuclei within the cytoplasm of striated muscle fiber: cooperation between microtubules and KASH proteins. *Nucleus*, 4, 18-22.
- Waterman-Storer, C. M., S. B. Karki, S. A. Kuznetsov, J. S. Tabb, D. G. Weiss, G. M. Langford & E. L. Holzbaur (1997) The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12180-5.
- Weil, M., M. D. Jacobson & M. C. Raff (1997) Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr Biol*, 7, 281-4.
- Welte, M. A. (2004) Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol*, 14, R525-37.
- Welte, M. A., S. P. Gross, M. Postner, S. M. Block & E. F. Wieschaus (1998) Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell*, 92, 547-57.
- Whited, J. L., A. Cassell, M. Brouillette & P. A. Garrity (2004) Dynactin is required to maintain nuclear position within postmitotic *Drosophila* photoreceptor neurons. *Development*, 131, 4677-86.
- Wiggan, O., B. Schroder, D. Krapf, J. R. Bamberg & J. G. DeLuca (2017) Cofilin Regulates Nuclear Architecture through a Myosin-II Dependent Mechanotransduction Module. *Sci Rep*, 7, 40953.
- Wildenberg, G. A., M. R. Dohn, R. H. Carnahan, M. A. Davis, N. A. Lobdell, J. Settleman & A. B. Reynolds (2006) p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell*, 127, 1027-39.
- Wilhelmsen, K., S. H. Litjens, I. Kuikman, N. Tshimbalanga, H. Janssen, I. van den Bout, K. Raymond & A. Sonnenberg (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*, 171, 799-810.

- Williams, M., W. Yen, X. Lu & A. Sutherland (2014) Distinct apical and basolateral mechanisms drive planar cell polarity-dependent convergent extension of the mouse neural plate. *Dev Cell*, 29, 34-46.
- Wilson, M. H. & E. L. Holzbaur (2012) Opposing microtubule motors drive robust nuclear dynamics in developing muscle cells. *J Cell Sci*, 125, 4158-69.
- Wolf, K., M. Te Lindert, M. Krause, S. Alexander, J. Te Riet, A. L. Willis, R. M. Hoffman, C. G. Figdor, S. J. Weiss & P. Friedl (2013) Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol*, 201, 1069-84.
- Yamaguchi, Y. & M. Miura (2013) How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell Mol Life Sci*, 70, 3171-86.
- Yamaguchi, Y., N. Shinotsuka, K. Nonomura, K. Takemoto, K. Kuida, H. Yosida & M. Miura (2011) Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J Cell Biol*, 195, 1047-60.
- Yamauchi, K., M. Yang, P. Jiang, N. Yamamoto, M. Xu, Y. Amoh, K. Tsuji, M. Bouvet, H. Tsuchiya, K. Tomita, A. R. Moossa & R. M. Hoffman (2005) Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res*, 65, 4246-52.
- Yamazaki, D., T. Oikawa & T. Takenawa (2007) Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci*, 120, 86-100.
- Yan, H. X., W. Yang, R. Zhang, L. Chen, L. Tang, B. Zhai, S. Q. Liu, H. F. Cao, X. B. Man, H. P. Wu, M. C. Wu & H. Y. Wang (2006) Protein-tyrosine phosphatase PCP-2 inhibits beta-catenin signaling and increases E-cadherin-dependent cell adhesion. *J Biol Chem*, 281, 15423-33.
- Yang, Q., D. Roiz, L. Mereu, M. Daube & A. Hajnal (2017) The Invading Anchor Cell Induces Lateral Membrane Constriction during Vulval Lumen Morphogenesis in *C. elegans*. *Dev Cell*, 42, 271-285.e3.
- Yao, M., B. T. Goult, H. Chen, P. Cong, M. P. Sheetz & J. Yan (2014a) Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci Rep*, 4, 4610.
- Yao, M., B. T. Goult, B. Klapholz, X. Hu, C. P. Toseland, Y. Guo, P. Cong, M. P. Sheetz & J. Yan (2016) The mechanical response of talin. *Nat Commun*, 7, 11966.
- Yao, M., W. Qiu, R. Liu, A. K. Efremov, P. Cong, R. Seddiki, M. Payre, C. T. Lim, B. Ladoux, R. M. Mège & J. Yan (2014b) Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nat Commun*, 5, 4525.
- Ye, F., G. Hu, D. Taylor, B. Ratnikov, A. A. Bobkov, M. A. McLean, S. G. Sligar, K. A. Taylor & M. H. Ginsberg (2010) Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J Cell Biol*, 188, 157-73.
- Young, M. E., J. A. Cooper & P. C. Bridgman (2004) Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J Cell Biol*, 166, 629-35.
- Young, P. E., A. M. Richman, A. S. Ketchum & D. P. Kiehart (1993) Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev*, 7, 29-41.
- Zallen, J. A. & E. Wieschaus (2004) Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in *Drosophila*. *Dev Cell*, 6, 343-55.
- Zhang, J., X. Wang, W. Cui, W. Wang, H. Zhang, L. Liu, Z. Zhang, Z. Li, G. Ying, N. Zhang & B. Li (2013) Visualization of caspase-3-like activity in cells using a genetically encoded fluorescent biosensor activated by protein cleavage. *Nat Commun*, 4, 2157.
- Zhang, Q., C. Ragnauth, M. J. Greener, C. M. Shanahan & R. G. Roberts (2002) The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics*, 80, 473-81.
- Zhang, Q., J. N. Skepper, F. Yang, J. D. Davies, L. Hegyi, R. G. Roberts, P. L. Weissberg, J. A. Ellis & C. M. Shanahan (2001) Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci*, 114, 4485-98.
- Zhang, X., G. Jiang, Y. Cai, S. J. Monkley, D. R. Critchley & M. P. Sheetz (2008) Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol*, 10, 1062-8.

- Zhang, X., K. Lei, X. Yuan, X. Wu, Y. Zhuang, T. Xu, R. Xu & M. Han (2009a) SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron*, 64, 173-87.
- Zhang, Y., S. Sivasankar, W. J. Nelson & S. Chu (2009b) Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 109-14.
- Zhao, T., O. S. Graham, A. Raposo & D. St Johnston (2012) Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. *Science*, 336, 999-1003.
- Zink, D., A. H. Fischer & J. A. Nickerson (2004) Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 4, 677-87.
- Zwaan, J., P. R. Bryan & T. L. Pearce (1969) Interkinetic nuclear migration during the early stages of lens formation in the chicken embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 21, 71-83.

Mechanism of force generation by apoptotic cells during the *Drosophila* morphogenesis.

Each animal species acquires a specific shape during development. The generation of mechanical forces is one of the strategies used by cells to sculpt organs. During animal development, the mechanical forces generated in the plane of adherens junctions are important for epithelium remodeling. These planar forces have been extensively studied over the last years. This is particularly the case during apical constriction of mesodermal cells during *drosophila* embryo gastrulation. The reduction of the cell's apex is considered a fundamental process to trigger invagination of this tissue. However, recently, it has been shown that forces can also be generated along the cell apico-basal axis. The team in which I did my thesis has shown that these forces are important for the formation of folds during *drosophila* leg development. In this process, before their disappearance, cells form an apico-basal myosin structure, called "myosin cable". The force created by the contraction of the cable is transmitted to the cell's neighbors, inducing cell shape changes progressively resulting in fold formation. However, the mechanisms required for apico-basal force generation remained unknown. The goal of my thesis was to study in detail how the cells destined to die could generate an effective force. We made the hypothesis that the myosin cable should be anchored at the apical and basal cell poles in order to promote a resistance to the cable contraction, and to allow force transmission to the neighbors. Therefore, my aim was to identify these anchoring points thanks to imaging and genetics technics.

First, I had identified apical anchor point. Indeed, apoptotic cells reduce their apex but maintain their adherens junctions. The apical extremity of the myosin cable colocalizes to this adhesion structure. Secondly, I searched for the basal anchor point of myosin cable. Surprisingly, I observed that the nucleus of apoptotic cells is systematically relocated on the basal cell half and that the myosin cable contacts it. I tested whether the nucleus plays a role in myosin cable anchorage by perturbing its basal localization. The loss of function of *Klarsicht*, a LINC complex protein, prevents the cell to deform its neighbors, showing that, in this context the force is strongly or totally abolished. Finally, I have shown that the apoptotic nucleus itself is anchored to the basal side in order to promote a resistance during cable contraction. Indeed, I studied nuclei mobility and showed that apoptotic nuclei are less mobile than non-apoptotic nuclei. I also showed that F-actin and Talin, a basal adhesion component, are required for apoptotic nucleus stability. Furthermore, I have observed that, during cable contraction, the nucleus moves back apically and that it deforms locally. Finally, laser ablation experiments of the myosin cable show an apical recoil of apical surface and a basal recoil of the nucleus. Thus, the force generated by the apoptotic cells is transmitted in the apico-basal axis thanks to the link between apical adherence, cable and nucleus.

My work highlights a new mechanism of force generation. This new mechanism of apico-basal force could be conserved in other cell types in additional invagination processes during morphogenesis. My results also show that the nucleus plays a new role, beyond the protection of the genome, by participating actively in force generation.

Mécanisme de génération de forces par les cellules apoptotiques lors de la morphogenèse de la drosophile.

Chaque espèce vivante acquiert une forme qui lui est propre. La génération de forces mécaniques est l'une des stratégies utilisées par les cellules pour sculpter les organes. Lors du développement animal, les forces mécaniques générées dans le plan des jonctions adhérentes sont importantes pour le remodelage des tissus épithéliaux. Ces forces planaires ont été particulièrement étudiées ces dernières années. C'est le cas notamment de la constriction apicale des cellules lors de l'invagination du mésoderme de l'embryon de drosophile. La réduction de l'apex des cellules est considérée comme un processus fondamental pour la formation de la pliure initiale de cet épithélium. Toutefois, il a été découvert récemment que des forces peuvent aussi être générées dans l'axe apico-basal des cellules. L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a montré que de telles forces sont requises pour la formation de plis dans la patte de la drosophile lors de son développement. Dans ce processus, avant de disparaître par apoptose (ou mort programmée), les cellules vont former une structure apico-basale appelé « câble de myosine » qui, en se contractant, va induire une déformation des cellules voisines, aboutissant progressivement à la formation de plis. Cependant, les mécanismes requis pour la génération de la force apico-basale restaient inconnus. L'objectif de ma thèse était donc de chercher comment ces cellules destinées à mourir pouvaient générer une force efficace. L'hypothèse de travail était que ce câble de myosine devait être ancré au pôle apical et au pôle basal de la cellule afin de fournir une résistance permettant la génération d'une force efficace pouvant être transmise aux cellules voisines. J'ai donc cherché à identifier ces points d'ancrage grâce à des techniques d'imagerie et de génétique.

Dans un premier temps, j'ai identifié le point d'ancrage apical du câble. En effet, les cellules apoptotiques réduisent leur apex mais conservent leurs jonctions adhérentes au niveau desquelles co-localise l'extrémité apicale du câble de myosine. Dans un deuxième temps, j'ai cherché quel pourrait être le point d'ancrage basal du câble de myosine. Une observation surprenante montre que le noyau des cellules apoptotiques est systématiquement relocalisé au pôle basal et que le câble de myosine rentre en contact avec lui. J'ai testé si le noyau joue un rôle dans l'ancrage du câble de myosine en perturbant sa localisation basale. La perte de fonction de Klarsicht, une protéine du complexe LINC, empêche la cellule d'induire une déformation des cellules voisines, montrant que dans ce contexte où le noyau n'est pas relocalisé au pôle basal de la cellule, la force n'est pas ou peu produite. Finalement, j'ai pu montrer que le noyau est lui-même ancré au pôle basal de la cellule afin de fournir un point de résistance lors de la contraction du câble. En effet, j'ai étudié la mobilité des noyaux, montrant d'une part que les noyaux apoptotiques sont moins mobiles que ceux des cellules non-apoptotiques et, d'autre part, que l'actine et la Taline, un composant des adhésions basales, sont requises pour la stabilisation du noyau apoptotique. De plus, j'ai observé que, lors de la contraction du câble, le noyau remonte simultanément et que celui-ci se déforme localement. Finalement, des expériences d'ablation laser du câble de myosine montrent un relâchement de la surface apicale et un recul du noyau. Ainsi, la force émise par les cellules apoptotiques est transmise dans l'axe apico-basal par une liaison adhérence apicale-câble-noyau.

Mon travail met en lumière un mécanisme original de génération de force. Ce nouveau mécanisme de force apico-basale pourrait être conservé dans d'autres types cellulaires engagés dans des processus d'invagination au cours de la morphogenèse. Mes résultats montrent également que le noyau joue un rôle nouveau, au-delà de son rôle de protection du génome, en participant activement à la génération d'une force.