



HAL
open science

Rôles du Perlécane de la membrane basale dans la morphogénèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*

Raphaël Bonche

► **To cite this version:**

Raphaël Bonche. Rôles du Perlécane de la membrane basale dans la morphogénèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*. Morphogénèse. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6018 . tel-03473745

HAL Id: tel-03473745

<https://theses.hal.science/tel-03473745>

Submitted on 10 Dec 2021

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 DE DOCTORAT

Rôles du Perlécane de la membrane basale
dans la morphogénèse épithéliale
chez *Drosophila melanogaster*

Raphaël BONCHE-JOUEUR

Institut de Biologie Valrose (iBV), UMR CNRS 7277, Inserm U1091, UCA

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en**

Sciences de la Vie et de la Santé
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr Pascal Théron

Co-dirigée par : Dr Sandrine Pizette

Soutenue le : 9 Décembre 2019

Devant le jury, composé de :

Dr Ellen Van Obberghen-Schilling, iBV, Nice

Pr Markus Affolter, Biozentrum, Bâle

Dr Florence Ruggiero, IGFL, ENS, Lyon

Dr Romain Levayer, Institut Pasteur, Paris

Rôles du Perlécane de la membrane basale dans la morphogénèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*

Jury composé de:

Présidente

Dr Ellen Van Obberghen-Schilling, DR1, iBV Nice

Rapporteurs

Pr Markus Affolter, Professeur, Biozentrum de l'Université de Bâle

Dr Florence Ruggiero, DR1, IGFL, ENS Lyon

Examineur

Dr Romain Levayer, HDR, Institut Pasteur Paris

Résumé

La Membrane Basale (MB) est une matrice extracellulaire spécialisée entourant les organes et procurant à ces derniers un support mécanique. Pendant le développement, la MB doit s'adapter à la morphogénèse des tissus auxquels elle est associée, c'est-à-dire à leurs changements de volume et de forme. Ceci implique une modulation de la biogénèse de la MB (quantité déposée et composition). Le processus de morphogénèse étant contrôlée par les morphogènes, ces derniers pourraient directement contrôler cette biogénèse. Cependant le lien entre ces molécules et la régulation de la synthèse des composants de la MB reste peu étudiée. D'autre part, la MB sert aussi de plateforme de signalisation aux cellules qu'elle borde. Ainsi, certains de ces composants pourraient interagir avec les morphogènes et réguler leur activité assurant ainsi un couplage entre ces deux processus.

Le Perlécane (Pcan), protéoglycane à chaînes de sulfate d'héparane (SH) principal de la MB, possède plusieurs isoformes putatives chez toutes les espèces. *In vitro*, il interagit avec les autres composants de la MB et avec les morphogènes via ses chaînes SH ou sa partie protéique. Cependant les **rôles *in vivo* du Pcan et de ses isoformes** (i) **dans la biogénèse et les propriétés mécaniques de la MB**, ainsi que (ii) **dans la signalisation liée aux morphogènes**, restent peu connus. J'ai donc développé deux projets. En utilisant **l'épithélium du disque imaginal d'aile de la drosophile**, l'équipe a d'abord montré que Pcan participe à la biogénèse de la MB. En effet, sans Pcan, l'incorporation du Collagène IV (Col IV), autre composant majeur de la MB, est modifiée. De plus, les cellules épithéliales squameuses du disque d'ailes changent de formes en devenant cuboïdales, et la formation de l'aile est compromise. De manière intéressante, j'ai montré que la réduction de la quantité de Col IV permet de restaurer partiellement tous les aspects de ce phénotype. Par la suite, j'ai prouvé qu'en absence de Pcan la compression de l'épithélium augmente. Pcan confère donc de l'élasticité à la MB, contrebalançant le rôle du Col IV qui rigidifie cette dernière. Mes données indiquent aussi que les microtubules seraient le relais intracellulaire des variations mécaniques dues aux modifications de la MB. Nos résultats suggèrent donc pour la première fois que **l'interaction du Pcan avec le Col IV contrôle l'organisation du réseau de Col IV, permettant ainsi de moduler l'action de ce dernier**. Pour le second projet, j'ai d'abord démontré l'existence de deux familles d'isoformes du Pcan chez la drosophile : une Avec Domaine I, nécessaire à l'addition des chaînes SH, et une autre Sans Domaine I, théoriquement dépourvue de chaînes SH. Mes données suggèrent que le Pcan déposé dans la MB du disque provient de trois sources différentes produisant des isoformes différentes. D'une part, la source non-autonome sécréterait des formes Avec Domaine I qui seraient déposées au niveau du disque. D'autre part, le disque produirait principalement des formes Sans Domaine I qui seraient directement incorporées dans sa MB. J'ai ensuite prouvé que le niveau d'ARN de ces isoformes dans le disque était contrôlé par la voie de signalisation Dpp (Orthologue BMP 2/4). En effet, en condition normale, Dpp augmente la quantité d'ARN de l'isoforme Sans Domaine I dans le disque et diminue la quantité d'ARN de l'isoforme Avec Domaine I. Finalement, j'ai découvert que Pcan pouvait agir comme un inhibiteur de la voie Dpp en affectant la quantité de ligand dans le milieu extracellulaire. Mes résultats montrent que les deux isoformes agissent de manière opposée sur la voie Dpp dans le disque. Ainsi, mes résultats montrent qu'**il existe une boucle de régulation entre les morphogènes, orchestrant la morphogénèse, et la membrane basale, une des clés de voute de l'architecture tissulaire**.

Mots clés : Membrane basale, Perlécane, morphogénèse épithéliale, mécanique tissulaire, Dpp, *Drosophila*

Summary

The Basement Membrane (BM) is a specialised extracellular matrix which surrounds organs and provides them with a mechanical support. During development, the BM has to adapt to the morphogenesis of the tissues to which it is associated, i.e. to the changes of their volume and shape. This implies a modulation of the BM's biogenesis in terms of the amount that is deposited and of its composition. Morphogenesis being controlled by the morphogens, these latter could directly govern this biogenesis. Nevertheless, the link between these molecules and the regulation of BM's components synthesis remains poorly characterized. In addition, the BM is also a signalling platform for the cells which it coats. Thus, some of its components could interact with morphogens and control their activity, ensuring a coupling between these two processes.

Perlecan (Pcan), the major heparan sulfate (HS) chains proteoglycan of the BM, has several putative isoforms in all species. It binds *in vitro* to the other components of the BM and to the morphogens through its HS chains or its core protein. Yet, the roles of Pcan and its isoforms *in vivo* (i) for the biogenesis and the mechanical properties of the BM and (ii) for the morphogens' signalling are not fully understood. I therefore developed two projects. Using the epithelia of the wing imaginal disc in *Drosophila*, we showed that Pcan participate to BM biogenesis. Indeed, without Pcan, the incorporation of Collagen IV (Col IV), another core BM component, is altered. Moreover, the squamous epithelial cells of the wing disc change their shape, becoming cuboidal, and wing formation is compromised. I proved that a reduction in the Col IV amount allows to largely restore this phenotype. In addition, I demonstrated that the compression of the squamous epithelium increases in absence of Pcan. Thus, Pcan provides elasticity to the BM, counteracting the Col IV which gives it rigidity. My data also indicate that the microtubule cytoskeleton could relay intracellularly the mechanical variations due to the BM modification. Our results suggest for the first time that interaction between Pcan and Col IV controls the network organisation of the latter, allowing to modulate its action. For the second project, I first demonstrated the existence of two types of isoforms in *Drosophila*: one with a domain I, required for the HS chains addition, and a second without domain I, theoretically devoid of HS chains. My results suggest that the Pcan deposited in the BM of the wing disc comes from three different sources, synthesizing different isoforms. I showed that the wing disc mainly produces a form without domain I which is likely to be directly incorporated in its BM. Next, I found that the expression of this isoform in the disc is positively controlled by the Dpp-BMP2/4 signalling pathway, while the expression of the isoform with domain I is repressed by the same pathway. Finally, I uncovered that Pcan acts generally as an inhibitor of the Dpp pathway by potentially affecting the level of the ligand in the extracellular space, but that the two isoforms act in an opposite manner on the Dpp pathway in the wing disc. **In conclusion, my data show the existence of a feedback loop between morphogens, which orchestrate morphogenesis, and the BM, one of the keystone of the tissulare architecture.**

Keywords: Basement membrane, Perlecan, epithelial morphogenesis, tissue mechanics, Dpp, *Drosophila*

« J'avais un chalet, entouré de pins,
Où s'entrecroisaient, l'air de rien,
Le bonheur d'un enfant, et la liberté d'un félin. »



« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte »

Louis Pasteur

« Two years' work wasted, I have been breeding those flies for all that time and I've got nothing out of it! »

Thomas Morgan



« Le succès n'est pas final. L'échec n'est pas fatal. C'est le courage de continuer qui compte. »

Winston Churchill

Remerciements

Par où commencer ... C'est la question que je me pose à l'instant où je couche ces mots sur ce papier numérique. Je pensais pourtant que l'ordre dans lequel j'allais remercier les différents protagonistes de mon « épopée » allait m'apparaître, limpide, naturel... La faute au nombre d'années pendant lesquelles j'ai arpenté ces couloirs.

Mais puisqu'il faut commencer, commençons !

Je remercie les différents membres de mon jury. Mme Ellen Van Obberghen-Schilling, qui a eu la gentillesse d'accepter de présider mon tribunal de... jury de thèse, pardon. J'ai eu vent de votre « stress » lorsque vous avez reçu mon mail de requête ! Je vous remercie d'autant plus d'avoir accepté ! Ensuite, Mr Markus Affolter, qui nous vient tout droit de Bâle ! Merci infiniment à « MONSIEUR Dpp » de me faire l'honneur de lire ce pavé ! Je vous en suis très reconnaissant ! Grande reconnaissance que j'ai aussi envers Mme Florence Ruggiero, qui, malgré son emploi du temps TRES chargé, prête ses yeux aiguisés à la relecture de mon travail. J'espère que la pro de la matrice que vous êtes ne sera pas déçue par cette lecture ! Enfin, je tiens à remercier Romain Levayer qui a accepté d'examiner mon travail malgré un emploi du temps de jeune chef d'équipe (« qui est à la fois technicien, post-doc et chef d'équipe » cf l'intéressé lors d'une discussion dans un congrès). Vous aviez vu et jugé mon tout premier poster, je vous laisse donc juge du bouquet final !

Avec ce jury, vont aussi trôner mes deux directeurs de thèse, j'ai nommé Pascal et Sandrine (j'omets vos noms, vous me pardonnerez ces familiarités, mais après 4 ans de « vie commune », et même plus avec toi, Sandrine, je me le permets).

Commençons par toi, Pascal... Je sais que mon « style » en tant que thésard ne t'a pas toujours enchanté. Mais malgré cela, j'ai toujours su qu'il était possible de discuter avec toi, ce qui est loin d'être le cas de la majorité des Big Boss ! Un grand merci pour ça ! Tu as été le « devil advocate », celui qui nous faisait « hurler », Sandrine et moi, parce qu'il voulait toujours tendre vers la simplification. Tu as aussi été celui qui a accepté d'être mon directeur de thèse et qui nous a « récupéré » Sandrine et moi, il y a 4 ans de ça. Je te suis vraiment reconnaissant de m'avoir laissé ma chance ! J'espère que j'ai réussi à te convaincre que mon « style », même si tu n'y adhère pas toujours, donne des résultats.

Me voilà arrivé à toi, Sandrine, surnommée Zette par les « Grognards » du labo, et que j'appelle tout simplement « Chef » depuis Janvier 2015... Et oui, ça fait un bail... Alors je n'irai pas par quatre chemins. Dans mon mémoire de master 2, je te l'avais déjà dit. Je le réitère ici : tu as été mon Maître, et tu le resteras. J'ai appris ce que voulaient dire « esprit critique » et « penser en dehors du bocal » (cf le Professeur Moustache). Et ce, non seulement en Sciences, mais aussi dans la vie en général. Toi qui dis souvent que tu ne me « sers pas à grand-chose ». C'est faux ! Je n'aurais pas pu tomber sur quelqu'un

de mieux que toi. Tu râles, tu tempêtes, tu es sceptique et sur tes gardes lorsque tout le monde s'enthousiasme (« Mais Zette, elle est jamais contente ! »). D'aucun peut dire que tu es « rabat-joie ». Ils auront peut-être raison. Mais, manque de bol, j'adhérais déjà à ce genre d'être. Maintenant que je suis passé par tes enseignements, j'ai définitivement rejoint le camp des « rabat-joie », même si je le fais plus discrètement que toi (pour le moment ! Qui peut prédire l'évolution de la chose !). Tu m'as donné les bases du boulot, tu m'as formé et m'as laissé faire les « conneries » pour que je ne les fasse qu'une seule fois « après tu recommenceras pas ». Tu n'as jamais posé d'hypothèse unilatéralement en me disant « fais ça comme ça, et fais ci comme ci ». Au contraire, chaque idée, chaque réflexion étaient le fruit d'une discussion, d'une « dissection » de l'hypothèse avancée par l'un ou l'autre. Toujours avec ton œil expérimenté en arrière-plan... Les discussions sur la vie en dehors du labo m'ont aussi été précieuses. Ta culture et ton humour, si particulier, ont parfaitement collés avec ma manière d'être. Donc, en un mot comme en mille : Merci ! Et je vais te le dire de la même façon que je le dis à mon maître d'Aikido : *Duomo Arigato Gozaimashita !* Pour tout !

Maintenant, passons à mes « camarades de combat », avec qui j'ai partagé coups de gueule et fous-rires.

Tout d'abord, un grand merci à celle qui fut la première à m'initier aux arcanes de la dissection de larves, celle qui m'a formé à la paillasse, Aline... Je ne t'ai pas oublié ! J'aurais aimé travailler plus longtemps avec toi ! Mais la vie en a décidé autrement (prendre la voix du Père Fourrasse pour prononcer cette phrase...). J'espère que NOTRE œuvre, que je vais présenter à travers ces « quelques » lignes (euh... dizaines de pages pardon) va te plaire ! J'ai fait du mieux que j'ai pu !

Laurence... Notre « maman » du labo. Celle sans qui rien ne marcherait, ou du moins, à l'envers. Tu es le mécano de notre bateau. Élément indispensable, « petite main » (et attention, pour moi, ceci est un compliment) qui œuvre dans l'ombre, ombre que l'on devine lorsque l'on entend ton rire dans le couloir ! Toujours de bonne humeur, même quand ça va mal. Tu es au plus près de notre réalité à nous autres, les thésards. Tu en as vu passer, des générations d'étudiants, depuis plus de 20 ans ! Pour ton pragmatisme, ta gentillesse, ton investissement, je vais être un thésard de plus à te le dire : **MERCI !**

Et qui dit Laurence, dit le tandem des Lolo ! Et qui dit tandem des Lolo, dit Laurent, alias Lolo mâle ! Alias « Magic fingers ». Alias « celui qui finit toute la bouffe parce que le comptoir est en face de son bureau ». Monsieur Western Blot, à qui on vient confier ses peines de BM et qui vous sauve un clonage mal engagé (« Mais oui, tu vas voir, c'est simple ! T'as qu'à faire un clonage en 10 coups ! Je te le dessine ! ».) Je ne sais pas combien de fois j'ai ri en entendant tes réflexions. Merci d'avoir été là ! Tu as fait partie des « référents » scientifiques que j'ai eus au cours de ces 4 années ! Merci !

Tamas ! Thank you for all your inputs, and for all the questions you asked! That was always relevant! Thank you for your calm and serenity when discussion got intense in lab meeting! Special thanks for Anita : Dans la forêt lointaine, on entend le hibou...

Andrew ! Thank you for your accent, thanks to that I improved a lot! Now, I can understand the real English! That was difficult, but I'm well prepared now! I hope you will take more vacation, now !

Une mention spéciale pour une chercheuse à l'accent sud-américain prononcé ! CIAO NURIA ! Pour les discussions scientifiques et non scientifiques, pour tes idées, le partage de tes expériences ! Et qui sait, peut-être nous croiserons nous dans d'autres couloirs d'ici quelques temps !

Me voici rendu à la rubrique des thésards du labo! Commençons par les anciens, qui ne sont plus là ! Cécile, j'espère que tu te plais dans ta nouvelle vie Parisienne ! Eclate-toi ! Derya, voisine de paillasse, « C'est pas possible, ça ! », happy for you : I heard you found a good job ! And you are back home! I hope you carry on travelling and taking selfies! Et finalement, les deux italiennes du 5° ! Eleonora et Caterina ! Merci à toutes les deux pour toutes les discussions que nous avons eues, en particulier en ce qui concerne la relation parfois conflictuelle entre vie privée et vie professionnelle. Nos coups de gueules contre le système. Nos espoirs et désespoirs. Bref nos vies de thésard ! Eleonore : reste comme tu es ! « This is not a journal club, god dammit ! » ! Caterina : je te souhaite le meilleur ! J'espère que tout va bien pour toi ! Enfin Jeshlee, le gros N'oustach te fait une énorme léchouille ! Et j'espère que tout se passe bien pour toi et ton mari !

Une mention spéciale pour Nadia FORRRRMICOLA, avec qui j'ai débuté le marathon, il y a 4 ans de cela, et qui le finit avant moi, le 10 octobre, soit le jour de mon anniversaire ! Smile ! Life is beautiful ! Et on l'a fait !

Enfin, les compagnons de galère qui sont à mes côtés au moment où j'écris ce pavé : Kavya au 3° et Julien et Prune !

Kavya ! I wish you all the best ! Hang on ! One year and you're done !

A mon camarade britannique, Julien, je te dis « Que Wingless soit avec toi ! » ! Merci pour l'initiation à R ! Merci pour les discussions scientifiques, et les discussions en général sur tout et n'importe quoi ! On trinque à ton PhD en décembre 2020 !

Enfin, Prune ... Sandrine avait recruté un premier « taré » en me prenant en thèse, elle n'a donc pas failli et a repris une autre « tarée ». Parce qu'il faut vraiment être inconscient pour se frotter à Perlecan. Je n'écouterai plus jamais Mylène Farmer ou les Lacs du Connemara de la même façon désormais. Et faudra que tu me fasses des PowerPoint pour me faire des updates ! Je compte sur toi ! Enfin : MERCI pour les conseils sur les illustrations !!!

Merci à l'ensemble de l'équipe Léopold qui n'est plus là ! Ils se sont tous dispersés, mais je ne ne les ai pas oubliés ! Nath, Marianne, Juju (mention spécial pour l'intermède « garage de voiture le long du trottoir » observé depuis les escaliers...), Ditte, Laura !

Et merci aux remplaçants de l'équipe Hudry ! Bruno, bien entendu (merci pour ta bonne humeur ! et ton esprit de communauté !), Thomas, et Charlotte (méfie toi : 1kg, ça ne fait pas tout à fait 500g...) !

Of course, je n'oublie pas celui qui est resté à son poste contre vents et marais, ancien Léopold, nouveau Hudry : Renaldo ! Les discussions autour du café, et les réflexions « de fond » que je n'ai jamais manqué d'écouter car souvent pleine de bon sens!

Je finirai ce tour d'institut par les 4° et 3° étages.

4° : un big up à Msieu François, j'espère que tu vas décrocher la timbale et l'avoir ce nomdidjou de concours ! Je croise tout pour toi ! Tu le mérites ! Madame Delphine : merci pour les conseils BM et la bonne humeur ! Sans oublier celui qui m'a parlé pour la première fois du modèle droso : Christian ! Merci d'avoir été un si bon prof ! Vraiment ! Et je termine par une camarade de longue date, rencontré il y a longtemps maintenant, et que j'ai dû supporter pendant tout mon cursus : Céline BoutreS ... On en aura fait du chemin, pas vrai ! Et dire que t'es maman ! Comme quoi, tout arrive !

3° : Steph, Hayet, Miguel, Patricia, Roccio, Rohan, Charly ! La fine équipe Arkowitz! Merci! Et enfin, l'équipe Besse... Ca ramène loin en arrière ça ! Flo, merci pour tous tes conseils ! Et merci de nous avoir laissé profiter de votre pièce à mouche si longtemps pour adoucir la « séparation » ! Fabienne, toujours calme, sereine, qui jadis m'a appris à manipuler des cellules S2 en TP signalisation ... Merci à toi aussi d'avoir été une si bonne prof ! Madame Lucile ! Les fous-rires ! Merci ! Merci pour les séquences cultes en pièce à mouche ! Marine et Anne-Sophie : on n'aura pas cohabité longtemps, mais je pense que vous vous intégrez bien à la folie made in Besse team ! Enfin, j'arrive à une autre « référente », qui m'a tant aidé ! Caro ! Merci pour tout ! De la préparation de la MRT, jusqu'à la soutenance ! Tu auras été la « grande sœur » de recherche !

Mention spéciale à une ancienne des Besse : Marjo ! J'espère que tout va bien ! Merci d'avoir supporté les jérémiades du thésard !

Enfin, la plateforme Prism : Bastien et Simon, les gardiens actuels de nos bêtes optiques ; Seb, notre « bricoleur-ingénieur » ; Maëva et Mag, les anciennes qui m'ont formé aux arcanes de la microscopie à mon arrivée ! Merci !!!!!

Je remercie le professeur qui, un jour, m'a fait découvrir le monde des morphogènes : Thomas Lamonerie : MERCI !

Evidemment, ceux avec qui tout a commencé et qui ont su me refiler le virus de la recherche dès le début, et avec qui j'ai eu la chance d'enseigner : Erci Boncompagnie dit « riquet », Isabelle Garcia, dit « tata Isa », et mon ancienne « maman de stage », Laurence Dupont. Merci à tous les trois !

Passons enfin à quelques messages personnels ... Ils seront courts, mais leur concision est inversement proportionnelle à la puissance de mes sentiments.

Commençons par les poilus qui sèment leurs poils un peu partout... La p'tite Lady, qui beugle en pleine nuit pour avoir sa pâtée, sa sœur LovLov, qui beugle pour ...rien, et le gros N'oustach, alias Bavula...
Je vous aime les poilus !

Et bien sûr, une tendre pensée pour ma « grosse souris grise », féline de son état, qui fut à mes côtés pendant 17 ans...

Les humains ! Enfin !

Merci à ma nièce Moïra et à ma sœur, ma Baba. Je vous aime toutes les deux ! Je suis heureux que vous soyez là pour ce « passage » !

Enfin, je voudrais réserver ces dernières lignes à celle sans qui tout cela aurait été impossible. Celle qui a soulevé des montagnes. Celle qui a incarné le courage, le courage comme l'ont si bien résumé Roosevelt et Churchill... Ce n'était pas gagné d'avance pourtant ... Me voilà...Je t'aime Maman.

Sommaire

Résumé	2
Summary	3
Remerciements	6
Sommaire	11
Table des figures (hors articles)	14
Liste des abbréviations	16
Introduction	20
I. La Membrane Basale	20
A. Généralités	20
B. Structure	21
1. Les composants	21
a. Laminine	21
b. Collagène IV	24
c. Nidogène	27
d. Protéoglycanes à chaînes de sulfate d'héparane	28
2. Sécrétion et assemblage	31
3. Production	33
a. Tissus producteurs	33
b. Régulation de la synthèse	35
4. Remodelage	36
5. Pathologies	38
C. Fonctions	39
1. Un support mécanique/physique	39
a. Frontières	39
b. Migration	41
c. Polarité	42

d.	Morphogénèse tissulaire	43
2.	Une plateforme de signalisation	45
II.	Le Perlécane, PGSH majeur des MBs	47
A.	Structure du Perlécane	47
1.	Un protéoglycane modulaire conservé	47
2.	Les isoformes du Perlécane	50
3.	Synthèse du Perlécane	52
B.	Rôle du Perlécane dans la stabilité des MBs	52
1.	Les interactions avec les autres composants des MBs	53
2.	Fonctions dans la stabilité des MBs	54
3.	Pathologies	57
C.	Rôle du Perlécane dans la morphogénèse des tissus	57
1.	Participation aux propriétés mécaniques des MBs	58
2.	Liaison aux facteurs de croissance	59
III.	La Morphogénèse : l'exemple de Dpp	62
A.	Définition du morphogène	62
1.	Généralités	62
2.	L'établissement du gradient de concentration	63
B.	Dpp et la morphogénèse du disque imaginal d'aile chez <i>D.melanogaster</i>	65
1.	Origine et destin du disque imaginal d'aile	65
2.	La voie de signalisation Dpp dans le disque imaginal d'aile	67
a.	Transduction et gènes cibles	67
b.	Diffusion	69
c.	Régulations	70
3.	Fonctions de la voie Dpp dans le disque imaginal d'aile	71
a.	Régionalisation de la poche	71
b.	Croissance de la poche	72
c.	Morphologie épithéliale	73

d. Métamorphose	74
Objectifs des travaux de thèse	76
Résultats	77
I. Article n°1 :	77
II. Article n°2 :	143
Discussion	185
Conclusions & Perspectives	196
Bibliographie	198

Table des figures (hors articles)

Figure 1 : Comparaison de la composition des MBs chez les vertébrés et <i>D.melanogaster</i>	21
Figure 2 : La Laminine	22
Figure 3 : Le Collagène IV	25
Figure 4 : Le Nidogène et ses interactions avec les autres composants des MBs.	27
Figure 5 : Les Protéoglycanes à chaînes de sulfate d'héparane de la MB.....	28
Figure 6 : Synthèse des chaînes de sulfate d'héparane des PGSH.	30
Figure 7 : Assemblage des MBs.....	33
Figure 8 : Tissus producteurs des composants de la MB chez <i>D.melanogaster</i>	34
Figure 9 : La MBG, une frontière semi-pérmeable.	40
Figure 10 : Migration des cellules folliculaires dans la chambre d'œuf de la drosophile.	42
Figure 11 La MB est nécessaire à la polarisation de cellules épithéliales in vitro.	43
Figure 12 : Rôle mécanique de la MB dans la morphogénèse.	44
Figure 13 : La MB en tant que plateforme de signalisation.	46
Figure 14 : Conservation de la structure modulaire du Perlécane dans différentes espèces.	48
Figure 15 : Isoformes prédites du Perlécane chez <i>D.melanogaster</i>	51
Figure 16 : Les interactions du Perlécane avec les différents composants des MB	54
Figure 17 : Les interactions du Perlécane avec différents ligands de signalisation.....	59
Figure 18 : Le modèle du French Flag.	62
Figure 19 : Le bourgeon du membre des vertébrés comme modèle de morphogénèse.....	63
Figure 20 : L'établissement du gradient de Dpp dans l'embryon de <i>D.melanogaster</i>	64
Figure 21 : Origine du disque imaginal d'aile.....	65
Figure 22 : Les epithelia du disque imaginal d'aile.	66
Figure 23 : Devenir du disque imaginal d'aile.	66
Figure 24 : Domaine d'expression des morphogènes Hh, Dpp et Wg dans la poche du disque imaginal d'aile et leur correspondance sur l'aile adulte.....	67
Figure 25 : La voie Dpp dans le disque imaginal d'aile.....	68

Figure 26 : Rôle de Dpp dans la régionalisation du disque imaginal d'aile.....	71
Figure 27 : Rôle de Dpp dans la croissance du disque imaginal d'aile.....	73
Figure 28 : Dpp du disque imaginal d'aile et métamorphose.....	75
Figure 29 : Pcan ^{DI} est présent dans la lumière du disque imaginal d'aile.	186
Figure 30 : Isoformes des sources du Pcan déposées dans la MB du disque imaginal d'aile.	187
Figure 31 : Les fonctions des isoformes du Pcan dans le disque imaginal d'aile.	192

Liste des abbréviations

AE: Activating Element

AFM: Atomic Force Microscopy

ALK1: Activin receptor-liked Kinase I

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

BBB : Blood Brain Barrier

BMP: Bone Morphogenetic Protein

Brk: Brinker

CF : Cellule Folliculaire

Col IV : Collagène de type IV

Col XV/XVIII : Collagène de type XV/XVIII

DDSH: Dyssegmental Dysplasia Silverman Handmaker type

DP: Dorsal Primordium

Dpp: Decapentaplegic

ECol: Epithelium Colonnaire

ECub: Epithelium Cuboidal

EGF/R: Epidermal Growth Factor / Receptor

EHS: Engelbreth-Holm-Swarm

ES: Epithelium Squameux

FAK: Focal Adhesion Kinase

FGF/R: Fibroblast Growth Factor / Receptor

Gbb: Glass Bottom Boat

GPI: GlycosylPhosphatidyInositol

Hh: Hedgehog

HSPG2: Heparan Sulfate Proteoglycan 2

IFN : Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL2 : Interleukine 2

ILK : Integrin-Linked Kinase

L1 : Premier stade larvaire

L2 : deuxième stade larvaire

L3 : troisième stade larvaire

Lam : Laminine

LDL/R: Low-Density Lipoprotein / Receptor

Mad: Mother-Against-Dpp

MB: Membrane Basale

MBG : Membrane Basale Glomérulaire

MEC : Matrice Extracellulaire

Med: Medea

MMP: Matrix Metalloprotease

N-CAM: Neuromuscular Cell Adhesion Molecule

Nid: Nidogène

Omb: Optomotor Blind

P3H: prolyl-3hydroxyprolase

P4H : prolyl-4hydroxyprolase

Pcan : Perlécane

Pent : Pentagone

PGSH : Protéoglycane à chaînes de sulfate d'héparane

PI4,5P: Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

Sal: Spalt

SC : Sulfate de chondroïtine

SE: Silencing Element

SEA: Sperm, Enterokinase and Agrin

SFK: Src-Family Kinase

SGD: Sérine-Glycine-Aspartate

SHH: Sonic Hedgehog

Shn: Shnurri

SJS: Schwartz Jampel Syndrom

SMAD: Mad Homolog

Sog: Short Gastrulation

T_{EM}: Transition epithelio-mésenchymateuse

TGF: Transforming Growth Factor

TIMP: Tissu Inhibitor of matalloprotease

Tkv: Thickvein

TNF: Tumor Necrosis Factor

Trol: Terribly Reduced Optical Lobes

Tsg: Twisted Gastrulation

U_{nc-52}: Uncoordinated-52

V_{EGF/R}: Vascular Endothelial Growth Factor/Receptor

W_g: Wingless

WNT: Wingless Integration Site

Introduction

I. La Membrane Basale

A. Généralités

Apparue il y a plus de 500 millions d'années, la membrane basale (MB) est une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée qui entoure la plupart des organes chez les métazoaires. Son émergence, progressive, a sans doute été un pas décisif dans l'organisation multicellulaire et compartimentée du vivant animal (Hynes, 2012). Bordant notamment les épithelia et les endothelia, la MB est aussi retrouvée autour des muscles, des tissus adipeux et du système nerveux périphérique (Yurchenco, 2011). Longtemps cantonnée au rôle de barrière, protégeant et délimitant les tissus, elle a dévoilé petit à petit la diversité de ses fonctions. Ses rôles dans l'adhésion, la migration et la polarisation des cellules, ainsi que dans la morphogénèse des tissus, font de la MB un acteur essentiel de l'architecture tissulaire à l'état adulte mais aussi lors de l'embryogénèse (Jayadev and Sherwood, 2017; Sekiguchi and Yamada, 2018; Yurchenco, 2011). Outre son rôle de support mécanique, la MB constitue une plateforme de signalisation en interagissant avec de nombreux ligands, tels que les cytokines ou les facteurs de croissances (Sekiguchi and Yamada, 2018; Yurchenco et al., 2011).

Observée en 1840 autour de fibres musculaires (Bowman, 1840), il a fallu attendre la fin des années 1970 pour commencer à élucider la composition de la MB grâce à la tumeur murine Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (Chung et al., 1977; Orkin et al., 1977; Saikia et al., 2018 pour revue). La MB est principalement constituée de Collagène IV (Col IV), de Laminine (Lam), de Nidogène (Nid) et de protéoglycanes à chaînes de sulfate d'héparane (PGSH) tels que le Perlécane (Pcan, majoritaire), l'Agrine et le Collagène XVIII (Col XVIII) (Pozzi et al., 2017). Des données *in vitro* ont permis de forger un modèle d'assemblage pour la MB, où le Col IV et la Lam forment deux réseaux de polymères distincts, reliés entre eux par le Nid et des PGSH (Hohenester and Yurchenco, 2013). En outre, des protéines telles que les protéines dites « matricellulaires » comme SPARC, thrombospondin-1 ou tenascin-C, non-essentiels à la formation et à l'architecture de la MB, peuvent lui être associées (Murphy-Ullrich and Sage, 2014). La composition de la MB varie dans le temps et l'espace. Ainsi, le simple fait de dire « la » MB est un abus de langage : il y a autant de MBs différentes que de tissus/organes différents considérés à des stades de développements différents.

Les différents composants de la MB ont été très conservés au cours de l'évolution y compris chez les invertébrés (Hynes and Zhao, 2000). Ces derniers, et notamment le modèle *Drosophila melanogaster*, commencent à prendre une place prépondérante dans l'étude de la MB (Ramos-Lewis and Page-McCaw,

2019). En effet, la faible redondance génétique des constituants de la MB (Figure 1) ainsi que les outils disponibles chez la drosophile permettent de manipuler la MB *in vivo*. Ainsi, ces modèles devraient permettre une meilleure compréhension des rôles physiologiques de la MB et de ses composants dans les années à venir.

Composants MB	Vertébrés	Drosophile	Références des pertes de fonctions chez la drosophile
Laminine	16 hétérotrimères : • 5 chaînes α • 4 chaînes β • 3 chaînes γ	2 hétérotrimères : • 2 chaînes α • 1 chaîne β • 1 chaîne γ	• <i>lanA</i> , Henchcliffe et al., 1993; Yarnitzky and Volk, 1995 • <i>wing blister</i> , Martin et al., 1999 • <i>lanB1</i> , Urbano et al., 2009 • <i>lanB2</i> , Wolfstetter and Holz, 2012
Collagène IV	3 hétérotrimères : • 6 chaînes α	1 hétérotrimère : • 2 chaînes α	• <i>cg25c</i> , Borchiellini et al., 1996; Kelemen-Valkony et al., 2012 • <i>viking</i> , Rodriguez et al., 1996; Yasothornsrikul et al., 1997
Nidogène	2 monomères	1 monomère	• <i>nid</i> , Dai et al., 2018; Wolfstetter et al., 2019
Perlécane	1 monomère	1 monomère	• <i>trol</i> , Datta and Kankel, 1992; Voigt et al., 2002
Collagène XVIII	1 homotrimère : • 1 chaîne α	1 homotrimère : • 1 chaîne α	• <i>multiplexin</i> , Meyer and Moussian, 2009
Agrine	1 monomère	Absente	-

Figure 1 : Comparaison de la composition des MBss chez les vertébrés et *D.melanogaster*

B. Structure

1. Les composants

a. Laminine

Les Laminines sont de grandes glycoprotéines (400-600 kDa) hétérotrimériques constituées de trois chaînes α , β et γ (notée Lam $\alpha\beta\gamma$). Chez les vertébrés, on dénombre 5 chaînes α , 4 chaînes β et 3 chaînes γ capables de se combiner pour former différentes isoformes (Figure 2A) (Yurchenco, 2015). Biochimiquement, 16 isoformes ont été caractérisées à l'heure d'aujourd'hui chez les vertébrés (Macdonald et al., 2010). Chaque Lam possède trois bras courts, correspondant respectivement aux extrémités N-terminales des chaînes α , β et γ , et un bras long, formé par l'interaction de ces sous-unités (Figure 2A, adaptée de (Yurchenco, 2015)). Chaque bras court se termine par un domaine globulaire

LN relié à d'autres domaines globulaires internes L4 via des domaines LE (Lam EGF-like). Le bras long, quant à lui, est formé par un long domaine « super-enroulé » (ou « coiled-coil ») né de l'association des hélices α des trois chaînes. Ce domaine se termine par cinq domaines globulaires LG, fournis par la sous-unité α . Les domaines LN des trois bras courts vont être engagés dans la polymérisation du réseau Laminine en interagissant entre eux (Cheng et al., 1997), tandis que les domaines LG du bras long fournissent le domaine d'interaction avec les récepteurs cellulaires, intégrines (LG 1-3) et dystroglycans (LG 4 et 5) (Ido et al., 2004). *In vitro*, il a été démontré que les domaines LN et LG, respectivement requis pour l'auto-assemblage du réseau Lam et l'ancrage aux cellules, sont absolument nécessaires à la synthèse de la MB (McKee et al., 2007).

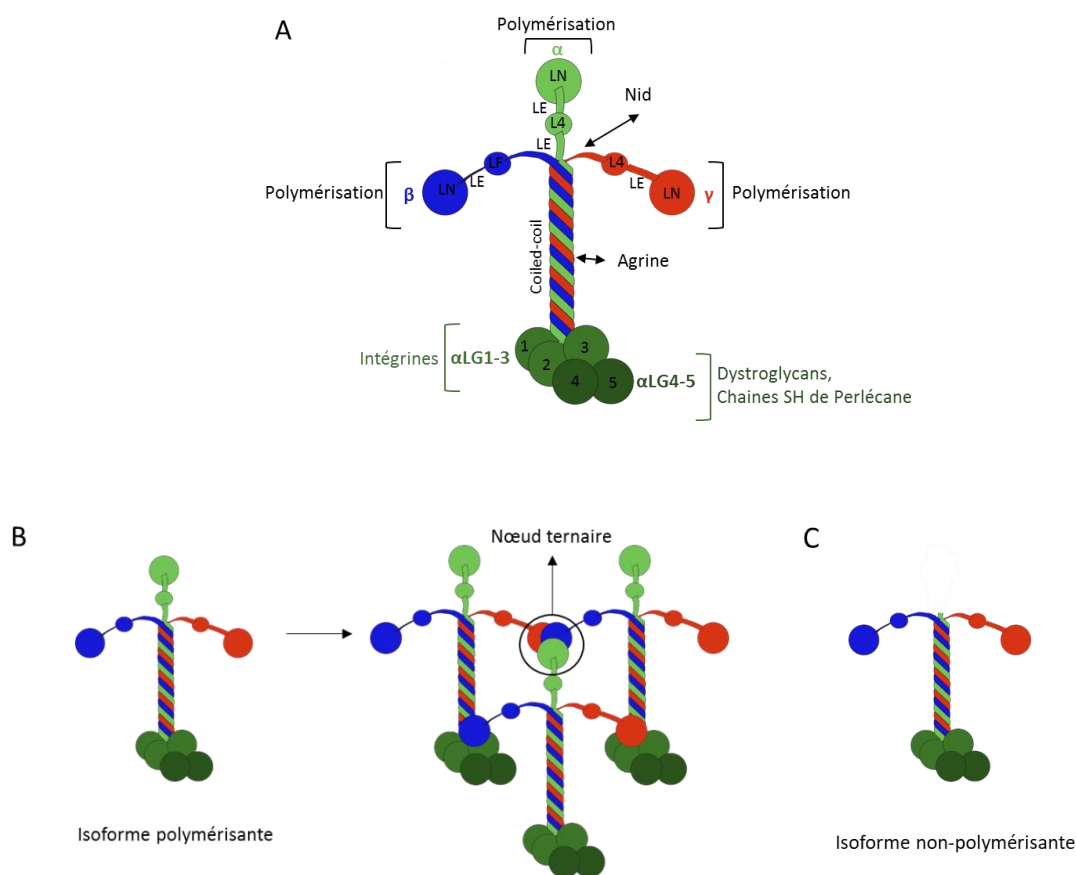


Figure 2: La Laminine.

(A) Structure générale de la Lam et domaines d'interaction avec les autres composants de la MB. (B) Isoforme polymérisante type de la Lam et formation du nœud ternaire entre les domaines LN des trois chaînes. (C) Isoforme non-polymérisante type.

Les Lam peuvent être divisées en deux classes d'isoformes : les isoformes « polymérisantes » et les isoformes « non-polymérisantes » (Figure 2B et C) (Cheng et al., 1997; Yurchenco, 2015). La différence réside dans la présence ou l'absence de domaines LN à l'extrémité des bras courts. Les isoformes « polymérisantes » arboreront trois domaines LN situés à l'extrémité de leurs trois bras courts respectifs. Les isoformes « non-polymérisantes » n'en arboreront que deux, voire un seul, rendant donc impossible

la formation de « nœud ternaire » et donc l'auto-assemblage du réseau Lam (Figure 2B) (Hohenester and Yurchenco, 2013). L'intégration de ces isoformes dans la MB dépendrait de leurs interactions avec les récepteurs intégrines et dystroglycans, les PGSH et le Nid.

Outre des sites d'auto-assemblage ou d'interactions avec les récepteurs cellulaires intégrines et dystroglycans, les Lam interagissent aussi avec Nid (Fox et al., 1991; Pöschl et al., 1994) via les domaines LE de la chaîne γ , Pcan (Ettner et al., 1998; Talts et al., 1999) via les domaines LG 4 et 5 et les domaines LN, et Agrin (Denzler et al., 1998) via le domaine « coiled-coil » du bras long. Ainsi, même si les réseaux de Lam et de Col IV peuvent interagir directement (McKee et al., 2007; Parkin et al., 2011), cette interaction est de faible affinité : Nid et les PGSH servent donc de « ponts » entre eux (Behrens et al., 2012; Brown et al., 1994; Willem et al., 2002).

Chez les vertébrés, la perte ou la mutation des sous-unités de Lam peuvent causer de graves dysfonctionnements au niveau de plusieurs organes, voir entraîner une létalité embryonnaire (pour revue : (Sekiguchi and Yamada, 2018; Yurchenco, 2015)). Une invalidation des sous-unités $\beta 1$ ou $\gamma 1$ abolit la formation de la MB embryonnaire, conduisant à la mort des embryons de souris à E5.5, juste après l'implantation dans la cavité utérine (Miner and Yurchenco, 2004; Miner et al., 2004; Smyth et al., 1999). Cette létalité est légèrement « retardée » lorsque la sous-unité $\alpha 1$ est absente : la MB embryonnaire parvient à se former grâce à la compensation par d'autres isoformes de Lam, cependant les MBs requises ultérieurement ne s'assemblent pas (Membrane de Reichert, notamment, située entre l'endoderme pariétal et le trophoblaste) (Miner et al., 2004). La gastrulation est donc initiée chez ces embryons, mais ils ne survivent pas au-delà de E7.5. Ces études *in vivo* démontrent l'importance capitale de la Lam dans la formation de la MB et l'embryogénèse. Des phénotypes plus tardifs ont aussi été mis en évidence en touchant des gènes codant pour d'autres sous-unités. Par exemple, les souris déficientes pour le gène codant la sous-unités $\alpha 2$, surtout présente dans les MBs bordant les muscles et le système nerveux périphérique, ont une espérance de vie très réduite (cinq semaines) (Miyagoe et al., 1997). Hormis cette létalité sévère, les animaux présentent une grave dystrophie musculaire due à une dégénération suivie d'une régénération fibrotique des muscles, ainsi qu'une atteinte du système nerveux causée par une perte de myéline. En outre, d'autres mutations touchant la chaîne $\beta 2$, essentiellement déposée dans les MBs du rein, de la jonction neuromusculaire et de l'œil (Yurchenco, 2015) sont à l'origine de pathologies touchant principalement le rein et la formation de l'œil. Les souris déficientes pour cette sous-unité présente une protéinurie sévère due à un défaut de filtration du rein, ainsi que des défauts au niveau des jonctions neuromusculaires (Noakes et al., 1995a, 1995b).

Chez les invertébrés tels que *C.elegans* et *D.melanogaster*, seulement deux isoformes de Lam existent. Il s'agit d'orthologues des Lam 111 et 511 vertébrées, toutes deux de types « polymérisantes » (Yurchenco, 2015). Chez la drosophile en particulier, il n'existe que deux chaînes α (LanA et Wing

Blister), une chaîne β (LanB1) et une chaîne γ (LanB2). Des mutations dans le gène codant pour la LanA avaient mis en évidence la nécessité de la Lam au cours du développement de l'embryon (Henchcliffe et al., 1993; Yarnitzky and Volk, 1995), soulignant son rôle dans la morphogénèse du cœur, des muscles et de l'intestin. De manière similaire, l'invalidation de la deuxième sous-unités α , Wing Blister, conduit au même phénotype de létalité embryonnaire (Martin et al., 1999). Cependant, une inactivation tardive du gène a permis de démontrer son rôle dans le développement des disques imaginaires, tissus précurseurs des organes adultes (Martin et al., 1999). En particulier, les drosophiles exprimant un allèle hypomorphe de *wing blister* présentent des cloques au niveau des ailes, phénotype semblable à celui d'une perte de fonction pour les intégrines. Ces cloques témoignent d'un défaut d'adhésion caractéristique d'une perte de la MB. Cependant, ces conditions mutantes ne permettaient de toucher qu'une des deux isoformes normalement synthétisées à la fois. Ainsi, l'invalidation du gène *LanB1* (Urbano et al., 2009), de son domaine LN (Hollfelder et al., 2014) et du gène *LanB2* (Wolfstetter and Holz, 2012), en abolissant complètement la production de Lam, ont par la suite démontré que la fonction de Lam dans l'assemblage des MBs était conservée chez la drosophile. Tout comme les mutations des chaînes LanA et Wing Blister, ces différents contextes génétiques conduisent à une létalité embryonnaire tardive due à l'absence totale de MB. Cette perte altère irrémédiablement la morphogénèse de la plupart des organes, en particulier celle du cœur et des muscles (Hollfelder et al., 2014), ainsi que la formation du tube digestif (Wolfstetter and Holz, 2012). En conclusion, la Lam constitue un élément fondamental de la MB, sans lequel son assemblage est impossible !

b. Collagène IV

Parmi les 28 différents types de collagène qui constituent la famille éponyme, le collagène IV est spécifique de la MB (Ricard-Blum, 2011). Il s'agit d'un collagène non-fibrillogène mais **réticulogène**. Cette très grande protéine (jusqu'à 400 nm !) se présente sous la forme d'un hétérotrimère de chaînes α appelé protomère (Figure 3A)(Brown et al., 2017). En dépit de l'existence de 6 sous-unités chez les vertébrés, seuls trois hétérotrimères (Col IV 112, 345 et 556) ont été identifiés à l'heure d'aujourd'hui (Borza et al., 2001; Boutaud et al., 2000; Brown et al., 2017). Le protomère de Col IV est constitué d'un domaine globulaire NC1 du côté C-Terminal relié à un domaine 7S N-Terminal par une triple hélice. Les domaines NC1 et 7S sont tous deux requis pour l'assemblage en réseau (Fig 3B). Le domaine NC1 permet l'assemblage intracellulaire du protomère de Col IV (Khoshnoodi et al., 2006), puis l'assemblage extracellulaire du réseau via une interaction chlorure-dépendante NC1-NC1 entre deux protomères (Fig 3C) (Cummings et al., 2016). Le domaine 7S va « uniquement » permettre l'assemblage extracellulaire du réseau : des interactions 7S-7S s'établissent de manière parallèle/antiparallèle entre quatre protomères (Fig 3D) (Kühn et al., 1981). Le réseau est ensuite renforcé par des liaisons covalentes au niveau des domaines NC1 (bromure dépendantes, catalysées par

l'enzyme PXDN) (McCall et al., 2014) et 7S (cuivre-dépendantes, catalysée par l'enzyme LOXL2)(Añazco et al., 2016).

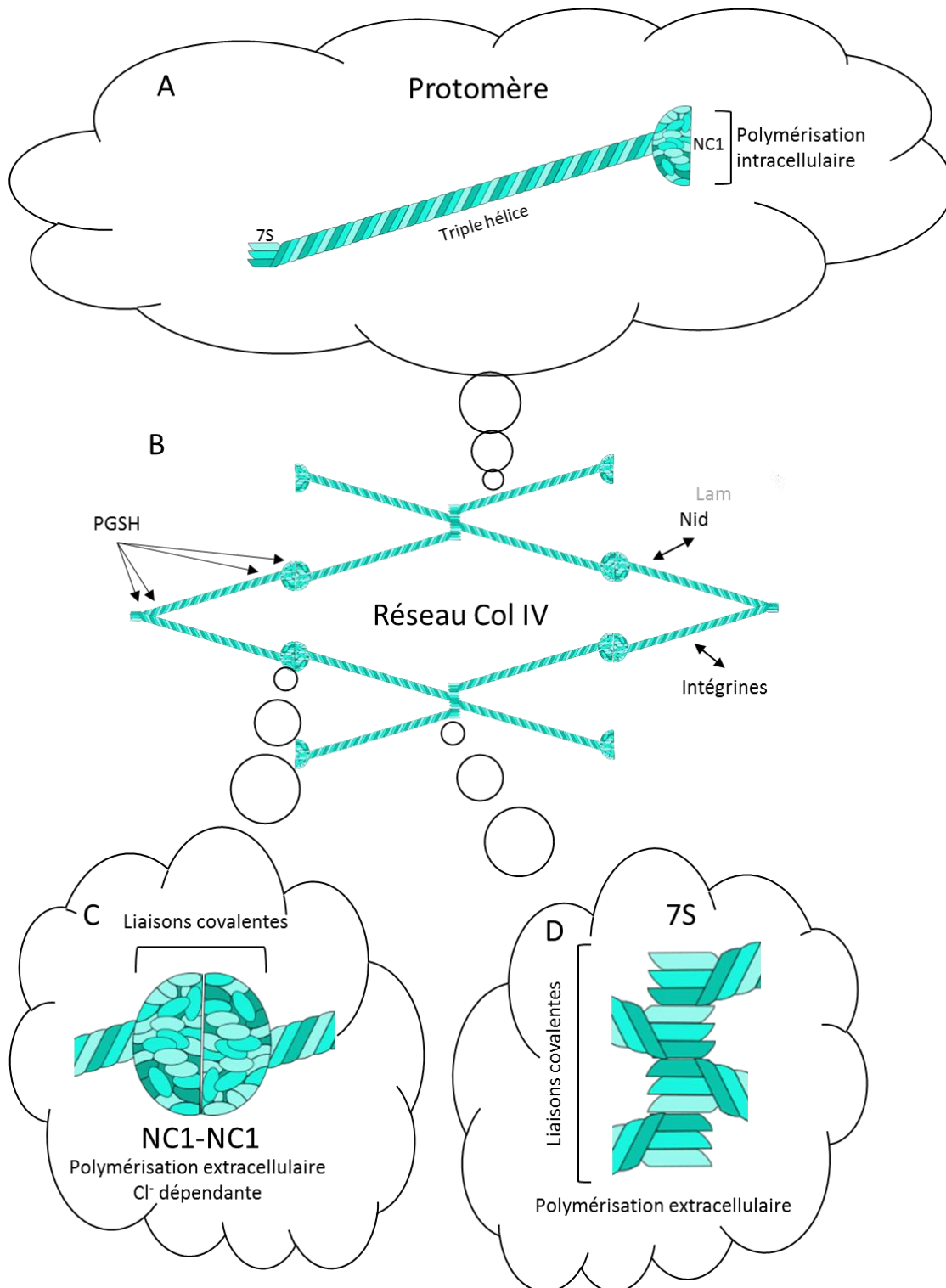


Figure 3 : Le Collagène IV

(A) Structure générale du protomère de Col IV. (B) Réseau de Col IV et interactions connues avec les autres composants de la MB. (C) Polymérisation par le domaine NC1. (D) Polymérisation par le domaine 7S.

Comme vu précédemment, Le Col IV peut interagir avec une faible affinité avec le réseau de Lam (McKee et al., 2007; Parkin et al., 2011), mais les sites d'interactions, proches du domaine NC1, sont

partagés avec Nid et les PGSH (Fig 3B) (Parkin et al., 2011). L'interaction avec le Nid et le complexe Lam/Nid s'effectue donc au niveau de la triple hélice, près du domaine NC1 (Aumailley et al., 1989). Ce site est aussi le lieu de l'interaction avec les PGSHs (Aumailley et al., 1989), même s'il en existe trois autres, proche du domaine 7S, dans le domaine 7S et dans le domaine NC1 lui-même (Koliakos et al., 1989; Oberbäumer et al., 1982; Parkin et al., 2011; Tsilibary et al., 1988). Enfin, les récepteurs intégrines peuvent aussi se lier au Col IV à plusieurs endroits dans la triple hélice (Emsley et al., 2000; Parkin et al., 2011; Sawala et al., 2015).

Ces interactions peuvent être affectées par des modifications post-traductionnelles des chaînes α (Myllyharju and Kivirikko, 2004). Il a notamment été démontré chez les vertébrés que l'inactivation de la prolyl-3hydroxyprolylase ou P3H, responsable de l'hydroxylation d'une proline appartenant au site d'interaction avec Nid, abolit cette interaction (Montgomery et al., 2018). D'autres enzymes, telles que les prolyl-4hydroxyprolylases (P4H), peuvent aussi modifier les chaînes. De manière remarquable, alors qu'il n'existe que trois isoenzymes P4H chez les vertébrés, on en dénombre une vingtaine chez la drosophile, présentant des patrons d'expressions tissu-spécifique dans l'embryon (Abrams and Andrew, 2002; Myllyharju and Kivirikko, 2004). Ainsi, alors qu'il n'existe qu'un seul hétérotrimère de Col IV chez la drosophile, la diversité et la spécificité tissulaire de ces enzymes pourraient finalement générer des « isoformes » possédant des capacités d'interactions spécifiques du tissu producteur. Enfin, il a aussi été démontré que les chaînes du Col IV des vertébrés peuvent être clivées au niveau du domaine NC1 (Okada et al., 2017). Ce clivage permet le relargage de fragments anti-angiogéniques appelés matricryptines, à l'image de la tumstatine dérivée de la chaîne $\alpha 3$ (Hamano and Kalluri, 2005).

Chez les vertébrés, le Col IV n'est pas nécessaire pour la formation de la MB mais est requis pour sa stabilité (Pöschl et al., 2004). Les embryons de souris déficients pour les chaînes $\alpha 1$ et 2 (incapables donc de former l'isoforme 112) parviennent à survivre jusqu'à E10.5. Les MBs embryonnaires sont formées, cependant certaines d'entre elles présentent de grosses déficiences. Ces défauts sont particulièrement frappants au niveau du système cardio-vasculaire et de la membrane de Reichert. Les embryons meurent essentiellement suite à des hémorragies massives. Le rôle clé du Col IV dans la stabilité de la MB a aussi été démontré à un stade plus tardif. Des souris hétérozygotes pour une mutation de la chaîne $\alpha 1$ présentent des brèches dans les MBs oculaire et cérébrale (Labelle-Dumais et al., 2011). Ces animaux, bien que viables, ont des défauts de développement oculaire, une neuropathie ainsi qu'une sévère myopathie.

Chez les invertébrés *C.elegans* et *D.melanogaster*, l'invalidation du Col IV est létale au stade embryonnaire (Borchiellini et al., 1996; Gupta et al., 1997). Chez la drosophile, il existe 2 chaînes α appelées Cg25c et Viking, orthologues des chaînes $\alpha 1$ et 2 des vertébrés. Des mutations dans le gène codant pour Cg25c entraînent un défaut de myogénèse, phénotype semblable à celui observé chez les

vertébrés (Borchiellini et al., 1996; Kelemen-Valkony et al., 2012). L'absence de Cg25C, même partielle, entraîne des défauts dans la MB entourant les muscles (Kelemen-Valkony et al., 2012). Ceci démontre que le Col IV est aussi nécessaire pour la stabilité des MBs chez les invertébrés. Cependant, Cg25c ne semble pas absolument requis pour la viabilité de l'embryon. En effet, plusieurs vagues de létalité sont observées. Même si un grand nombre ne dépassent pas le stade embryonnaire, certains arrivent à donner des larves, voir des adultes. Ces individus sont extrêmement faibles et petits. La découverte de la deuxième chaîne, Viking, et l'inactivation conjointe des deux sous-unités ont fini par démontrer la nécessité du Col IV pour la viabilité des embryons (Rodriguez et al., 1996; Yasothornsrikul et al., 1997).

c. Nidogène

Le Nidogène, aussi appelé entactine, est une glycoprotéine monomérique. Elle est constituée de trois domaines globulaires appelés G1, G2 et G3 (Fig 4) (Pozzi et al., 2017; Sekiguchi and Yamada, 2018). G1 se situe à l'extrémité N-ter de la protéine et est relié à G2 via un segment flexible. G2, domaine globulaire centrale, est connecté au domaine G3 par un domaine « rod-like » rigide. Les domaines G2 et G3 vont permettre à Nid d'interagir avec ses partenaires de la MB (Pozzi et al., 2017; Sekiguchi and Yamada, 2018). Le domaine G2 va lier les PGSH et le Col IV tandis que le domaine G3 va lier la Lam et le Col IV (Aumailley et al., 1989, 1993; Fox et al., 1991; Pöschl et al., 1994; Yurchenco, 2015). Les domaines G2 et G3 sont nécessaires à la localisation du Nid dans les MBs (Dai et al., 2018).

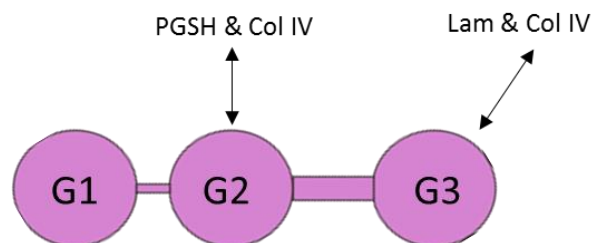


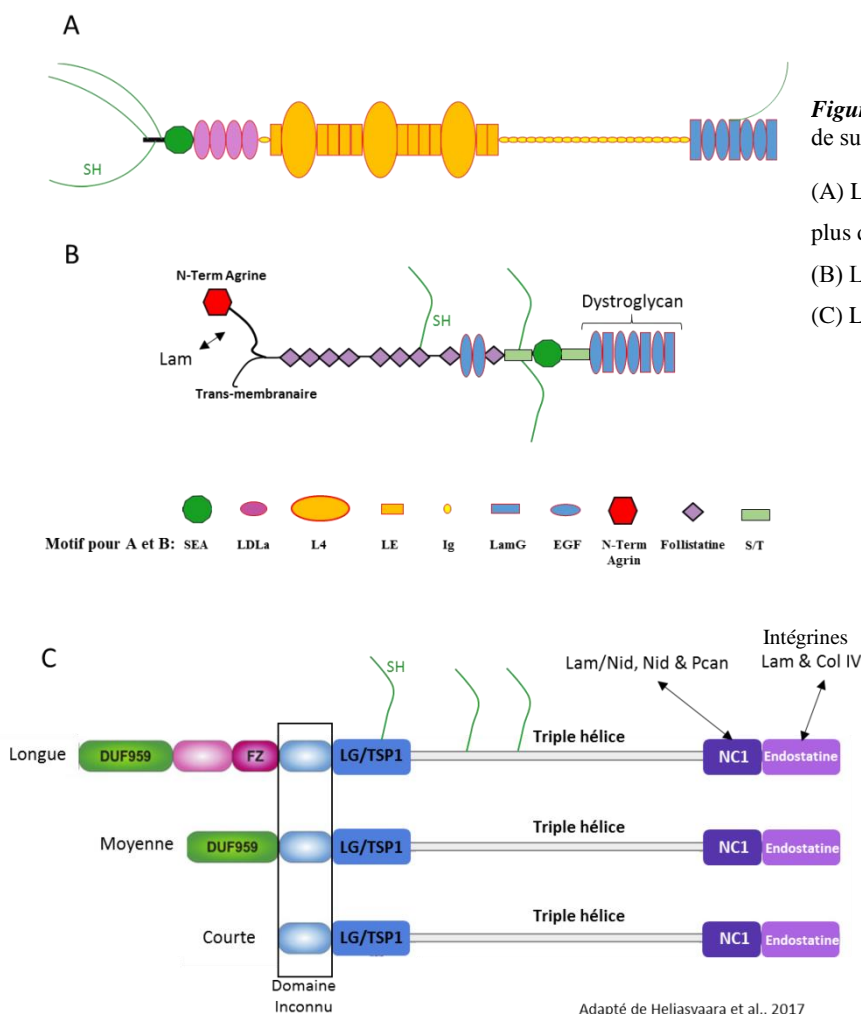
Figure 4: Le Nidogène et ses interactions avec les autres composants des MBs.

Chez les vertébrés, il existe deux gènes paralogues : Nid1 et Nid2. L'inactivation de Nid1 chez la souris ne provoque aucun phénotype : les souris sont viables et leurs MBs n'ont aucun défaut apparent (Murshed et al., 2000). Ce résultat, décevant à l'époque, pouvait être en partie expliqué par la présence de Nid2. Pour contrecarrer cette redondance, deux stratégies ont été mises en place : l'ablation du site de liaison à Nid sur la Lam (Willem et al., 2002), et l'inactivation simultanée de Nid1 et Nid2 (Bader et al.,

2005). Ces deux méthodes provoquent une létalité périnatale des animaux. Les MBs du rein, du poumon et du cœur présentent d'importantes brèches pendant le développement embryonnaire, ce qui rend ces organes non fonctionnels à la naissance. Ces études menées chez les vertébrés ont donc démontré que Nid était requis pour la viabilité à long terme et la stabilité de certaines MB. Chez la drosophile, bien que dispensable pour la viabilité, Nid est aussi requis dans la stabilité des MBs (Wolfstetter et al., 2019), mais là encore, les défauts sont variables selon les tissus observés (Dai et al., 2018). Nid étant censé être présent dans TOUTES les MBs, l'existence d'une redondance/alternance avec d'autres protéines « ponts » était fortement suspectée. Cette suspicion s'est d'ailleurs transformée récemment en certitude : il a été démontré que les PGSH, et notamment Pcan, pouvaient remplir cette tâche (Dai et al., 2018).

d. Protéoglycans à chaînes de sulfate d'héparane

De par la nature des chaînes sulfatées et de leur localisation cellulaire, il existe plusieurs familles de protéoglycans (Iozzo and Schaefer, 2015). Les protéoglycans de la MB sont des protéines secrétées dites « péricellulaires » et arborant essentiellement des chaînes SH. Parmi elles, on compte le Perlécane



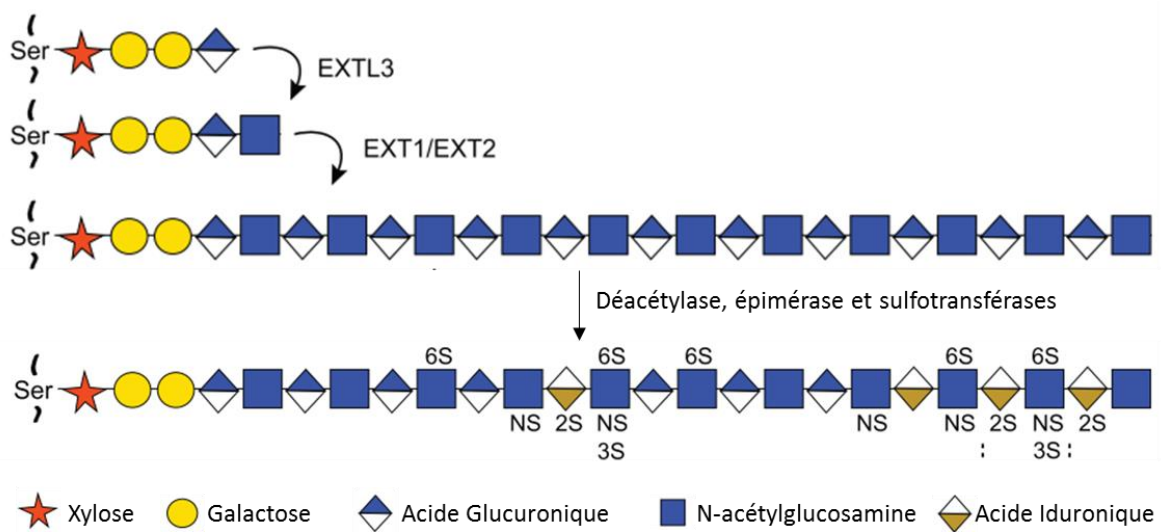
(majoritaire), l'Agrine et les Col XVIII/XV (Fig 5). Nous ne nous attarderons pas sur le Pcan (Fig 5A) dans cette partie, ce dernier allant faire l'objet de toutes les attentions dans le chapitre II.

A l'instar de Pcan, l'Agrine (Fig 5B) est un PGSH modulaire que l'on trouve uniquement dans les MBs des vertébrés. De manière surprenante, il existe sous forme sécrétée mais aussi transmembranaire (McCarthy, 2015). Structurellement, il partage de nombreux points communs avec Pcan. Tout comme ce dernier, il possède un domaine SEA (Sperm, Enterokinase and Agrin) et une extrémité C-terminale composée de trois domaines globulaires LG-like entrecoupés par des domaines EGF-like. Le domaine SEA est associé à la O-glycosylation des chaînes sulfatées (Bork and Patthy, 1995). Les domaines LG, quant à eux, permettent à l'Agrine de se fixer aux récepteurs dystroglycans (Gesemann et al., 1998; Pozzi et al., 2017; Yurchenco, 2011). De plus, le domaine N-terminal de l'Agrine interagit avec le bras long de la Lam, au niveau de la chaîne γ (Denzer et al., 1998). Ainsi, ce PGSH procure un ancrage aux cellules supplémentaires pour les MBs.

Le Col XVIII/XV (Fig 5C) fait partie de la famille des collagènes appelée Multiplexine (Multiple Triple Helix domains with Interruptions), non fibrillogène (Ricard-Blum, 2011). Chez la drosophile, seul le Col XVIII existe. Chez les vertébrés ou les invertébrés, le Col XVIII se présente sous la forme d'un seul homotrimère formé à partir d'une unique chaîne α . Cependant, cette chaîne possède trois isoformes aux extrémités N-Terminals différentes, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Heljasvaara et al., 2017; Meyer and Moussian, 2009; Seppinen and Pihlajaniemi, 2011). Au niveau C-Terminal, les trois formes possèdent un domaine clivable NC1/endostatine. Du côté N-Terminal se situe un domaine LG/Trombospondine 1 (TSP1), commun aux trois formes. A cette extrémité, il faut rajouter un domaine DUF959 (fonction inconnue) pour obtenir l'isoforme moyenne, et ajouter un domaine Frizzled entre LG/TSP1 et DUF959 pour avoir la forme longue. Le domaine NC1/endostatine interagit avec les autres composants de la MB: Lam et ColIV interagissent avec l'endostatine; le complexe Lam/Nid, Nid et Pcan avec le domaine NC1 (Heljasvaara et al., 2017). En outre, l'endostatine interagit aussi avec les intégrines (Iozzo and Schaefer, 2015).

Ces interactions font du ColXVIII un élément important pour la stabilité des MBs. En effet, bien que viable, l'absence totale de ColXVIII chez la souris entraîne un épaissement important de certaines MBs (Utriainen et al., 2004; Ylikärppä et al., 2003), en particulier au niveau du cerveau, du rein, du cœur, de l'épiderme et de l'oeil. Ces défauts entraînent une hydrocéphalie, un défaut de filtration au niveau du rein et une absence de développement des yeux. Étonnamment, aucune anomalie fonctionnelle n'a été décelé au niveau de la peau et du cœur. Ces phénotypes modérés suggèrent donc une redondance avec les autres PGSHs de la MB. Cette redondance a été mise en évidence en invalidant le ColXVIII et les chaînes SH du Pcan chez la souris (Rossi et al., 2003).

Même si le cœur protéique des PGSH est important, la particularité de ces molécules, quelle que soit leur localisation cellulaire, réside dans leurs chaînes SH. La synthèse de ces chaînes (Fig 6) est initiée au niveau d'un résidu sérine particulier flanqué par une glycine du côté 3' (motif SG) (Esko and Zhang, 1996). Une enzyme catalyse d'abord l'addition d'un sucre xylose sur ce résidu, bientôt rejoint par un tétrasaccharide Galactose/Galactose/Acide Glucuronique/N-acétylglucosamine (Poulain and Yost, 2015; Sarrazin et al., 2011). L'addition du dernier résidu N-acétylglucosamine, médiée par l'enzyme EXTL3, marque le coup d'envoi de l'élongation de la chaîne par les enzymes EXT1 et 2, qui ajoutent des dimères Acide Glucuronique/N-acétylglucosamine. Cette chaîne peut alors être modifiée, notamment par des épiméras, des déacétylases et des 2, 3 et 6-O sulfotransférases. Il en résulte une chaîne fortement chargée négativement, dont le niveau de sulfatation peut varier selon le tissu (Kato et al., 1994). Ces modifications tissu-spécifiques donnent naissance à une grande diversité et peuvent donc influencer les capacités de liaisons des chaînes SH avec leurs interactants. Cerise sur un gâteau déjà complexe : certains PGSH de la MB peuvent être substitués non pas par des chaînes SH mais des chaînes SC (sulfate de chondroïtine). C'est, par exemple, le cas du Col XVIII chez la drosophile (Momota et al., 2011). Le Pcan peut aussi être substitué par des chaînes SC, mais apparemment dans le contexte d'une autre matrice extracellulaire (Kvist et al., 2006).



Adapté de Poulain et Yost, 2015

Figure 6 : Synthèse des chaînes de sulfate d'héparane des PGSH.

Les chaînes SH participent à la structure de la MB. Il a notamment été démontré que leur hydratation participait à la définition de l'épaisseur et de l'élasticité de la MB entourant la rétine du poulet (Balasubramani et al., 2010). Elles sont cependant plus « connues » pour leur interaction avec des molécules de signalisations, telles que les facteurs de croissances ou les morphogènes (Sarrazin et al., 2011; Sekiguchi and Yamada, 2018). Les chaînes SH du Pcan sont notamment impliquées dans la modulation extracellulaire de la signalisation liée aux Fibroblast Growth Factors (FGF) (Matsuo and

Kimura-Yoshida, 2013). Cependant, les cibles de cette modulation ne se limitent pas aux seuls FGF... Je n'en dirai pas plus, et vous laisse découvrir la suite de cette histoire au chapitre II.

En conclusion, les PGSH de la MB, via leurs chaînes SH et leur cœur protéique, sont des garants de la stabilité des MBs. En outre, ils font de cette dernière une plateforme de signalisation.

2. *Sécrétion et assemblage*

Nous allons maintenant nous attarder sur l'assemblage des MBs, ou comment, à partir de simples « briques » protéiques, on peut obtenir une structure aussi photogénique en micrographie électronique (à mon humble et partial avis) (Miosge, 2001; Yurchenco and Ruben, 1987; Yurchenco et al., 1992).

Historiquement, le modèle d'assemblage en vigueur aujourd'hui est en grande partie bâti sur des expérimentations *in vitro* (pour revues : (Hohenester and Yurchenco, 2013; Yurchenco, 2015)) qui ont été en partie confirmées *in vivo* par la suite. Rendons à César ce qui est à César : les efforts faits dans le déchiffrement de l'assemblage du réseau de Lam dans le contexte des tumeurs EHS ont grandement contribué à la compréhension de l'assemblage de la MB (Kleinman et al., 1982, 1986; Yurchenco et al., 1992). En effet, la Lam est LE constituant incontournable, sans lequel il n'y a pas de MB, même si les autres constituants sont produits! (Hollfelder et al., 2014; Matsubayashi et al., 2017; Miner and Yurchenco, 2004; Miner et al., 2004; Smyth et al., 1999)

Il est communément admis que la MB « s'auto-assemble » à la surface des cellules dès que les constituants de cette MB sont produits et sécrétés par celles-ci (hétérotrimères de Lam, protomère de Col IV, Nid et PGSH) (Fig 7A). Cette sécrétion, qui s'effectue du côté basal pour les tissus polarisés, dépend de plusieurs facteurs. Chez la drosophile, notamment, cette étape requiert la participation de plusieurs protéines Rab (Devergne et al., 2017; Ke et al., 2018; Lerner et al., 2013), en particulier de Rab10 et son facteur d'échange GDP/GTP Crag (Denef et al., 2008; Lerner et al., 2013), ainsi que de Rab8 et son facteur d'échange Stratum (Devergne et al., 2017). Certains facteurs additionnels tels que le PI4,5P (Devergne et al., 2014), la sérine-protéase-like Scarface (Sorrosal et al., 2010) et Tango-1 (Lerner et al., 2013; Liu et al., 2017) sont aussi nécessaires à cette sécrétion basale.

En amont de cette sécrétion, il a récemment été montré que l'étape de synthèse protéique était hiérarchisée dans le temps (Matsubayashi et al., 2017). Cette étude, menée sur l'embryon de drosophile, a montré que la Lam était le premier constituant produit, suivi par le Col IV puis Pcan. Cette hiérarchisation confirme l'enchaînement des événements d'assemblage qui consiste en :

- (1) L'autopolymérisation du réseau de Lam (Fig 7B). Il repose d'abord sur une « nucléation » (c'est-à-dire un appariement de deux hétérotrimères, via les domaines LN des chaînes β et γ), suivie d'une « propagation » calcium-dépendante (formation des nœuds ternaires entre les domaines LN α , β et γ) (Hohenester and Yurchenco, 2013; McKee et al., 2007; Yurchenco, 2015). Ces deux mécanismes sont facilités par l'ancrage des hétérotrimères aux cellules, via les domaines LG qui interagissent avec les récepteurs intégrines et dystroglycans (Li et al., 2017). Cet ancrage permet essentiellement d'augmenter la concentration en Lam à la surface des cellules, donc de favoriser les interactions entre Lam.
- (2) Suite au dépôt de la Lam, c'est au tour du Col IV d'apparaître sur la scène (Graham et al., 1997; Huang et al., 2003) (Fig 7C). Le réseau de Col IV se forme lui aussi par « auto-assemblage ». Cette synthèse est initiée par les interactions NC1-NC1 entre protomères. Ces interactions se font uniquement à l'extérieur de la cellule et proche de sa surface du fait d'une concentration élevée en ions Cl^- (Cummins et al., 2016). Le réseau repose sur la formation concomitante de ces « hexamères » NC1-dépendants et de « dodécamères » 7S-dépendants.
- (3) Les deux réseaux Lam et Col IV ayant peu d'affinité l'un pour l'autre, ils doivent être « pontés ». Ce pontage est rendu possible par l'apparition de Nid (McKee et al., 2007) et des PGSH (Behrens et al., 2012) tels que Pcan. Ce dernier nécessitant le Col IV pour être incorporé dans la MB, il semblerait qu'il soit le « petit dernier » (Hollfelder et al., 2014; Matsubayashi et al., 2017) (Fig 7C).
- (4) L'ancrage aux cellules est renforcée grâce aux PGSH tels que Pcan et Agrine, qui peuvent interagir avec les récepteurs intégrines / dystroglycans et le réseau Lam (Hohenester and Yurchenco, 2013) (Fig 7C).

Ce processus d'assemblage « générique » est donc nécessaire à l'obtention des MBs en général. Cependant, il peut être sujet à des modifications, selon sa nature : assemblage *de novo* durant le développement ou bien réparation après une lésion. Alors que l'incorporation du réseau Col IV dépend du réseau Lam pour une synthèse *de novo* au cours de l'embryogénèse, ce réseau Lam est superflu pour le dépôt du Col IV dans le cadre d'une blessure (Ramos-Lewis et al., 2018). Il faut aussi garder à l'esprit que les MBs présentent une grande diversité en termes de composition, relative à la production de ses composants. La quantité « absolu » de composants, le ratio entre ces derniers ainsi que le type d'isoformes incorporées varient selon le tissu producteur considéré ainsi que son stade de développement.

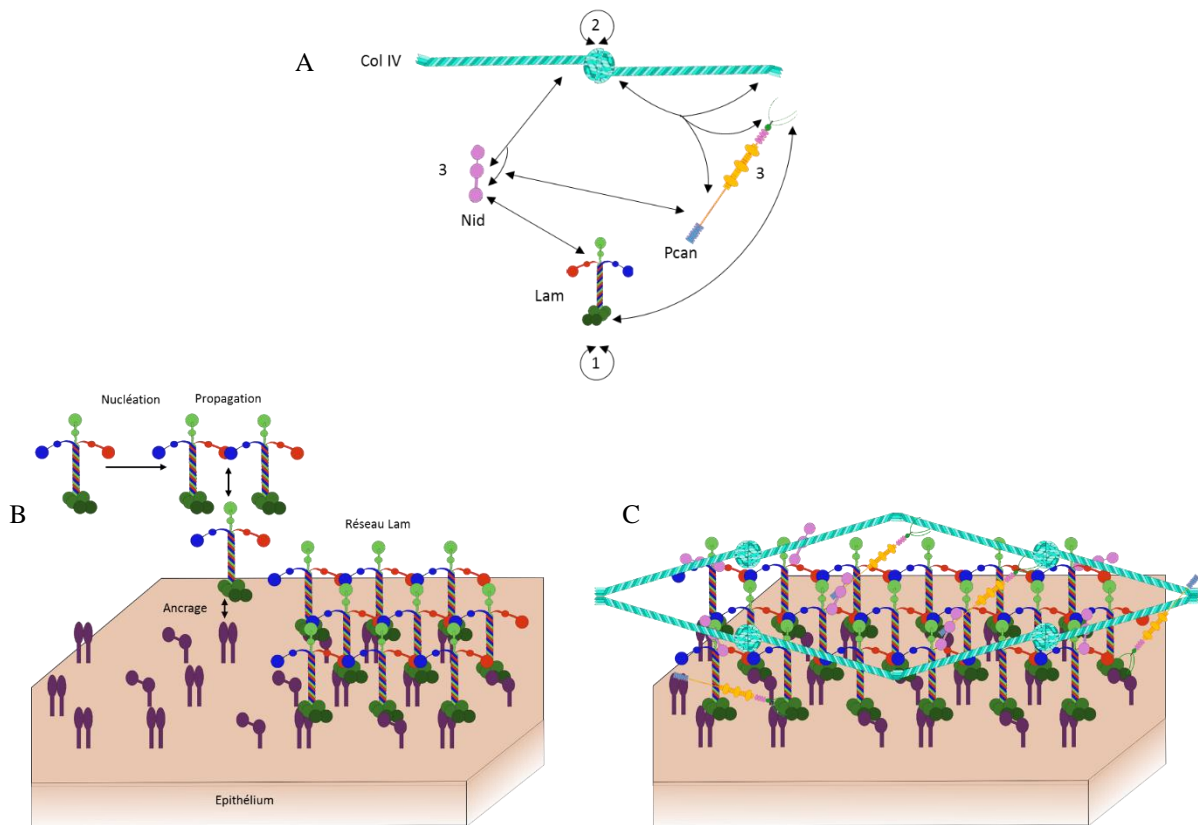


Figure 7 : Assemblage des MBs.

(A)Modèle simplifié des interactions avec leur ordre d'apparition. (B) Formation du réseau Lam. (C) Schéma simplifiée de la MB « finale ».

3. Production

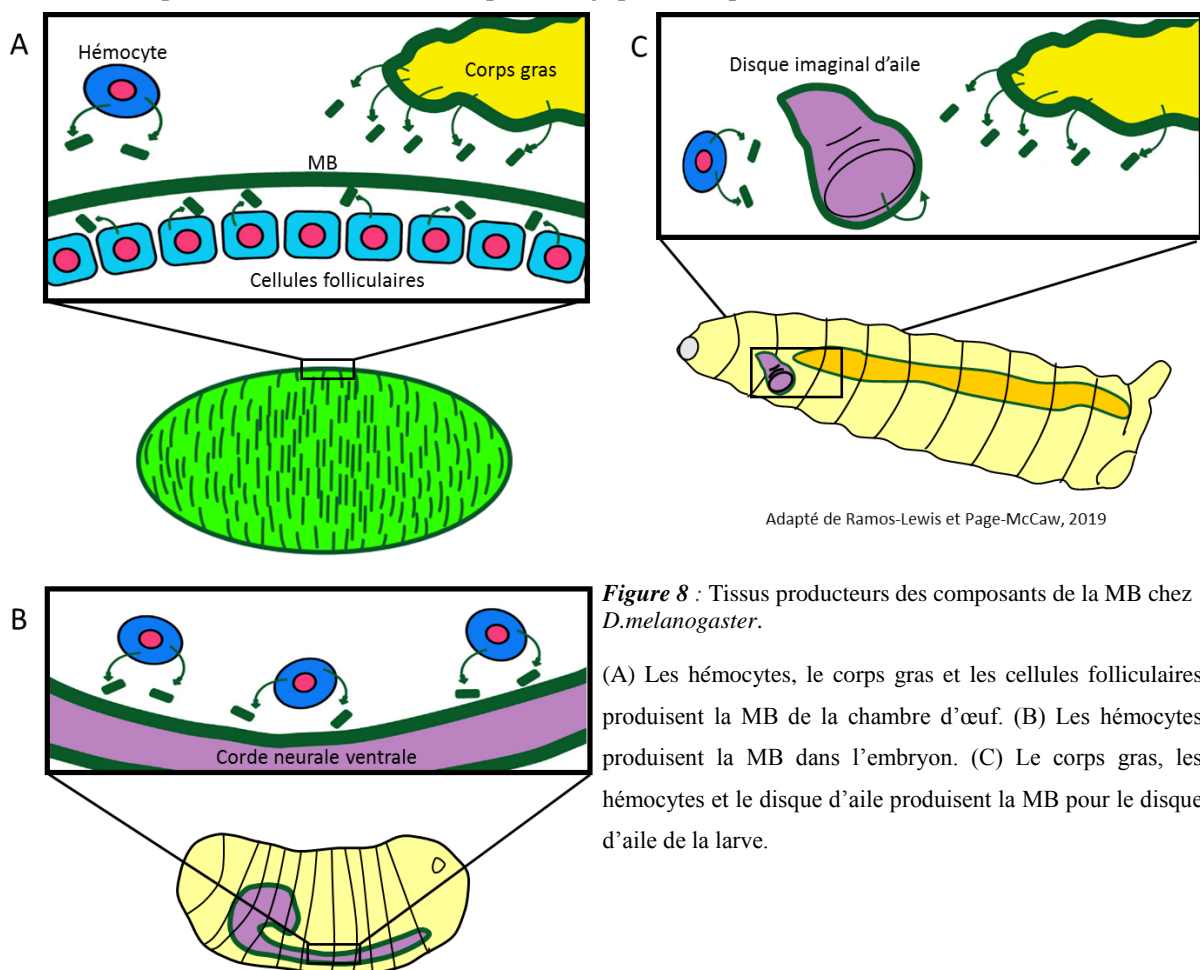
a. Tissus producteurs

L'identité des MBs est dictée par le tissu qui la produit. Cependant, par définition, les MBs sont des agents de la compartimentation, séparant physiquement les tissus/organes de leurs voisins. Ainsi, les différents composants de la MB sont en fait synthétisés par les deux tissus adjacents.

Chez les vertébrés, cette « double maternité » peut être illustrée par les cas de la MB glomérulaire (MBG) et de la MB de la peau. L'épaisse MBG est localisée entre l'endothélium glomérulaire et les podocytes, séparant ainsi le système vasculaire du système urinaire (Miner, 2012). Elle constitue une barrière filtrante sélective, permettant le passage des déchets du plasma sanguin vers le système urinaire mais n'autorisant pas le passage des protéines. Les composants de cette MBG sont coproduits par les cellules endothéliales glomérulaires et par les cellules épithéliales podocytaires (Miner, 2012; Saikia et al., 2018; Sariola et al., 1984). Au niveau de la peau, on retrouve de nouveau deux compartiments distincts : l'épiderme et le derme sous-jacent. Le premier est séparé du deuxième par une MB synthétisée par des cellules provenant des deux compartiments : les fibroblastes du derme et les kératinocytes de l'épiderme (Saikia et al., 2018). En particulier, le Col IV et Pcan sont produits par les deux types de

cellules, les Lam sont synthétisées par les kératinocytes épidermiques pendant le développement et Nid par les fibroblastes dermiques.

Chez la drosophile, les sources produisant les MBs entourant les différents organes peuvent aussi être multiples (Ramos-Lewis and Page-McCaw, 2019). Chez l'adulte, le cas de l'ovaire est un bon exemple (Fig 8A). D'une part les cellules folliculaires produisent de manière autonome le Col IV déposé dans la MB des chambres d'œufs ovariennes (Denef et al., 2008; Devergne et al., 2014; Lerner et al., 2013; Medioni and Noselli, 2005). D'autre part, il a été démontré qu'il existait des sources non-autonomes : le Col IV déposé autour de la niche des cellules souches de l'ovaire provient à la fois des hémocytes (macrophages « sanguines » circulant dans l'hémolymphe, équivalent du sang) et du corps gras (équivalent foie et tissu adipeux) (Van De Bor et al., 2015). Dans l'embryon, les hémocytes sont responsable de la production des composants de la MB (Fig 8B) (Matsubayashi et al., 2017) tandis qu'il a été démontré qu'au stade larvaire, les hémocytes sont rejoints par le corps gras en tant que fournisseurs des composants de la MB, notamment pour le disque imaginal d'aile (Fig 8C) (Dai et al., 2018; Pastor-Pareja and Xu, 2011; Zang et al., 2015). Dans le cas du Col IV en particulier, il a été montré que sa diffusion non-autonome vers le disque imaginal d'aile reposait sur la protéine SPARC (Shahab et al., 2015). En outre, il a aussi été montré que le disque imaginal d'aile produisait sa propre Lam (Dai et al., 2018). Cette production locale de Lam paraît logique : chaque tissu doit contrôler l'initiation de la



Adapté de Ramos-Lewis et Page-McCaw, 2019

Figure 8 : Tissus producteurs des composants de la MB chez *D.melanogaster*.

(A) Les hémocytes, le corps gras et les cellules folliculaires produisent la MB de la chambre d'œuf. (B) Les hémocytes produisent la MB dans l'embryon. (C) Le corps gras, les hémocytes et le disque d'aile produisent la MB pour le disque d'aile de la larve.

formation de sa propre MB. En fournissant ce réseau de Lam endogène, la surface des cellules devient compétente pour accueillir le reste des composants. De plus, en centralisant la production des composants plus externes dans le corps gras, on peut imaginer que la construction des MBs est dépendante des ressources énergétiques disponibles.

Il apparaît donc que (1) les tissus « élus » producteurs de la MB sont soigneusement sélectionnés et que (2) ils peuvent changer au cours du temps. Ceci implique une régulation précise de l'expression des composants de la MB dans l'espace et dans le temps.

b. Régulation de la synthèse

La régulation de la synthèse des composants de la MB peut prendre différentes formes : transcriptionnelle, post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle. Cette dernière, nous l'avons abordée en mentionnant les différentes enzymes responsables de la modification de chaînes α du Col IV ou bien de celles responsables de la sulfatation des chaînes sulfatées des PGSH. Concernant la régulation post-transcriptionnelle, il a été montré que les ARNm codant pour le Col IV (Viking et Cg25C) et la LanA sont localisés et traduits au pôle basal des cellules folliculaires de la chambre d'œuf de drosophile (Lerner et al., 2013). Il nous reste à aborder la régulation de la transcription de ces composants, dont nous allons discuter à la lumière des différentes isoformes qui existent pour chaque composant.

L'exemple de la MBG est parfait pour illustrer ce propos. Au cours du développement, la MBG va être constituée par différentes isoformes de Lam : d'abord Lam 111, puis 511 avant d'atteindre l'isoforme « adulte » 521 (Miner, 2012; Miner et al., 1997). De même, les isoformes de Col IV subissent aussi une transition au cours du développement. Alors que du Col IV 112 est d'abord déposé dans la MBG, les podocytes vont se mettre à produire le trimère 345 qui sera la seule forme présente à l'état adulte (Abrahamson et al., 2009; Miner and Sanes, 1994). Ces transitions développementales, qui ne sont pas restreintes à la MBG, sont donc marquées par l'expression de chaînes Lam $\alpha 5$ et $\beta 2$ inexprimées jusqu'alors, de mêmes pour les chaînes $\alpha 3$, 4 et 5 du Col IV. En parallèle, les chaînes Lam $\alpha 1$ et $\beta 1$, ainsi que les chaînes $\alpha 1$ et 2 cessent peu à peu d'être exprimées. Cette expression *de novo* de certaines chaînes ainsi que l'inhibition de l'expression de certaines autres indiquent une régulation au niveau de la transcription. De surcroît, dans le cas du Col IV, cette régulation transcriptionnelle est même spatiale. En effet, alors que les cellules endothéliales et podocytaires fournissaient de concert le Col IV 112, les podocytes vont être les seuls à produire le trimère 345 après la transition développementale (Abrahamson et al., 2009).

De plus, la structure des gènes codant pour certains composants de la MB se prête particulièrement à ce genre de régulation. Par exemple, l'organisation des loci des gènes codants pour les chaînes α du Col IV (structure « tête à tête » avec région promotrice partagée) est particulièrement propice à une

corégulation par des facteurs de transcription. Il a d'ailleurs été démontré que Smad1, appartenant à la voie TGF β /ALK1, activait directement la transcription du gène COL4A1 dans une lignée de cellules glomérulaires murines (Abe et al., 2004).

En outre les PGSH Agrine et ColXVIII possèdent aussi des isoformes dépendantes de l'utilisation de promoteurs alternatifs (Aikio et al., 2014; Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001; Rehn et al., 1996). Les patrons d'expressions des isoformes d'Agrine dans le système nerveux du poulet sont si distinctes que les auteurs de ces études en ont conclu l'existence d'une régulation transcriptionnelle (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001). De même, la distribution des isoformes de Col XVIII dans le tissu adipeux des souris présentant de nettes différences (Aikio et al., 2014), ceci suggérant une régulation de la transcription. Chez le poisson-zèbre, il a été formellement démontré que la transcription du Col XV, appartenant à la même famille des Multiplexins que le Col XVIII mais ne possédant pas d'isoformes, était une cible transcriptionnelle directe de la voie Hedgehog (Hh) dans les muscles lents (Guillon et al., 2016). Chez ce même organisme, la voie Hh régule aussi directement la transcription du gène codant pour la sous-unité $\alpha 1$ de la Lam (Pickering et al., 2017). La régulation de la transcription du Pcan sera, quant à elle, abordée dans le chapitre dédié à ce PGSH.

Pour finir par un exemple non physiologique, l'expression des composants de la MB est souvent modifiée dans de nombreux cancers (Jayadev and Sherwood, 2017; Qin et al., 2017). Par exemple, le Col IV et les PGSH sont surexprimés dans de nombreux cancers tels que les carcinomes hépatocellulaires, les mélanomes ou bien le cancer de la prostate (Chang et al., 2017; Theocharis and Karamanos, 2017). Et bien souvent, leur surexpression conduit à la formation de métastases.

4. Remodelage

L'une des premières choses qui peut venir à l'esprit lorsque l'on parle de métastases, c'est l'implication des métalloprotéases de la matrice (ou MMP) dans le remodelage pathologique de la MB lors de ce processus (Kelley et al., 2014). Cependant, ces MMPs peuvent aussi participer au remodelage physiologique des MBs dans certains cas (Mittal et al., 2016).

Les MMPs sont des endopeptidases zinc-dépendantes qui peuvent être sécrétées ou associées à la membrane plasmique via un domaine transmembranaire ou bien une ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol). Chez les vertébrés, on en dénombre pas moins de 28 différentes, qui peuvent être classées dans des sous-familles (Peng et al., 2012) :

- les collagénases telles que MMP1, capable de dégrader les protéoglycans et le Collagène fibrillaire ;

- les gélatinases telles que MMP2 et 9, notamment capables de dégrader le Col IV et les protéoglycans ;
- les stromelysines telles que MMP3, ciblant les Lam, le Col IV ou les protéoglycans ;
- les matrilysines, telles que MMP7, ayant pour substrats le Col IV ou la Lam ;
- les MMPs membranaires, telles que MT1-MMP, ciblant la Lam et le Col IV
- les MMPs non classées, telle que MMP12, qui digère la Lam et le Col IV.

L'activité de ces MMPs peut être inhibée par des inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP), au nombre de 4 chez les vertébrés. De façon surprenante, les phénotypes consécutifs à une déplétion des MMP prises individuellement sont peu sévères, les souris étant viables voire fertiles (Holmbeck et al., 1999; Itoh et al., 1997; Mosig et al., 2007; Shipley et al., 1996). Ceci suggère une redondance entre les différentes MMP existantes. L'inactivation de deux MMP simultanément (MMP2 et MT1-MMP) a d'ailleurs mis en exergue cette redondance. On observe en effet une aggravation considérable du phénotype chez ces souris, puisque ces dernières meurent peu après la naissance (Oh et al., 2004).

Ces MMPs et leurs inhibiteurs TIMPs sont aussi présents chez la drosophile, mais en nombre nettement plus réduit : il n'existe que deux MMP, dMMP1 et dMMP2, et un inhibiteur, dTIMP (Ramos-Lewis and Page-McCaw, 2019). Pris individuellement, l'inactivation de dMMP1 et dMMP2 conduit à une létalité juste avant l'éclosion des adultes. Cependant, l'absence simultanée des deux aggrave le phénotype, la létalité au niveau des stades larvaires devenant fortement pénétrante (Page-McCaw et al., 2003). Bien qu'apparemment requises dans des endroits différents (notamment dans la trachée pour MMP1 et les disques imaginaires pour MMP2), la létalité plus précoce des doubles mutants montre une redondance au moins partielle entre les deux MMP. Jusqu'à récemment, on croyait que dMMP1 était sécrétée tandis que dMMP2 était ancrée à la membrane. Or, une étude récente a prouvé que les deux MMP pouvaient être soit ancrées à la membrane soit sécrétées (Lafever et al., 2017). Ainsi, puisqu'elles ne peuvent pas être distinguées par leur localisation et donc agir toutes les deux au même endroit, ceci pourrait suggérer une certaine redondance. Enfin, l'inactivation individuelle de dMMP1 et dMMP2 lors du processus d'éversion (« externalisation ») du disque imaginal d'aile, qui est initialement à l'intérieur de la larve, mène à des phénotypes d'éversion partiels (Srivastava et al., 2007). Cependant, on note à la lecture de cette étude que les phénotypes consécutifs à la déplétion de dMMP2 paraissent plus pénétrants, ce qui suggérerait une certaine prévalence/spécificité de l'activité de cette dernière sur la MB du disque d'aile. Il a d'ailleurs été montré que les deux dMMP pouvaient avoir un répertoire de substrats différent (Lafever et al., 2017). Partant de l'idée que dMMP2 est plus spécifique de la MB du disque imaginal d'aile, cette dernière est couramment utilisée pour digérer le Col IV dans ce tissu (Ma et al., 2017; Pastor-Pareja and Xu, 2011; Pastor-Pareja et al., 2008). Néanmoins, l'activité de dMMP2 ne se restreint pas uniquement aux composants de la MB : elle clive aussi un PGSH ancré à la membrane

plasmique, le glypican Dally-like (Wang and Page-McCaw, 2014). En conclusion, les MMPs participent au remodelage des MBs dans le cadre de la morphogénèse des tissus bordés par ces dernières.

5. Pathologies

Hormis l'implication de la MB dans de nombreux cancers, via la régulation directe de l'expression de ses composants ou bien son remodelage par les MMP, de nombreuses maladies génétiques sont liées à des défauts dans sa structure (pour revue: (Pozzi et al., 2017; Yurchenco and Patton, 2009)).

Des mutations dans les gènes codant pour les chaînes α , β ou γ de la Lam conduisent à des affections différentes selon les isoformes impactées. Par exemple, des mutations pour $\alpha 3$, $\beta 3$ ou $\gamma 2$ conduisent à l'absence de formation de l'isoforme non-polymérisante Lam332 (Kiritsi et al., 2013). Cet hétérotrimère est notamment présent dans la MB de la peau, à la jonction du derme et de l'épiderme. Cette MB garantit l'adhésion de ces couches. Ainsi, sa structure étant fortement altérée, l'épiderme se décolle du derme, ce qui provoque la formation de « bulle » : cette maladie est donc l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. Ce syndrome héréditaire, très handicapant, peut être mortel dans les premières années de la vie en cas de complications (Orphanet ORPHA: 305). D'autre part, des mutations dans le gène codant pour la sous-unité $\beta 2$ abolissent la synthèse de nombreuses isoformes qui sont normalement déposées dans la MBG, au niveau des jonctions neuromusculaires et autour des muscles intraoculaires (ORPHA :2670) (Funk et al., 2018). Il en résulte une grave protéinurie, une hypotonie musculaire et une microcorie. L'insuffisance rénale est si sévère que les patients ne survivent pas plus que quelques mois après leur naissance.

Des mutations dans les gènes codant pour les chaînes $\alpha 3$, 4 ou 5 du Col IV sont aussi à l'origine d'une maladie héréditaire touchant principalement les reins : le syndrome d'Alport (ORPHA :63) (Funk et al., 2018). Ces mutations entraînent l'absence de formation de l'isoforme Col IV 345, soit la forme « adulte » du Col IV déposé dans la MBG. Pour compenser cette perte, la forme « immature » du Col IV 112 perdure dans la MBG. Cette dernière n'est alors plus en mesure de jouer son rôle de filtration entre les compartiments vasculaire et urinaire. S'ensuit une néphropathie glomérulaire qui va peu à peu vers l'insuffisance rénale terminale. Sans greffe, l'espérance de vie des patients est limitée à une trentaine d'années, ces derniers souffrant aussi de surdité.

Alors qu'aucune maladie génétique ne semble être liée au Nid, peut-être à cause de redondances, il en va tout autrement pour les PGSH de la MB. Des mutations dans le gène codant pour l'Agrine, PGSH important au niveau des jonctions neuromusculaires, sont à l'origine des syndromes myasthéniques congénitaux pré et post synaptiques (ORPHA :98913 et 98914) (Huzé et al., 2009). Cette maladie est caractérisée par un défaut de la transmission neuromusculaire, et a pour conséquence une faiblesse

musculaire et une grande fatigabilité du patient. Cette maladie peut apparaître à différentes époques de la vie. Enfin, des mutations dans le gène codant pour le Col XVIII sont à l'origine du syndrome de Knobloch (ORPHA :1571) (Heljasvaara et al., 2017). Les patients atteints de ce syndrome souffrent essentiellement de défauts oculaires très sévères (myopie, détachement de la rétine, cataracte...) qui débouchent sur une cécité dès le plus jeune âge. En plus de l'atteinte oculaire, les malades peuvent présenter une duplication des voies urinaires, une prédisposition à l'hydrocéphalie voir même à l'épilepsie pour quelques cas rares, et enfin une tryglycéridémie.

Les affections consécutives au Pcan seront traitées dans le chapitre II.

C. Fonctions

A ce stade, nous avons disséqué les MBs en nous attardant sur chacune des « briques » qui permettent son montage, sur leurs fonctions dans l'assemblage et le maintien des MBs. Mais le tout étant plus que la somme des parties, nous devons prendre un peu d'altitude et aborder les fonctions que remplissent les MBs en tant qu'unité/compartiment péricellulaire. En d'autres termes, quels services rendent-elles aux cellules qu'elles bordent, et finalement, quels services rendent-elles aux êtres vivants que nous sommes !

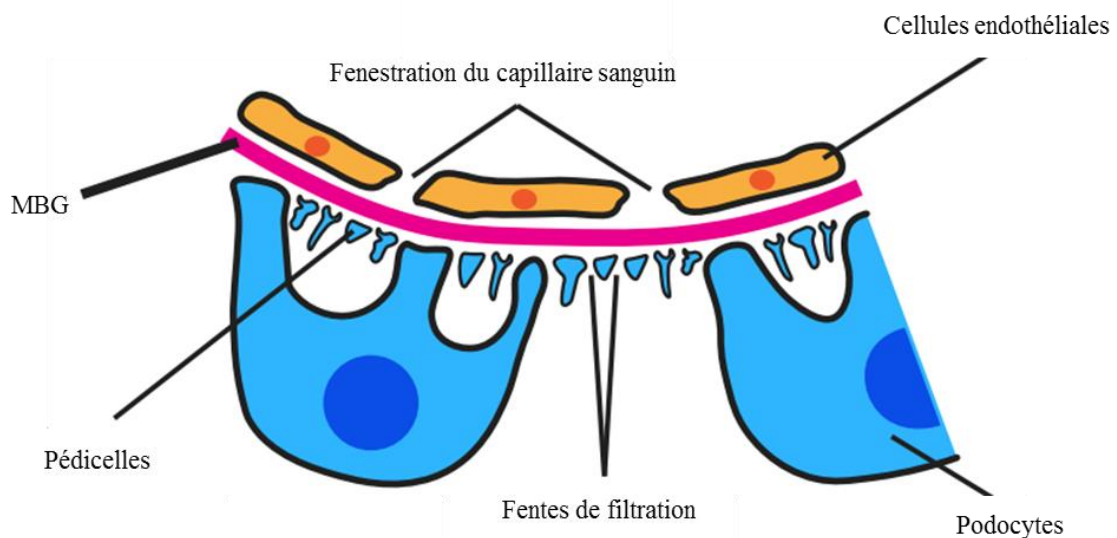
Les MBs remplissent essentiellement deux fonctions majeures (pour revues : (Isabella and Horne-Badovinac, 2015a; Pozzi et al., 2017; Ramos-Lewis and Page-McCaw, 2019; Sekiguchi and Yamada, 2018)). D'une part elles fournissent un support mécanique/physique aux cellules, leur permettant d'adhérer à un substrat, de migrer sur ce dernier, mais aussi de « sentir » leur polarité pour certaines d'entre elles. De manière plus holistique, elles imposent des barrières aux organes/tissus et jouent un rôle décisif dans l'acquisition de leur morphologie. D'autre part, les MBs servent de plateforme de signalisation. Elles permettent aux cellules de communiquer entre elles et avec le milieu extérieur. Cette signalisation peut recouvrir une forme mécanique (la MB en tant que mécano-senseur) ou chimique (chémo-senseur) selon que la cascade de signalisation passe par les récepteurs intégrines et dystroglycans ou bien par la liaison de ligands tels que les facteurs de croissances.

1. *Un support mécanique/physique*

a. Frontières

D'une manière évidente, les MBs servent de frontière entre les différents organes constituant les métazoaires que nous sommes (Sekiguchi and Yamada, 2018). Ces frontières peuvent être plus ou moins imperméables, permettant un échange entre des tissus adjacents.

A l'état adulte et en conditions physiologiques, les MBs n'autorisent pas les cellules à changer de compartiment, excepté les leucocytes durant la réponse inflammatoire (Rudziak et al., 2019). Les seuls échanges permis concernent des molécules plus ou moins petites. Deux exemples peuvent illustrer cette sélectivité : la MBG (de nouveau) et la MB de la barrière hémato-encéphalique (« Blood-Brain Barrier » ou BBB), à l'interface entre le cerveau et le système vasculaire. Dans le cas de la MBG, cette dernière remplit un rôle clé dans la barrière de filtration glomérulaire (formée par l'endothélium, la MBG et les podocytes épithéliaux, voir Fig 9) (Miner, 2012). Elle permet de laisser passer les déchets contenus dans le sang et autorise un flux liquide entre compartiments, mais empêche la fuite des protéines du sang vers l'urine. Elle est en particulier une barrière pour l'albumine (Jarad et al., 2006). La déplétion d'un de ces composants clés, tel que la sous-unité Lam $\beta 2$, déstabilise complètement la MBG qui ne garantit donc plus la sélectivité : une protéinurie/albuminurie sévère apparaît. De la même manière, la MB de la BBB, située entre l'endothélium des capillaires sanguins d'un côté et les péricytes et les cellules gliales du système nerveux de l'autre, assure le contrôle des flux entre les compartiments (Engelhardt et al., 2017). Une déstabilisation de la MB par l'invalidation des isoformes de Lam la constituant entraîne une rupture de la BBB (Gautam et al., 2016; Thyboll et al., 2002; Yao et al., 2017). Selon la provenance de la Lam invalidée (de l'endothélium, des péricytes ou des cellules gliales), les phénotypes peuvent varier. L'absence de Lam péricytaire provoque une hydrocéphalie (Gautam et al., 2016) tandis que l'absence de Lam endothéliale entraîne une hémorragie (Thyboll et al., 2002). Dans les deux cas, on observe une abolition de la régulation du flux liquide.



Adapté de Jayadev et Sherwood, 2017

Figure 9 : La MBG, une frontière semi-pérméable.

Pendant le développement, les MBs doivent aussi autoriser de vastes flux de cellules (pour revue : (Kelley et al., 2014)). L'adaptation des MBs à ces mouvements transfrontaliers peut être MMP-dépendante ou indépendante. L'éversion du disque imaginal d'aile déjà cité au chapitre des MMP est un bon exemple. Le disque imaginal d'aile est essentiellement composé de deux couches épithéliales, une colonnaire et une squameuse. Ces deux epithelia sont apposés l'un sur l'autre, séparés du côté apical par une lumière. Ce « sac » primordial est accroché à l'épiderme de la larve et baigne dans le milieu intérieur de cette dernière. L'éversion permet donc au primodium de l'aile de s'externaliser. Ce processus repose essentiellement sur le passage des cellules squameuses vers l'épiderme de la larve. Elles doivent donc traverser la MB les bordant pour changer de compartiment et, comme décrit précédemment, ce mécanisme dépend des MMP (Srivastava et al., 2007). Cependant, il existe aussi des mécanismes MMP-indépendant. Durant l'embryogénèse de la souris, entre E5 et E5.5 les cellules de l'épiblastes doivent traverser la MB entourant l'embryon pour changer de compartiment et former l'endoderme viscéral distal nécessaire à l'établissement de l'axe antéro-postérieur. Cette traversée est rendue possible par une rupture locale de la MB qui ne requiert pas les MMP (Hiramatsu et al., 2013). En effet, la pression qu'exerce les tissus utérins sur l'embryon est telle que ce dernier adopte une forme allongée de plus en plus prononcée. Les forces résultantes sont donc résolues par la rupture de la MB à la pointe distale de l'embryon. Un autre exemple du franchissement de la « frontière MB » par des cellules pendant le développement a été fourni par l'étude de la gastrulation de l'embryon de poulet (Nakaya and Sheng, 2013; Nakaya et al., 2010, 2013). Durant ce processus, les cellules épithéliales de l'épiblaste subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Cette transition est rendue possible par la perte localisée de la MB au niveau de la ligne primitive. Cette perte est due à répression locale de l'expression du récepteur dystroglycan (Nakaya et al., 2010). L'absence de ce dernier conduit à la déstabilisation de la MB et permet aux cellules d'entrer en TEM.

Les MBs sont donc des « barrières à cellules » pouvant restreindre leur passage d'un tissu à l'autre. Cependant, elles peuvent aussi servir de « route à cellules » comme nous allons le voir maintenant.

b. Migration

Les MBs servent de substrat auquel les cellules peuvent adhérer, via les récepteurs intégrines et dystroglycans. Cette adhésion est particulièrement importante pour la motilité des cellules. En utilisant la migration des cellules folliculaires (CF) pendant l'ovogénèse de la drosophile, il a été démontré que l'interaction MB/intégrine régulait le déplacement des cellules (Díaz de la Loza et al., 2017). Dans ce modèle, les CF ont besoin d'être mobiles pour permettre une rotation de la chambre d'œuf, nécessaire à la maturation de cette dernière. La motilité de ces cellules repose sur l'interaction dynamique de leurs récepteurs intégrines avec la Lam de la MB, autrement dit les cellules « marchent » sur la MB via les intégrines, ce qui provoque la rotation de la chambre d'œuf toute entière (Fig 10). L'initiation et la rapidité de ce mouvement sont régulées par la quantité de Lam déposée dans la MB. Un autre exemple

est fourni par l'étude de la motilité des cellules de la glande salivaire pendant sa morphogénèse chez la souris (Hsu et al., 2013). Les auteurs ont mesuré la vitesse des cellules épithéliales en fonction de leur distance à la MB. Ils ont découvert que les cellules les plus rapides étaient celles qui étaient en contact avec la MB. Et que la motilité de ces cellules dépendait là encore des récepteurs intégrines. Une autre étude portant sur la migration des hémocytes lors de l'embryogénèse de la drosophile a aussi démontré que ces cellules, en produisant la Lam de manière autocrine, « bâtissaient » elles-mêmes le substrat nécessaire à la stabilité de leur lamellipode (Sánchez-Sánchez et al., 2017). L'interaction intégrines/Lam est donc aussi primordiale pour la migration des hémocytes embryonnaires. En outre, il a aussi été prouvé *in vivo* et *in vitro* que la migration des cellules était liée à la rigidité des matrices extracellulaires. Chez la drosophile, en utilisant la migration des cellules gliales dans le disque imaginal d'œil, il a été montré que la rigidité de la MB de ce tissu régulait ce processus (Kim et al., 2014). Un manque de rigidité généré par la suppression de l'enzyme LOX, responsable des liaisons covalentes dans le réseau Col IV (voir partie I.B.1.b) entraîne des défauts de migration. Ce mécanisme est aussi conservé pour des cellules tumorales, telles que les cellules de gliomes, qui migrent plus rapidement sur une matrice extracellulaire rigide (Kim et al., 2014; Pathak and Kumar, 2012). Cependant, une trop grande rigidité peut aussi avoir un effet négatif sur la motilité des cellules (Pathak and Kumar, 2012). De manière surprenante, les auteurs corrèlent ce phénotype de motilité avec la polarisation des cellules : les cellules ne présentent pas de polarité lorsque la matrice est peu rigide ou trop rigide. Il faut une rigidité intermédiaire pour qu'elles se polarisent. Il semblerait donc qu'il y ait un couplage entre la migration et la polarité cellulaire et que l'adhésion cellules/MB soit à l'interface de ce couplage.

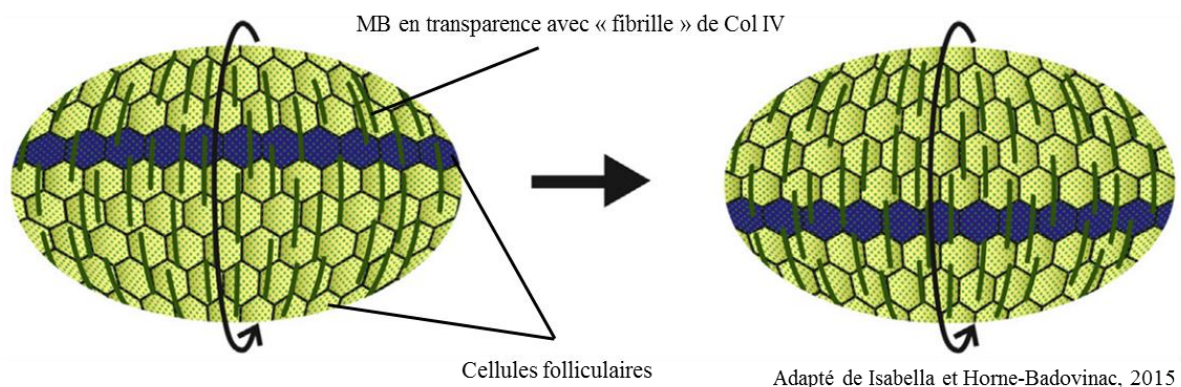


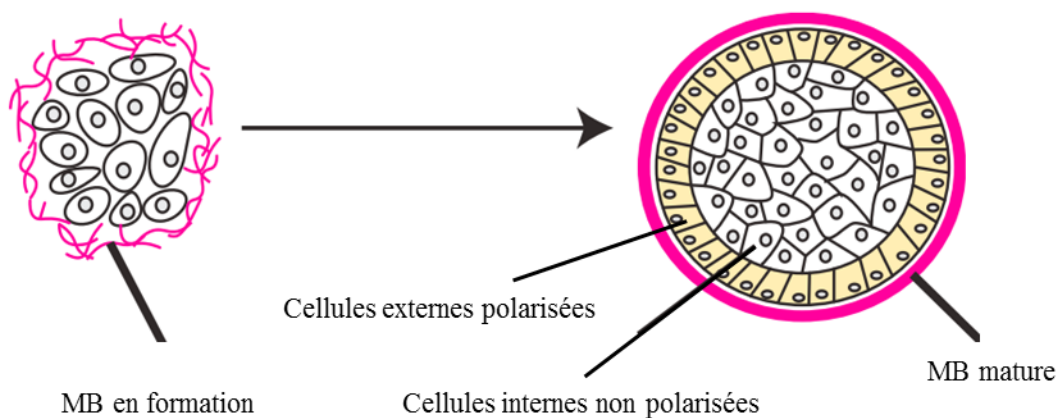
Figure 10 : Migration des cellules folliculaires dans la chambre d'œuf de la drosophile.

Les cellules folliculaires de la chambre d'œuf migrent de concert en utilisant la MB comme substrat stationnaire. Il en résulte une rotation du tissu entier.

c. Polarité

Les MBs sont nécessaires à l'établissement et/ou au maintien de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Il a été établi que la Lam et le Col IV étaient requis pour ce processus. En effet, l'inactivation de la sous-unité Lam α 5 chez la souris conduit à une absence de polarisation de l'épithélium dentaire (Fukumoto et al., 2006). De plus, des analyses *in vitro* sur des cellules épithéliales

mammaires ont démontré que la présence du Col IV était aussi requise pour la formation de la polarité apico-basale (Plachot et al., 2009) (Fig 11). Cependant, si la présence de la MB et son adhésion aux cellules sont requises pour indiquer à ces dernières qu'il « s'agit bien du côté basal », on est en droit de se demander de quelle manière cette MB a été déposée spécifiquement de ce côté avant même que les cellules ne soient polarisées. En utilisant le développement de la glande salivaire de la souris *ex vivo*, il a été démontré que le dépôt de la MB était orchestré par des mécanismes dépendants du complexe basolatéral PAR-1b/ROCK1 (Daley et al., 2012; Gervais et al., 2016). Ainsi, l'établissement de la polarité apico-basale des cellules épithéliales nécessite une coordination étroite entre les cellules, qui dirigent « en amont » le dépôt de la MB, et la MB elle-même qui participe à l'établissement de la polarité.



Adapté de Jayadev et Sherwood, 2017

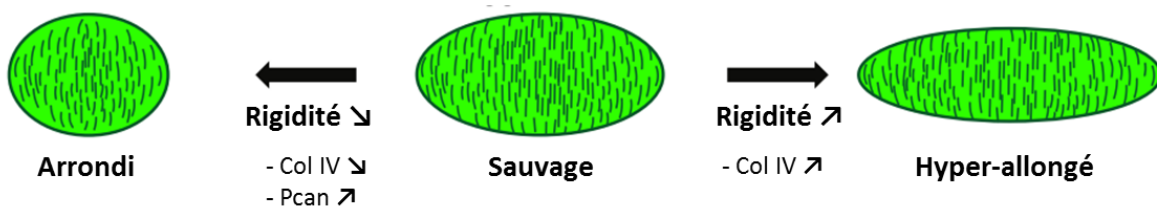
Figure 11 La MB est nécessaire à la polarisation de cellules épithéliales *in vitro*.

d. Morphogénèse tissulaire

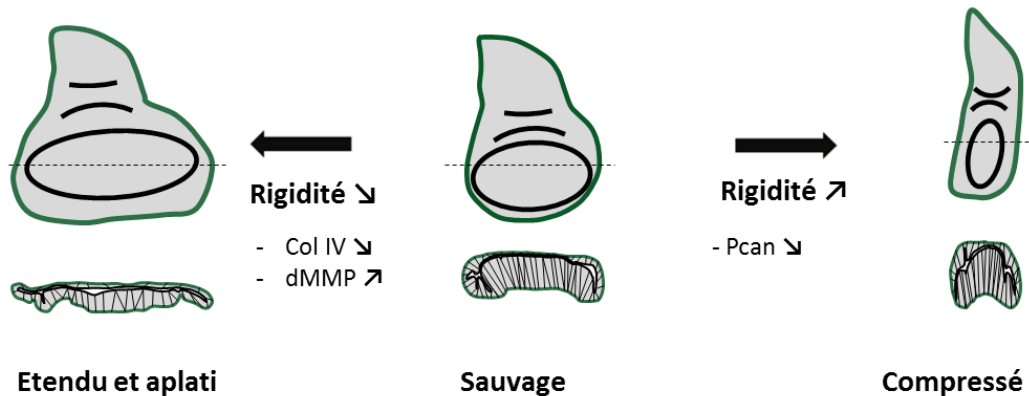
Maintenant que nous avons considéré les fonctions de la MB au niveau cellulaire pure, nous allons « boucler la boucle » et revenir au niveau tissulaire, plus global. Ces dernières années, de nombreuses études utilisant la drosophile comme tube à essai *in vivo* ont permis d'établir la contribution mécanique de la MB à la morphogénèse des tissus (Isabella and Horne-Badovinac, 2015a; Ramos-Lewis and Page-McCaw, 2019). Notamment, il a été montré que les MBs de la chambre d'œuf (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017; Haigo and Bilder, 2011; Isabella and Horne-Badovinac, 2015b, 2016) (Fig 12A) et du disque imaginal d'aile (Ma et al., 2017; Pastor-Pareja and Xu, 2011) (Fig 12B) jouaient un rôle capital dans la morphogénèse de ces organes. Il a été prouvé dans la chambre d'œuf, et suggéré pour le disque d'aile, que le degré de rigidité des MBs entourant ces tissus était un paramètre indispensable pour l'acquisition de leur morphologie. La rigidité de la MB dépend en fait de sa composition, notamment de l'enrichissement en Col IV et en Pcan. En effet, les rôles antagonistes de ces deux composants dans les propriétés mécaniques de la MB ont été mis en avant dans les deux modèles tissulaires cités

précédemment (Isabella and Horne-Badovinac, 2015b; Pastor-Pareja and Xu, 2011). La démonstration la plus directe de cette antagonisme a été faite en mesurant directement la rigidité de la MB de la chambre d'œuf grâce à la Microscopie à Force Atomique (AFM) (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017). Dans ce tissu, la déplétion du Col IV provoque une diminution de la rigidité de la MB, ce qui a pour conséquence l'obtention d'une chambre d'œuf ronde. Au contraire, la surexpression du Col IV provoque un accroissement de la rigidité qui débouche sur une hyper-élongation du tissu. De son côté, une surexpression du Pcan provoque le même phénotype que la déplétion du Col IV. Ainsi, le Col IV assure la rigidité de la MB tandis que Pcan lui procure de l'élasticité. De plus, il a été prouvé que le degré de rigidité est distribué de manière hétérogène le long de la chambre d'œuf (Crest et al., 2017). Ce gradient de rigidité, reflet de la distribution des composants de la MB et notamment du Col IV, requiert

A



B



A & B adapté de Ramos-Lewis et Page-McCaw, 2019

Figure 12 : Rôle mécanique de la MB dans la morphogénèse.

l'intervention de la voie de signalisation Jak/STAT. Cette dernière permettrait de réguler la distribution asymétrique du ColIV en contrôlant éventuellement sa production et/ou son dépôt, impactant donc le gradient de rigidité (Crest et al., 2017). En outre, toujours avec le modèle de la chambre d'œuf, il a été montré que la voie morphogénétique Decapentaplegic (Dpp, homologue BMP2/4) était nécessaire à « l'adoucissement » (élasticité) de la MB (Chlasta et al., 2017), ce qui pourrait suggérer une régulation de la production/dépôt des composants de la MB par cette voie, notamment pour le Col IV et le Pcan. J'y reviendrai dans la partie concernant mes résultats.

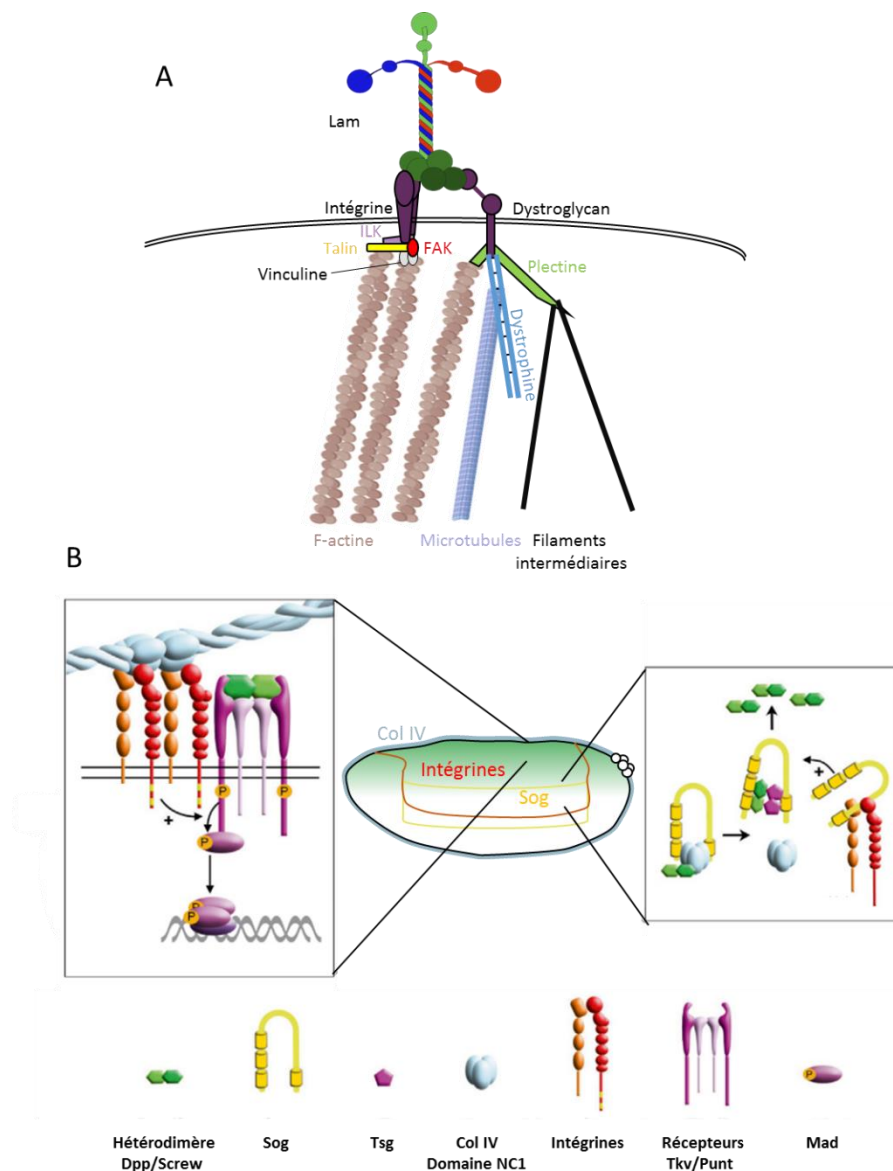
(A) Conséquences des manipulations de la MB sur la morphologie de la chambre d'œuf de drosophile. (B) Conséquences des manipulations de la MB sur la morphologie du disque imaginal d'aile de drosophile.

2. Une plateforme de signalisation

Les rôles mécaniques que la MB assure vis-à-vis des cellules qu'elle entoure ne sont possibles que grâce aux liens étroits qu'elle entretient avec ces cellules. Ces liens, ce sont les récepteurs intégrines et dystroglycans. Ces derniers sont des mécanosenseurs qui permettent à la cellule de s'enquérir de « l'état tensionnel » de son environnement (Kechagia et al., 2019; Yurchenco, 2015). En effet, ces récepteurs établissent un « pont » entre les MBs et le cytosquelette des cellules, notamment l'actine filamenteuse et le réseau de microtubules (Fig 13A). Un changement dans la rigidité de la MB peut notamment déclencher une signalisation « Outside-In » médiée par les intégrines (Lowell and Mayadas, 2012). Ce type de signalisation requiert la participation de complexes multiprotéiques intracellulaires, incluant la vinculine ou la taline, et qui permettent l'association à l'actine filamenteuse, ou bien des kinases telles que FAK (Focal Adhesion Kinase), les SFK (Src-Family Kinase) ou les ILK (Integrin-Linked Kinase) (Harburger and Calderwood, 2009). Ainsi, la rigidité plus ou moins forte de la MB aura pour conséquence un regroupement plus ou moins forte des intégrines, qui pourra déclencher toute une gamme de cascade. *In fine*, ces cascades intégrines-dépendantes peuvent réguler l'état du squelette ainsi que le programme transcriptionnel de la cellule. A travers ces processus, toute une variété de comportements cellulaires (que nous avons déjà mentionné pour certains d'entre eux) sont donc impactés : motilité, polarisation, prolifération, croissance, survie... Il a même été démontré que la signalisation liée aux intégrines agissait en synergie avec la voie morphogénétique Dpp dans l'embryon de drosophile (Sawala et al., 2015).

Outre cette signalisation mécano-dépendant, les MBs sont aussi des chémosenseurs qui lient des ligands tels que les morphogènes. Ces interactions reposent en grande partie sur la présence des PGSH de la MB, dont les chaînes SH sont notamment capables de lier des FGF et des BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (pour revue : (Yurchenco, 2011). Les démonstrations les plus éloquentes de ces interactions (SH-dépendante ou bien via le core protéique du PGSH) concernant Pcan, nous reviendrons ultérieurement sur ce sujet. Hormis les PGSH, d'autres composants de la MB ont déjà été impliqué dans la régulation des morphogènes. Chez les vertébrés, il a été montré *in vitro* que les Lam sont capables de lier de nombreux facteurs de croissances, tels que les FGF ou les BMP (Ishihara et al., 2018). De plus, le Col IV interagit aussi directement avec le morphogène BMP-2 *in vitro* (Paralkar et al., 1992). Cette interaction a été confirmée *in vivo* chez la drosophile. Chez cet organisme, il a été prouvé que le Col IV liait directement Dpp, l'orthologue de BMP-2/4, dans l'ovaire et l'embryon (Sawala et al., 2012; Wang et al., 2008) (Fig 13B). Dans l'ovaire ainsi que dans l'intestin, le Col IV restreint l'activité de Dpp à la niche occupée par les cellules souches (Tian and Jiang, 2014; Wang et al., 2008), tandis que dans l'embryon, il promeut l'activité du morphogène. Dans ce tissu, le Col IV agirait en tant

qu'« échafaudage », favorisant la formation du complexe de transport de Dpp (Dpp-Screw/BMP5-Sog/CHORDIN-Tsg/TWSG1), ce qui permettrait la diffusion du morphogène du côté dorsal (Sawala et al., 2012). De plus, le pic de signalisation lié à Dpp dans la ligne médiane dorsale de l'embryon requiert aussi la signalisation liée aux intégrines (Sawala et al., 2015). Cette dernière est activée par l'interaction directe intégrines/Col IV et favorise l'activité de la voie Dpp. Ainsi, le Col IV est au centre de l'activité du morphogène Dpp dans l'embryon. En outre, il a aussi été démontré dans l'embryon que la régulation positive du Col IV sur la signalisation Dpp permet la morphogénèse guidée des tubules de Malpighi (Bunt et al., 2010). Pour finir, on peut noter qu'il a été montré que la MB du disque imaginal d'aile était



Adapté de Sawala et al., 2015

Figure 13 : La MB en tant que plateforme de signalisation.

(A) La MB en tant que mécanosenseur : liaison aux intégrines et aux dystroglycans. (B) La MB en tant que chémosenseur : les composants de la MB participent à la signalisation des morphogènes. Exemple pour le Dpp dans l'embryon de drosophile.

responsable de la rétention du Dpp dans ce tissu, i.e. qu'elle empêchait ce dernier de s'évader du tissu (Ma et al., 2017).

A l'issu de ce chapitre, nous avons pu décortiquer la structure des MBs ainsi que leurs nombreuses fonctions. Cependant, tout au long, j'ai sciemment reporté les discussions relatives à un de ces éléments clés, son PGSH principal : le Perlécane. Il est désormais temps de rentrer dans les détails pour la molécule qui fut l'objet de toute mon attention ces quatre dernières années.

II. Le Perlécane, PGSH majeur des MBs

Depuis la première description de l'héparine (McLean, 1916), en passant par la découverte de la présence de chaînes SH dans la MBG (Kanwar and Farquhar, 1979a, 1979b), puis la découverte et le séquençage de Pcan à partir de la tumeur EHS (Hassell et al., 1980; Noonan et al., 1991), jusqu'à la manipulation du Pcan pour altérer les propriétés mécaniques de la MB (cf. Partie I.C.1.d), un siècle de découvertes nous contemple... Et cependant, « l'ours » est loin d'avoir vendu sa peau, en témoigne le titre éloquent d'une revue publiée en 2015 à son sujet : « The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New » (McCarthy, 2015). Dans ce chapitre, je vais donc humblement brosser le portrait de « mon compagnon de voyage », le Perlécane, qui tire son nom de sa forme caractéristique en « collier de perles » en microscopie électronique (Paulsson et al., 1987).

A. Structure du Perlécane

1. Un protéoglycane modulaire conservé

Le Perlécane est très conservé au cours de l'évolution (Fig 14) (Martinez et al., 2018). Les séquençages des génomes du cnidaire *Nematostella vectensis* et du placozoaire *Trichoplax adhaerens* ont d'ailleurs révélé l'existence du Pcan chez ces organismes évolutivement anciens (Putnam et al., 2007; Srivastava et al., 2008). De manière intéressante, il a été montré que Pcan était exprimé dans les tissus en régénération chez *N.Vectensis*, ce qui suggérerait que les fonctions du Pcan dans l'architecture des tissus en croissance seraient conservées (Warren et al., 2015). De plus, cette étude a aussi consacré le Pcan du placozoaire *T.adhaerens* comme « meilleure approximation du Pcan ancestral ». Dans cet organisme, le Pcan est codé par deux gènes distincts mais juxtaposés. Les auteurs suggèrent qu'une recombinaison intronique est à l'origine de l'obtention d'un seul et unique gène *pcan*. De surcroit, alors qu'il était admis que le module SEA était l'apanage exclusif du Pcan des vertébrés, ce domaine est retrouvé chez *T.adhaerens* ! En revanche, aucune séquence consensus d'attachement des chaînes SH n'a été retrouvée chez ces deux organismes anciens, même si la machinerie de synthèse de ces chaînes

est bien présente chez le placozoaire. On ne peut donc pas exclure la présence de chaînes SH sur ce Pcan ancestral !

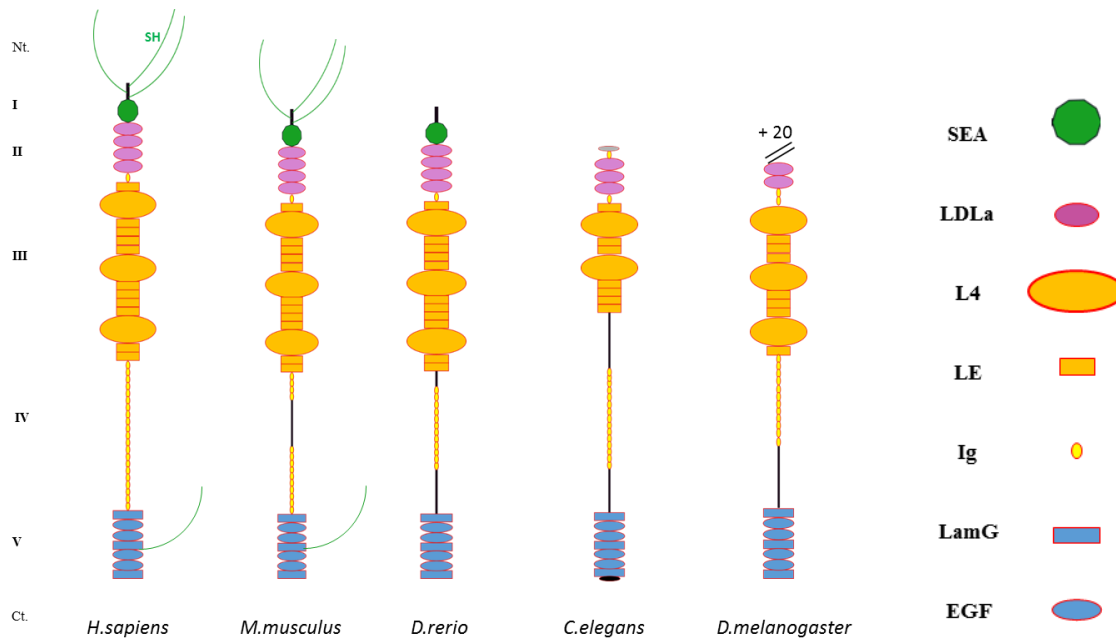


Figure 14 : Conservation de la structure modulaire du Perlécane dans différentes espèces.

Les chiffres romains numérotent les différents domaines. Ct : extrémité C-Terminale. Nt : extrémité N-Terminale.

Le Pcan est dit modulaire car composé de cinq domaines, eux-mêmes constitués par des motifs répétés. Ce sont essentiellement les variations dans le nombre de ces motifs qui font la différence entre les Pcan de différentes espèces. Par exemple, le nombre de répétitions du domaine Ig-like varie beaucoup d'une espèce à l'autre : on en compte 22 chez l'humain, contre 15 chez la souris et 14 chez la drosophile (Bix and Iozzo, 2008). Ces domaines, numérotés de I à V depuis le N-terminus jusqu'au C-Terminus, présentent de fortes homologies avec d'autres protéines.

Le Domaine I est le seul spécifique au Pcan. Il ne présente pas de motifs répétés, contrairement aux autres domaines. Il arbore trois sites d'attachement SGD (Serine-Glycine-Aspartate) pour les chaînes SH et un module SEA (Sperm Enterokinase Agrin) (Bork and Patthy, 1995; Murdoch et al., 1992). Bien qu'il existe d'autres sites d'attachement potentiels dans le reste de la séquence du Pcan (Murdoch et al., 1992; Zoeller et al., 2008), la proximité des sites SGD entre eux et la présence du module SEA combinées favorisent la synthèse des chaînes sulfatées dans le Domaine I (Dolan et al., 1997). Ces chaînes peuvent être des SH ou des SC, voir des sulfates de dermatane (Costell et al., 1997; Couchman et al., 1996; Dolan et al., 1997; Govindraj et al., 2002). De manière intéressante, bien que le poisson-zèbre possède un Domaine I avec module SEA, sa séquence est dépourvue de sites d'attachements SGD (Zoeller et al., 2008). De plus, le domaine I est considéré comme spécifique aux vertébrés puisque non détecté chez *C.elegans* et *D.melanogaster* (Farach-Carson et al., 2014). Ainsi, chez ces trois organismes,

le Pcan serait soit dépourvu de chaînes sulfatées, soit complété par des chaînes sulfatées sur d'autres domaines. Les auteurs de l'étude sur le poisson-zèbre parue en 2008 ont d'ailleurs constaté que le Pcan de cet organisme était sensible à l'héparitinase (Zoeller et al., 2008). De même, chez la drosophile, il a aussi été montré que le Pcan était sensible à cette enzyme (Friedrich et al., 2000). Ainsi, la dernière hypothèse paraît la plus probable.

Le Domaine II consiste en une répétition de motifs homologues aux récepteurs LDL (Low Density Lipoprotein) suivis par un motif Ig-like homologue aux protéines d'adhésion N-CAM (Murdoch et al., 1992). Il a été démontré chez le poulet que ce domaine pouvait lier les LDL et les VLDL (Very LDL) ainsi que les Apolipoprotéines B situées à la surface de ces dernières (Hummel et al., 2004). Ces interactions dépendent essentiellement des glycosylations que subit le domaine II (Costell et al., 1996; Xu et al., 2015). Chez les vertébrés, on compte quatre répétitions du motif LDLR et un seul motif Ig-like. De manière spectaculaire, le nombre de répétition LDLR grimpe à 22 pour la drosophile, qui présente aussi deux Ig-like à la suite des LDLR (Bix and Iozzo, 2008).

Le Domaine III est constitué par des motifs homologues au bras court de la Lam α (Murdoch et al., 1992). Il s'agit de motifs Lam globulaires L4 séparés par des motifs Lam LE. Ce domaine est particulièrement conservé. Chez les vertébrés on compte trois modules L4 et 11 modules LE (Bix and Iozzo, 2008). Le nombre de modules L4 est identique chez *D.melanogaster* et descend à deux chez *C.elegans*. Par contre, ces deux invertébrés présentent une quantité plus restreinte de modules LE, au nombre de sept. En outre, il a été montré biochimiquement que ce domaine pouvait interagir avec lui-même (Mongiat et al., 2000). Ceci suggère que le Pcan est capable de s'oligomériser.

Le Domaine IV est la région la moins conservée du Pcan (Martinez et al., 2018). Il est constitué par des répétitions de motifs Ig-like, homologues aux motifs des protéines d'adhésion cellule-cellule N-CAM (Murdoch et al., 1992; Noonan et al., 1991). Il a d'ailleurs récemment été démontré que des chondrocytes murins en culture formaient des amas lorsqu'ils exprimaient un Domaine IV recombinant (Martinez et al., 2019). Les répétitions Ig-like sont au nombre de 21 chez l'humain, 14 chez la souris et 12 chez la drosophile (Bix and Iozzo, 2008).

Le Domaine V consiste en trois motifs LG homologues à la Lam α , séparés par 4 motifs EGF-like (Murdoch et al., 1992; Noonan et al., 1991). Ce domaine est très conservé puisqu'il présente la même configuration chez les vertébrés et les invertébrés (Bix and Iozzo, 2008). De plus, il a été prouvé biochimiquement que le Domaine V pouvait être substitué en chaînes SH ou SC chez la souris et l'humain (Brown et al., 1997; Friedrich et al., 1999). Aussi connu sous le nom d'endorepelline, ce domaine a été extensivement étudié pour son rôle dans l'angiogénèse. En effet, le Domaine V peut être séparé du reste de Pcan par clivage MMP-dépendant et avoir un rôle anti-angiogénique (Gubbiotti et al.,

2017; Jung et al., 2013). A l'intérieur du domaine même, le troisième motif LG (LG3) peut aussi être clivé par la protéase BMP1/Tolloid-like et remplit le même rôle (Gonzalez et al., 2005).

2. Les isoformes du Perlécane

Tout comme les autres composants des MBs, le Perlécane possède des isoformes. Les différentes bases de données prédisent 6 isoformes chez l'humain (RefSeq, NCBI), 3 chez la souris (Mouse Genome Informatics), 2 chez le poisson-zèbre (ZFIN), 16 chez *C.elegans* (Wormbase) et 22 chez la drosophile (FlyBase). Chaque isoforme protéique est codé par un transcrit distinct.

Chez les modèles vertébrés, toutes les isoformes découleraient de l'activité d'une seule région promotrice. Cette dernière a été caractérisée chez l'humain et présenterait cependant trois sites d'initiation de transcription répartis sur soixante-dix paires de bases (Cohen et al., 1993; Iozzo et al., 1997). La diversité proviendrait donc majoritairement de l'épissage alternatif. Chez la souris, il a été démontré que le Domaine IV présentait des sites permettant ce processus (Noonan and Hassell, 1993). Dans cette étude, les auteurs ont réalisé un Northern Blot qu'ils ont longuement exposé, révélant trois bandes distinctes d'aspect « baveux ». Noonan et Hassel ont conclu sur l'existence d'au moins trois formes et avancent l'hypothèse que l'aspect des bandes pourrait reposer sur la présence de multiples isoformes peu représentées et résultant d'un épissage alternatif intense. La présence de telles isoformes chez l'humain a été démontré quelques années plus tard, toujours par Northern Blot (Groffen et al., 1997). Les chercheurs ont mis en évidence la présence de cinq variants d'épissage pouvant être spécifiquement exprimés dans plusieurs tissus humains, comme le cerveau ou le muscle squelettique. En outre, il a été démontré que cet épissage alternatif reposait en partie sur la protéine Smu-1 (Sugaya et al., 2006). En utilisant des mutants thermosensibles pour cette protéine dans une lignée cellulaire de hamster, Sugaya et ses collègues ont mis en évidence par RT-PCR la présence de multiples isoformes résultants d'épissage alternatifs dans la séquence codant pour le domaine IV.

De manière intéressante, l'étude précédemment citée découlait de travaux effectués sur le modèle invertébrés *C.elegans*, que l'on peut considérer comme le modèle « pionnier » dans la compréhension des variants du Pcan. Dans cet organisme, il a été montré que les motifs Ig-like du domaine IV subissaient des épissages alternatifs (Rogalski et al., 1995), essentiellement médiés par les protéines Smu-1 (Spike et al., 2001) et Mec-8 (Lundquist et al., 1996; Spike et al., 2002). De plus, d'autres sites d'épissages alternatifs sont aussi présents dans le domaine III du Pcan de ce nématode, Uncoordinated-52 (Mullen et al., 1999; Rogalski et al., 2001). En outre, ce mécanisme d'épissage combiné avec la présence de trois sites de polyadénylation distincts conduit à la production de trois types d'isoformes distinctes : longues (Domaine II à V), moyennes (Domaine II à IV) et courtes (Domaine II et III) (Rogalski et al., 1993). Si l'on considère l'ensemble des combinaisons possibles pour les différents sites

d'épissage, Rogalski et ses collègues estiment à 50 le nombres de variants possibles (Rogalski et al., 2001) !

Chez *D.melanogaster*, même si le nombre de transcrits prédits n'atteint pas les 50, on se retrouve tout de même avec 22 isoformes prédites (Flybase ; Fig 15). Cependant, aucune étude concernant les isoformes du Pcan dans cet organisme n'a été entreprise. En étudiant la séquence du Pcan chez cet organisme (aussi appelé trol pour Terribly Reduced Optic Lobes), on s'aperçoit que la majorité des transcrits prédits est le fruit d'épissages alternatifs au sein du Domaine II. Outre ces potentiels épissages alternatifs, la séquence présente trois sites putatifs différents d'initiation de la transcription et trois sites putatifs différents de polyadénylation.

Pour conclure cette partie sur les isoformes, je tiens à rappeler que je ne brosse qu'un tableau partiel puisque je n'aborde que le core protéique de cette molécule. Il ne faut en effet pas perdre de vue que la synthèse des chaînes sulfatées du Pcan peut elle aussi générer des variations qui influenceront les interactions et par conséquent les fonctions de ce PGSH !

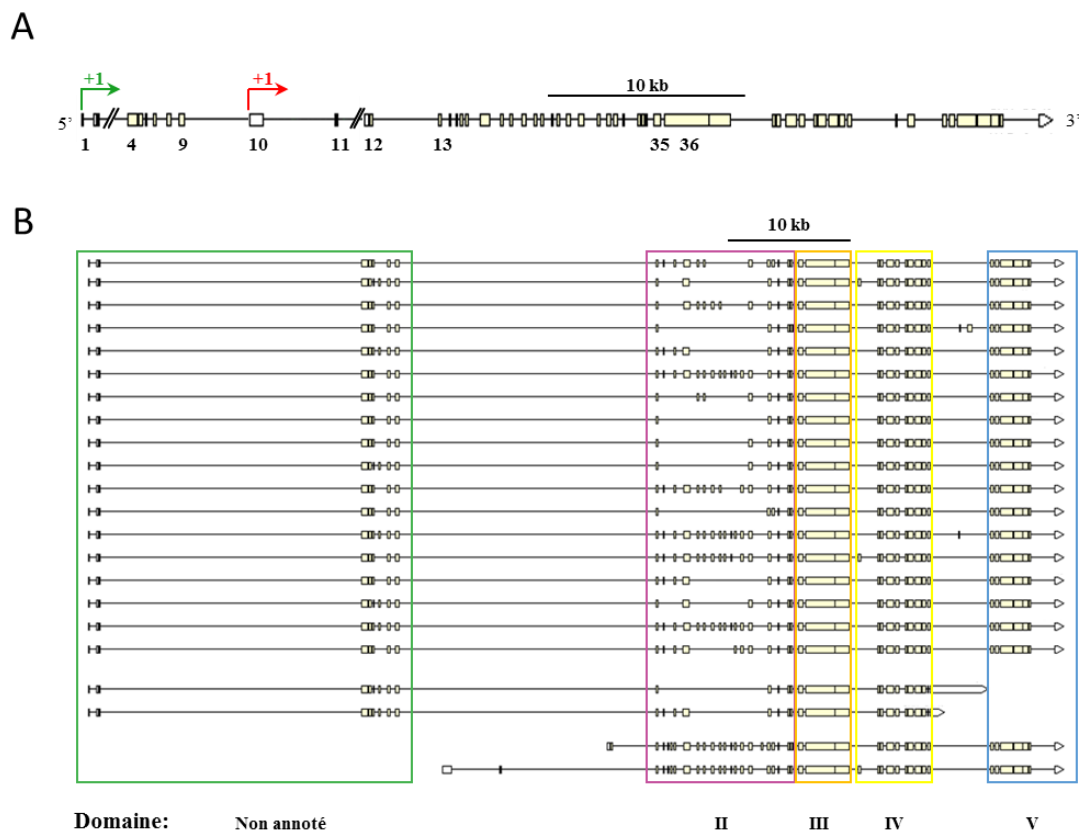


Figure 15 : Isoformes prédites du Perlécane chez *D.melanogaster*.

(A) Organisation du locus du Perlécane avec deux origines de transcription putatives notées +1 (flèches en angle). (B) Isoformes transcriptionnelles putatives. Les encadrés de couleur délimitent les différents domaines. (A & B) Les exons sont représentés par des rectangles, les introns par des traits.

3. Synthèse du Perlécane

Tout comme les autres composants des MBs, la synthèse du Pcan et de ses nombreuses isoformes peut être sujette aux régulations. Dans la partie I.B.3.a consacrée à ce sujet, j'avais précisé que cette régulation intervenait au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou post-traductionnel. Cette dernière catégorie recouvre la synthèse des chaînes sulfatées et les glycosylations du cœur protéique que nous avons déjà effleuré précédemment. La régulation post-transcriptionnelle, quant à elle, peut être traduite en termes de stabilité et de localisation de l'ARNm. A l'heure d'aujourd'hui et à mon humble connaissance, il n'existe pas de données claires concernant la stabilité des ARNm des composants des MBs. En revanche, le problème de la localisation de l'ARNm a déjà été abordé dans le chapitre I. Une étude réalisée sur les cellules folliculaires de la chambre d'œuf de drosophile avait montré que les ARNm codant pour le Col IV et la Lam étaient situés au pôle basal (Lerner et al., 2013). Cependant cette même étude montrait aussi que ce n'était pas le cas pour le transcrite codant pour le Pcan : ce dernier ne montrait pas de biais de localisation en faveur du pôle basal. Ceci suggère donc que, au moins dans ce tissu, la synthèse de Pcan n'est pas régulée de la même manière que les autres composants de la MB

En ce qui concerne la régulation de la transcription de *pcan*, la littérature se montre plus disserte. En effet, dès la première caractérisation de son promoteur de type « TATA-less » chez l'humain, des sites de liaisons aux facteurs de transcription Sp1 (à doigt de zinc) et ETF ont été identifiés (Cohen et al., 1993). Un peu plus tard, Iozzo et ses collègues ont démontré que le facteur de croissance/cytokine TGF- β stimulait la transcription du Pcan humain chez des fibroblastes humains en culture, via l'interaction directe entre le promoteur de ce dernier et le facteur de transcription NF-1 (Iozzo et al., 1997). Par la suite, d'autres cytokines ont été identifiées comme régulateurs de la transcription du *pcan* dans des cellules cancéreuses humaines en culture. D'une part, il a été démontré que l'IFN γ inhibait l'expression de *pcan* de manière Stat-1 dépendante dans des cellules de carcinome du colon (Sharma and Iozzo, 1998). D'autre part, plus récemment, il a été prouvé que le TNF- α était responsable de l'activation de la transcription du *pcan* via le facteur de transcription NF κ B dans des cellules tumorales prostatiques (Warren et al., 2014). De plus, dans des cellules de drosophile en culture, l'ARNm du *pcan* interagit directement avec les protéines de liaison aux ARN TBPH et Lark, protéines associées au complexe de régulation transcriptionnelle Nipped-B/Cohesin (Swain et al., 2016). Ceci suggère donc que ce complexe est impliqué dans l'expression de *pcan* chez la drosophile.

B. Rôle du Perlécane dans la stabilité des MBs

Le Pcan est le PGSH majoritaire des MBs. Tout comme ses « camarades », l'Agrine et le ColXVIII, il est un élément fondamental de la stabilité des MBs. Ce rôle, il le doit à sa capacité à lier tous les autres composants fondamentaux des MBs. Nous allons donc parler ici de ces interactions, de

la fonction du Pcan dans la biogénèse et la stabilité des MBs ainsi que des pathologies qui découlent de son absence.

1. Les interactions avec les autres composants des MBs

Le Pcan peut interagir avec les autres composants des MBs ainsi qu'avec les récepteurs cellulaires de cette dernière, via ses chaînes SH ou via son cœur protéique (Fig 16). Son interactome contient aussi d'autres protéines de la matrice extracellulaire au sens plus large, telles que la fibronectine, la fibuline-2, et la thrombospondine (pour revue : (Farach-Carson et al., 2014)). Ces interactions ne seront pas traitées ici, je me cantonnerai aux composants fondamentaux des MBs (Fig 16). De plus, les interactions Pcan/composants des MBs ont, pour la plupart, été démontrées biochimiquement en utilisant des modèles *in vitro*, essentiellement des cellules humaines ou murines en culture. Il sera donc important, dans les années à venir, de confirmer ces interactions *in vivo*.

Dans les années 1990, plusieurs études du laboratoire de Rupert Timpl s'accordaient à dire que l'interaction Pcan / Lam avait lieu entre les chaînes SH de Pcan et les domaines LN et LG de la Lam (Battaglia et al., 1992; Ettner et al., 1998; Friedrich et al., 1999; Talts et al., 1999). Les chaînes SH impliquées pouvaient être arborées par le Domaine I ou le Domaine V (Ettner et al., 1998; Friedrich et al., 1999). Cependant, la même équipe avait tout de même montré que l'héparine n'inhibait pas complètement l'interaction Pcan/Lam, ce qui suggérait que cette interaction pouvait être aussi SH indépendante (Brown et al., 1994). Ce résultat a été confirmé deux décennies plus tard. En effet, en purifiant la MB à la frontière du derme et de l'épiderme et séparant en les deux réseaux Lam et Col IV, il apparaît que le cœur protéique du Pcan peut interagir avec le réseau Lam (Behrens et al., 2012). Ainsi, le Pcan peut interagir avec la Lam soit via ses chaînes SH, soit via son cœur protéique.

L'étude citée précédemment démontrait aussi que les chaînes SH du Pcan interagissait avec le réseau Col IV. Cette démonstration ne revêtait cependant pas le même côté « sensationnel » que celle concernant le réseau de Lam. En effet, il avait déjà été démontré que les chaînes SH du domaine I de Pcan liaient le Col IV (Battaglia et al., 1992). En outre, le Pcan peut aussi compter sur son domaine IV pour interagir avec le réseau Col IV (Hopf et al., 1999; Whitelock et al., 1999).

Même s'il apparaît, au fil des décennies de recherches biochimiques, que le Pcan peut interagir via son cœur protéique et ses chaînes SH avec les deux réseaux Lam et Col IV, il en va autrement pour le Nid. Les interactions avec ce dernier s'effectuent apparemment exclusivement au niveau du cœur protéique (Battaglia et al., 1992). Cette liaison peut avoir lieu via le domaine IV (Hopf et al., 1999) et le domaine V (Brown et al., 1997). La liaison Pcan/Nid est souvent considérée à l'aurée de la liaison Pcan/Complexe Lam-Nid (Hopf et al., 1999). Le Nid renforcerait en effet la liaison Pcan/réseau Lam, constituant un lien supplémentaire entre ces deux acteurs fondamentaux des MBs (Brown et al., 1994).

Cependant, ce lien n'est apparemment pas toujours nécessaire, puisqu'il a été démontré que le Pcan peut à lui seul suffire à « ponter » les réseaux Lam et Col IV, notamment dans la MB séparant derme et épiderme (Behrens et al., 2012).

Le Pcan est aussi capable d'interagir avec les récepteurs cellulaires intégrines et dystroglycans (Bix et al., 2004; Friedrich et al., 1999; Nyström et al., 2009; Talts et al., 1999). Cette interaction est rendue possible grâce au domaine V, porteur de motifs Lam LG (Friedrich et al., 1999).

Enfin, le domaine V du Pcan est capable de se lier à l'endostatine, e.g la partie C-Term du Col XVIII (Mongiat et al., 2003).

Par conséquent, l'ensemble de ces interactions *in vitro* suggèrent fortement que le Pcan un acteur important dans la biogénèse et l'intégrité des MBs *in vivo*.

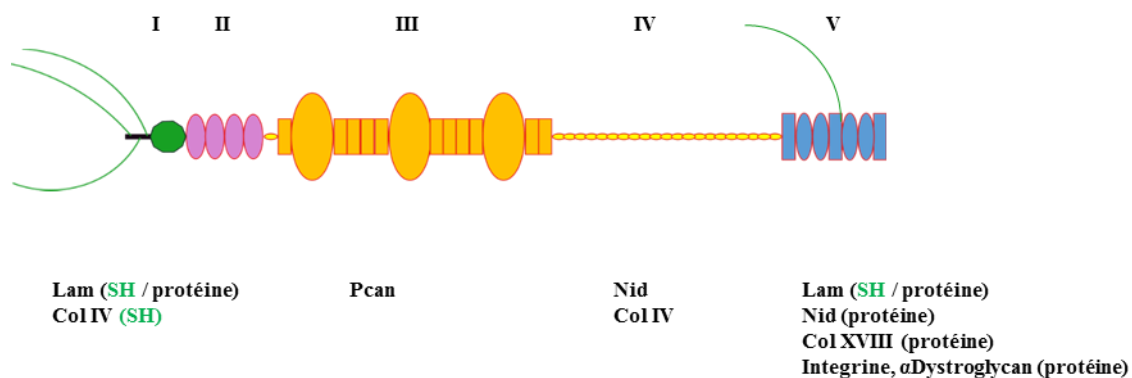


Figure 16 : Les interactions du Perlécane avec les différents composants des MB

2. Fonctions dans la stabilité des MBs

Pcan permettrait donc à la fois de faire le lien (« ponter ») entre le réseau Lam et Col IV (Behrens et al., 2012), et de renforcer l'ancrage des MBs aux cellules qu'elles bordent (Brown et al., 1997). Ces deux fonctions feraient de lui un garant de la stabilité des MBs. Ces conclusions, issues des études biochimiques que j'ai précédemment citées, ont bien évidemment été mise à l'épreuve de l'expérimentation *in vivo*, et je ne peux m'empêcher de citer le titre de l'article de Bjorn Olsen, « Life without Perlecan has its problems » (Olsen, 1999), pour introduire cette partie !

Chez les vertébrés, différents modèles de souris déficientes pour le Pcan ont été générés. Le premier d'entre eux, sobrement appelé *Hspg2*^{-/-} (le nom du Pcan chez les vertébrés étant Heparan Sulfate Proteoglycan 2) a été généré à la fin des années 1990 (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al.,

1999). En l'absence du Pcan, on observe une létalité tardive chez les souris, la première vague de mortalité survenant entre les stades embryonnaires E10 et E12, la seconde arrivant juste après la naissance, à P0. Les individus décédés entre E10 et E12 présentent une altération du développement céphalique (Arikawa-Hirasawa et al., 1999). Cependant, le phénotype « fatal » concerne le système cardiovasculaire (Costell et al., 1999). En effet, peu après que le cœur se soit mis à battre (E9.5), 70 à 80% des embryons meurent d'une hémorragie dans le péricarde, consécutive à un défaut de la MB bordant le myocarde. Alors que cette MB ne présentait aucun défaut à E9.5, elle apparaît complètement disloquée à E10.5. L'absence d'un tel phénotype dans les MBs de la peau et du tube digestif ont conduit Mercedes Costell et ses collègues à penser que le Pcan n'était pas requis pour la formation des MBs mais pour le maintien de leur intégrité, en particulier celles subissant un stress mécanique important. Pcan, certainement grâce à ses propriétés élastiques (déjà citées dans le chapitre I.C.1.d), permettrait donc aux MBs mécanosensibles de réaliser leur fonction de barrière tout en « souplesse ». N'oublions cependant pas les 20 à 30 % d'embryons mutants qui passent outre cette période critique et arrivent à terme. Une étude a permis de mettre en évidence chez ces survivants un mécanisme de compensation dans lequel les contacts cellules-cellules N-cadhérine dépendants permettent de contrebalancer l'étiologie de la MB cardiaque (Sasse et al., 2008). Subsidièrement, les individus ayant survécu à la première crise présentent par la suite une sévère chondrodysplasie accompagnée par une exencéphalie dans 6% des cas (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999). Ce phénotype montre que le Pcan est tout aussi important pour l'organisation d'une autre matrice extracellulaire spécialisée, la matrice cartilagineuse. Hormis la MB cardiaque et la matrice cartilagineuse, les souris déficientes pour Pcan présentent des anomalies au niveau des MBs bordant le système nerveux. Les souris *Hspg2*^{-/-} présentent en effet une absence d'acétylcholinestérase au niveau de la MB synaptique de la jonction neuromusculaire (Arikawa-Hirasawa et al., 2002). Cependant, la létalité périnatale empêchant une analyse plus poussée, des souris possédant un allèle hypomorphe du Pcan ont été générées (Bangratz et al., 2012). Chez ces animaux, la myélinisation des neurones par les cellules de Schwann est fortement diminuée, en particulier pour le segment associé à la jonction neuromusculaire. Il en résulte une hyperexcitabilité des nerfs périphériques et une neuromyotonie. Ainsi, bien que la MB entourant les cellules de Schwann semble normale, la réduction du dépôt de Pcan en son sein altère la physiologie neuromusculaire. Ceci démontre une nouvelle fois que le Pcan n'est pas nécessaire à la formation de la MB mais est requis pour l'accomplissement de sa fonction.

Afin de contourner la létalité induite par la déplétion totale du Pcan, d'autres lignées de souris ont aussi vu le jour. L'une d'entre elle, appelée *Hspg*^{Δ3/Δ3}, a vu son gène *Hspg2* amputé de l'exon 3 (Rossi et al., 2003). Or, cet exon est en fait celui qui porte les sites SGD d'attachement des chaînes SH du domaine I. L'utilisation de cette lignée a donc permis de mettre en évidence la fonction des chaînes SH du Pcan *in vivo*. Ces animaux sont certes fertiles mais présentent une microphthalmie sévère et une cataracte congénitale dès le plus jeune âge (3 semaines). Ces défauts sont dus à une dégénération de la lentille de

l'œil, dont la MB, aussi appelée capsule de la lentille, « semble moins compacte ». Cette altération ne permet plus à la MB de remplir son rôle de barrière : les cellules forment des extensions et la lentille commence à « fuir ». Les chaînes SH du Pcan sont donc requises pour l'intégrité de la MB entourant la lentille. Cette fonction semble cependant spécifique à la capsule de la lentille, les autres MBs ne souffrant pas de défaut apparent. La MBG, par exemple, semble être intacte, et les souris ne présentent pas de protéinurie. Cependant, il faut noter que l'injection intrapéritonéal de BSA chez ces souris provoque l'apparition d'une protéinurie, ce qui démontre que les chaînes SH du Pcan participent à la fonction filtrante de la MBG (Morita et al., 2005). De plus, les défauts d'œil de ces souris sont encore plus prononcés lorsque l'on retire aussi le Col XVIII de l'équation (Double mutant). Ce dernier résultat suggère donc une redondance fonctionnelle entre ces deux PGSH, ce qui pourrait masquer des phénotypes dans d'autres MBs. Ces défauts oculaires ont aussi été observés dans un autre modèle murin déficient pour Pcan MAIS viable appelé *Hspg2^{-/-}-Tg*, dans lequel l'expression du Pcan a été rétabli dans le cartilage afin d'outrepasser la létalité périnatale (Inomata et al., 2012; Xu et al., 2010). Dans ce modèle, les souris présentent aussi une microphthalmie due à un manque de différenciation des cellules épithéliales de la cornée (Inomata et al., 2012). Cependant, de manière frappante, la MB de la cornée ne semble pas affectée dans sa structure. Le phénotype observé pourrait donc être relié non pas au rôle du Pcan dans la biogénèse et l'intégrité des MBs, mais plutôt à son rôle dans la signalisation, en particulier en ce qui concerne les messages de différenciations. Ce modèle *Hspg2^{-/-}-Tg* a aussi été utilisé pour démontrer l'activité anti-autophagique du Pcan dans le muscle soleus passant par la voie mTORC1 (Ning et al., 2015). Cette étude, encore une fois, pointe du doigt le rôle du Pcan dans la signalisation et met aussi en exergue le rôle du Pcan dans le muscle. Ce phénotype musculaire est d'ailleurs retrouvé chez un autre vertébré, le poisson-zèbre, où un morphant pour Pcan présente une sévère myopathie, assorti de défauts cardiovasculaires (Zoeller et al., 2008). Ce dernier phénotype est lié, là encore, à la fonction du Pcan dans la signalisation, VEGF dépendante dans le cas présent (Zoeller et al., 2009).

Les études fonctionnelles chez les vertébrés ont amené une grande quantité d'informations concernant les conséquences d'une perte de Pcan sur la structure des MBs. Force est de constater que les travaux réalisés sur les modèles invertébrés, essentiellement *C.elegans* et *D.melanogaster*, ont, pour leur part, mis l'accent sur l'aspect signalisation (Gubbiotti et al., 2017). De plus, le modèle de la drosophile a permis récemment d'y voir un peu plus clair dans le rôle du Pcan dans les propriétés mécaniques des MBs et leur impact sur la morphologie des tissus, sujet déjà abordé dans le chapitre sur les fonctions des MBs. Ces modèles seront donc à l'honneur dans le prochain chapitre.

Pour conclure cette partie, il apparaît, à la lumière des différents cas que j'ai cités, que le Pcan, bien qu'inutile pour la formation des MBs, est requis pour son maintien et son intégrité. Ce rôle est capital pour l'accomplissement des fonctions des MBs. À l'image des phénotypes décrits précédemment chez la souris, une absence du Pcan chez nous, êtres humains, peut déclencher des pathologies dramatiques.

3. Pathologies

Outre son implication des de nombreux cancers, essentiellement liée à ses rôles dans l'angiogénèse (Theocharis and Karamanos, 2017; Zhou et al., 2004), le Pcan est le « coupable » de deux maladies congénitales sévères. En effet, des mutations dans le gène *HSPG2* codant le Pcan humain sont à l'origine de la dysplasie dyssegmentaire de type Silverman-Handmaker (DDSH, ORPHA :1865) et du Syndrome de Schwartz-Jampel (SJS, ORPHA :800), ces deux maladies génétiques provoquant un nanisme sévère voir léthal. Le phénotype de ces syndromes correspond à celui que présente les souris transgéniques décrites précédemment. Ces dernières sont donc devenues des modèles pour l'étude du DDSH et du SJS.

Le DDSH a pour origine des mutations entraînant l'abrogation de la sécrétion du Pcan. Peu de cas ont été moléculairement caractérisés (Martinez et al., 2018). La première identification d'une telle mutation a été réalisée en 2001 (Arikawa-Hirasawa et al., 2001). Ces premiers cas rapportés étaient dus soit à une duplication de 89 paires de bases dans l'exon 34 (Domaine III) soit à des mutations ponctuelles dans des sites d'épissages, provoquant l'épissage des exons 52 et 73 (Domaine IV). Les patients présentant cette affection génétique meurent à la naissance et présentent une dysplasie osseuse caractérisée notamment par une anisosphondylie (vertèbres mal différenciées), des membres courts et une petite taille très prononcée.

Le SJS, quant à lui, est provoqué par une mutation produisant un allèle hypomorphe mais néanmoins sécrété du Pcan (Martinez et al., 2018). Le SJS a été relié au Pcan lorsque Sophie Nicole et ses collègues ont identifié des mutations dans sa séquence génique chez trois patients en l'an 2000 (Nicole et al., 2000). Ces mutations concernent des sites d'épissage ou bien constituent des mutations faux sens dans les domaines III ou IV. Cette maladie n'engage pas le pronostic vital des individus atteints. Les patients présentant un SJS sont atteints de nanisme assorti de problèmes ostéoarticulaires, de myopie et de myotonie.

C. Rôle du Perlécane dans la morphogénèse des tissus

Parler du rôle du Pcan dans la morphologie des tissus est un peu réducteur. Il faut être fidèle au principe d'émergence. Le tout étant plus que la somme des parties, il est à mon sens plus juste de poser la question : que procure le Pcan aux MBs dans le contexte de la morphogénèse d'un tissu ? Cette question peut appeler deux réponses : (1) le Pcan procure de l'élasticité aux MB et (2) le Pcan lui permet d'interagir efficacement avec les molécules de signalisation impliquées dans la morphogénèse.

1. Participation aux propriétés mécaniques des MBs

Dans la partie concernant les fonctions des MBs, j'ai décrit la manière dont les rôles antagonistes du Pcan et du Col IV avaient été mis en avant chez la drosophile (cf partie I.C.1.d). Je me suis particulièrement attardé sur le modèle de la chambre d'œuf, dans lequel la rigidité de la MB a été directement mesurée par AFM (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017). J'ai aussi mentionné le modèle du disque imaginal d'aile, qui fut l'objet de travaux précurseurs en la matière (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Une attention particulière sera portée au disque imaginal d'aile dans le chapitre III. En revanche, je n'ai pas mentionné les études effectuées sur le système nerveux de la drosophile, qui ont elles aussi contribuées à la compréhension du rôle de la MB dans la morphogénèse. La digestion de la MB par dMMP2 au niveau du système nerveux centrale chez la larve de drosophile conduit à une relaxation de la MB, qui a pour conséquence une hyper-élongation du tissu (Meyer et al., 2014). De même, une surexpression du Pcan dans ce tissu entraîne le même phénotype (Pastor-Pareja and Xu, 2011), tandis qu'une déplétion du Pcan provoque une compaction massive du tissu, assortie d'une migration cellulaire ectopique hors du système nerveux central (caractéristique d'une perte d'intégrité de la MB) (Skeath et al., 2017). Tout comme pour les autres modèles cités plus haut, Pcan est donc apparemment aussi le curseur d'élasticité dans ce tissu. Ainsi, de manière générale, il semble que le Pcan confère aux MBs un potentiel d'élasticité qui leur permet à la fois de s'adapter à la croissance et au changement de morphologie des tissus, mais aussi de conserver intact leur rôle de barrière limitante pour les tissus : les cellules sont des « enfants » à qui il faut donner des limites, mais tout en souplesse, sinon ça casse !

Ce rôle « élastogène » du Pcan a aussi été considéré dans la matrice cartilagineuse (Wijeratne et al., 2016; Xu et al., 2016). Des mesures effectuées par AFM sur le cœur protéique du Pcan humain ont démontré que nous avons affaire à une protéine élastique mais solide (Wijeratne et al., 2016). Cependant, alors que qu'une perte de Pcan dans les MBs augmente la rigidité de ces dernières, il en va autrement pour la matrice cartilagineuse (Xu et al., 2016). En effet, une perte de Pcan dans cette matrice induit une décroissance de sa rigidité, ainsi que de la rigidité des cellules qu'elle borde. Les auteurs de cette étude pensent que ce phénotype repose sur les interactions complexes du Pcan dans le contexte du cartilage, qui font de ce PGSH une clé de voute de l'intégrité de cette matrice. Une perte de Pcan la désorganise d'ailleurs entièrement (Gustafsson et al., 2003). En outre, Xin Xu et ses collègues avancent l'hypothèse que la perte de Pcan priverait le tissu de la signalisation lié aux FGF. L'absence d'activité de ces voies de signalisation altérerait la déposition des composants de la matrice, et provoquerait donc l'effondrement de sa rigidité.

2. Liaison aux facteurs de croissance

Nous arrivons enfin à l'un des rôles clés du Pcan : sa capacité à interagir, via ses chaînes SH ou bien son cœur protéique, avec diverses molécules de signalisation (Farach-Carson et al., 2014; Whitelock et al., 2008). La liste fournie par M. Farach-Carson et ses collègues permet de dégager deux tendances : outre l'interaction SH-dépendante avec l'Interleukine 2 dans la rate murine (Miller et al., 2008), (1) le Pcan a une grande affinité pour les facteurs de croissance et (2) ses chaînes SH sont souvent mise à contribution dans ces interactions (Fig 17). Il faut cependant noter que la plupart des études biochimiques montrant les liaisons Pcan/facteurs de croissance ont été menées en utilisant des domaines de Pcan purifiés. Nombre de ces interactions nécessitent donc une vérification *in vivo*.

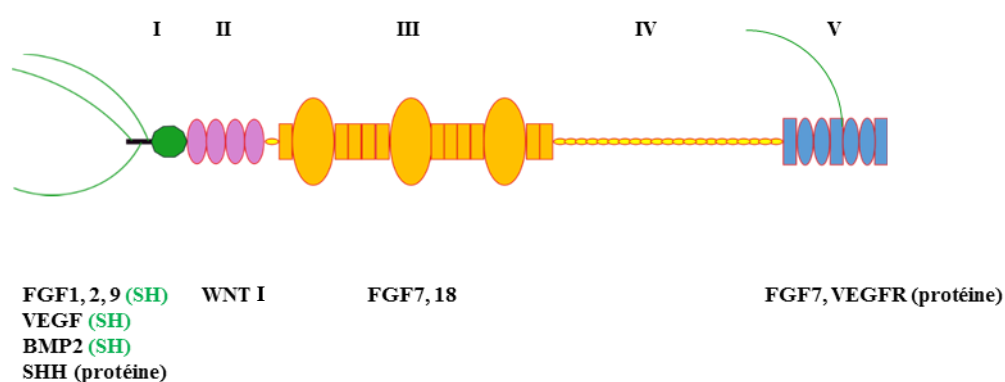


Figure 17 : Les interactions du Perlécane avec différents ligands de signalisation.

Parmi les facteurs de croissance, il est une famille dont la liaison au Pcan a été extensivement disséquée : les FGF. La régulation de ces derniers a été intimement liée aux PGSH chez les mammifères (Matsuo and Kimura-Yoshida, 2013). Il a été biochimiquement démontré, en utilisant des cellules de mammifères en culture, que le Pcan humain pouvait interagir avec les FGF1, 2 et 9 grâce à ses chaînes SH (Chu et al., 2005; Knox et al., 2002; Melrose et al., 2006), tandis que la liaison aux FGF7 et 18 passait par le cœur protéique (Mongiati et al., 2000; Smith et al., 2007). Ces différentes études *in vitro* démontrent aussi que l'interaction FGF/Pcan permet de réguler l'effet mitogénique des FGF, en particulier pour les chondrocytes. De plus, il est apparu que cette interaction dépendait aussi de l'isoforme du Pcan considérée. Par exemple, l'affinité de la liaison aux FGF 1 et 9 dépendait de l'origine chondrocytaire ou endothéliale du Pcan, ces deux sources produisant des versions différentes de Pcan (Melrose et al., 2006). De même, la spécificité de liaison du FGF2 avec ses différents récepteurs est finement modulée par le Pcan selon l'origine cellulaire de ce dernier (Knox et al., 2002). Les Pcan isolés à partir de deux types de cellules endothéliales se lient tous les deux au FGF 2 mais orientent l'interaction de ce dernier soit vers des récepteurs FGFRs distincts. Hormis ces démonstrations biochimiques *in vitro*, il existe encore peu de données *in vivo* à l'heure actuelle. Il a été suggéré que le phénotype du cartilage des souris dépourvues de Pcan ressemblait à un gain de fonction de FGF

(Arikawa-Hirasawa et al., 1999). De plus ; il a été montré que les chaînes SH du Pcan modulait l'activité du FGF10 durant la morphogénèse des glandes sous-mandibulaires de souris en culture *ex vivo* (Patel et al., 2007). En outre, l'interaction Pcan/FGF2 a été impliquée, cette fois-ci *in vivo*, dans la neurogénèse et le maintien du pool de cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire du cerveau murin (Kerever et al., 2014). Chez les invertébrés, des interactions génétiques ont aussi été établies *in vivo* entre le Pcan et les FGF (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2013; Lindner et al., 2007; Merz et al., 2003; Park et al., 2003). Chez *C.elegans*, le Pcan est impliquée dans la signalisation liée aux FGF lors de la migration des cellules « leaders » de la gonade (Merz et al., 2003). De même, tout comme chez la souris, le Pcan se lie directement à FGF2 et promeut sa signalisation dans le cerveau des larves de drosophile, ce qui a pour effet d'activer la prolifération des cellules souches neurales (Lindner et al., 2007; Park et al., 2003). A l'inverse, le Pcan réprime la signalisation liée aux FGFs dans la glande lymphatique (siège de l'hématopoïèse) de la drosophile, permettant ainsi de maintenir indifférencié le groupe de cellules sanguines progénitrices (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2013).

Hormis les FGF, l'interaction du Pcan avec le VEGF et ses récepteurs connaît un grand engouement. Il a en effet été démontré que les chaînes SH du Pcan humain sont capable *in vitro* de lier directement le VEGF (Zoeller et al., 2009). Cette interaction a pour effet de promouvoir l'activation de la voie VEGF/VEGFR dans les cellules endothéliales et par conséquent de stimuler l'angiogénèse. L'implication de l'interaction Pcan/VEGF dans la promotion de ce processus a été mise en évidence chez le poisson-zèbre notamment (Zoeller et al., 2009). En outre, il a aussi été démontré, toujours de manière *in vitro*, que le domaine V du Pcan pouvait directement lier les récepteurs VEGFR1 et 2 dans des cellules endothéliales humaines et porcines (Goyal et al., 2011). Arrivé ici, il faut dire qu'il existe un pan entier de littérature consacré aux rôles de cette endorepelline, dans l'angiogénèse. Les activités pro et anti-angiogénique du Pcan entier ou bien du domaine V clivé, ou bien de l'extrémité C-Terminal de ce même domaine V ont fait l'objet de débats intensifs dans lesquels je ne rentrerai pas (Whitelock et al., 2008).

Enfin, il a été démontré que le Pcan interagissait aussi avec les « morphogènes stars », SHH (Sonic Hedgehog) et BMP2. Le cas de WNT1 (Wingless iNTEgration site) semble beaucoup moins clair. En effet, même si l'interaction WNT/Pcan apparait dans de nombreuses revues, ces dernières sont clairement contradictoires (Farach-Carson et al., 2014; Whitelock et al., 2008). Il ne fait pas de doutes que les protéoglycanes, certainement via leurs chaînes SH, régulent l'activité de ce morphogène en le liant (Lin, 2004; Reichsman et al., 1996). Cependant, malgré mes recherches bibliographiques, je n'ai pas pu trouver une seule publication établissant un lien biochimique direct entre le Pcan et WNT. En revanche, il a été démontré qu'il existait une interaction génétique entre ces deux protéines chez *C.elegans* (Merz et al., 2003). En outre, le Pcan semble promouvoir la voie de signalisation WNT dans un modèle tumorigénique issu du disque imaginal d'aile de drosophile (Herranz et al., 2014). Pour finir,

la démonstration la plus directe d'un lien Pcan/WNT est attribuable à Keisuke Kamimura et ses collègues, qui ont prouvé que le Pcan régulaait la distribution extracellulaire de WNT dans la jonction neuromusculaire de la larve de drosophile (Kamimura et al., 2013). Dans le cas du SHH, la littérature est beaucoup plus claire. Le SHH forment un complexe avec le Pcan dans des cellules issues de cancer de la prostate (Datta et al., 2006a, 2006b), mais aussi dans des cellules murines et dans la larve de drosophile (Park et al., 2003). Dans les deux derniers modèles cités, l'addition d'héparine ne réduit pas l'interaction Pcan/SHH, ce qui suggère une liaison SH-indépendante. Dans le cas du cancer de la prostate, le Pcan stimule la signalisation SHH, ce qui a pour effet d'induire la croissance de la tumeur (Datta et al., 2006b). Chez la drosophile, le Pcan promeut aussi la signalisation SHH et, par conséquent, stimule la neurogènèse et le renouvellement du pool de cellules souches neurales durant le développement larvaire (Lindner et al., 2007; Park et al., 2003). En outre, le même type de régulation semble opérer dans la glande lymphatique de cet organisme (Grigorian et al., 2013). Dans cet organe, berceau des hémocytes larvaires, il a été montré que Pcan interagissait génétiquement avec SHH et promouvait l'activation de la voie de ce dernier. Cette régulation permet, *in fine*, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices des hémocytes. Terminons enfin par BMP2. Il a été prouvé que le domaine I recombinant du Pcan humain interagissait directement avec BMP2 *in vitro* et que cette interaction augmentait l'activité ostéogène du morphogène *in vivo* (DeCarlo et al., 2012). Cette liaison semble reposer sur les chaînes SH, le BMP2 humain ayant une grande affinité avec l'héparine (Ruppert et al., 1996). Cette interaction paraît conservée chez les invertébrés, même si nous n'avons pas d'évidence biochimique formelle. En effet, la migration des cellules « leaders » de la gonade chez *C.elegans* fournit de nouveau la preuve d'une interaction génétique entre le Pcan et BMP2 (Merz et al., 2003). Enfin, le modèle de tumeur implémenté dans le disque imaginal d'aile de drosophile semble indiquer que le Pcan promeut la signalisation du Dpp/BMP2 des cellules adéptheliales, accolées au disque et précurseurs des muscles du vol (Herranz et al., 2014).

III. La Morphogénèse : l'exemple de Dpp

A. Définition du morphogène

1. Généralités

A travers les parties précédentes, nous avons pu constater le lien étroit entre les MBs et la genèse de la forme des tissus. Cette relation repose sur les interactions entre les composants des MBs d'un côté et les voies de signalisation liées aux morphogènes de l'autre. Ces derniers, décrit pour la première fois en 1952 par Monsieur Turing, un Scientifique (avec un grand S) que l'on ne présente plus, sont les véritables chefs d'orchestre de ce processus complexe qu'est la morphogénèse (Tabata and Takei, 2004; Turing, 1952). Ces substances chimiques sont produites par des cellules dans une région restreinte, secrétées dans le milieu extracellulaire pour la plupart, et diffusent depuis leur source pour former un gradient de concentration. Ainsi, la quantité de morphogènes accueillie par les cellules receveuses compétentes va permettre à ces dernières de s'informer sur leur position spatiale dans le tissu (Wolpert, 1969). C'est par ce mécanisme qu'émerge la « régionalisation » ou « patterning », c'est-à-dire l'adoption d'une identité par les cellules, qui se traduit par leur engagement dans une voie de différenciation via activation de gènes cibles enclenchant un programme transcriptionnel précis. Ce concept est parfaitement illustré par le modèle du « French Flag » de Wolpert (Fig 18). Des quantités seuil de morphogènes permettent de distribuer des « rôles » aux cellules : trois groupes vont se singulariser en adoptant respectivement l'identité bleue (cible à courte distance/haute concentration de morphogène), blanche et rouge (cible à longue distance/basse concentration de morphogène). Cependant, nous avons ici affaire à un seul morphogène, agissant sur deux dimensions. Or, contrairement au chef d'orchestre, qui opère en solitaire, ces molécules doivent diriger en équipe, et donc établir des compromis avec leurs « camarades », et ce en trois voire quatre dimensions.

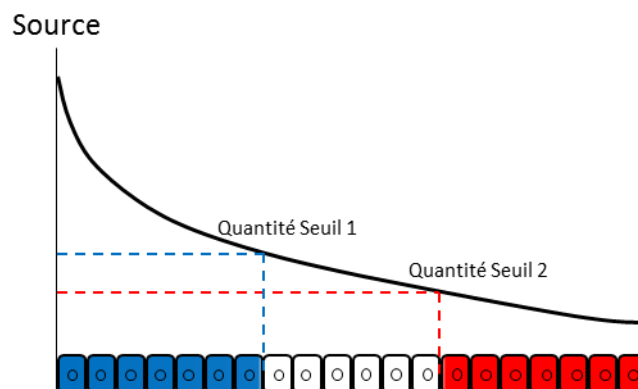


Figure 18 : Le modèle du French Flag.

Le morphogène diffuse depuis une source et forme un gradient de concentration. Ce gradient est décodé par les cellules selon des quantités seuils.

A mon sens, l'illustration la plus frappante de cette codirection est fournie par la morphogénèse de nos membres, à « nous-autres » les vertébrés. Le nombre de morphogènes impliqués, le nombre de centres organisateurs qui les produisent et les différents gradients résultants m'ont souvent fait dire que les chercheurs ayant travaillé sur ce modèle sont à la fois courageux et masochistes ! Sans rentrer dans les détails, le développement du membre se fait dans trois axes orthogonaux : proximo-distal, antéro-postérieur et dorso-ventral (pour revue (Delgado and Torres, 2017)) (Fig 19). En simplifiant, le premier permet de faire la différence entre le tronc (proximal) et les doigts (distal). Le second définit la position de chaque doigt, depuis le pouce (antérieur) jusqu'au petit doigt (postérieur). Le dernier distingue le dos (dorsal) et la palme (ventral) de la main. La régionalisation de l'axe proximo-distal repose sur l'activité des morphogènes WNT3a et FGFs émanant de la crête apicale ectodermique et signalant au mésoderme sous-jacent, tandis que la zone d'activité polarisante mésodermique produit le SHH nécessaire à la régionalisation antéro-postérieure. Enfin, l'ectoderme ventral produit des BMP qui vont restreindre la synthèse de WNT7a à l'ectoderme dorsal. Ces différents morphogènes vont agir de concert et permettre le développement en bonne et due forme de l'organe qui me permet d'écrire ces lignes.

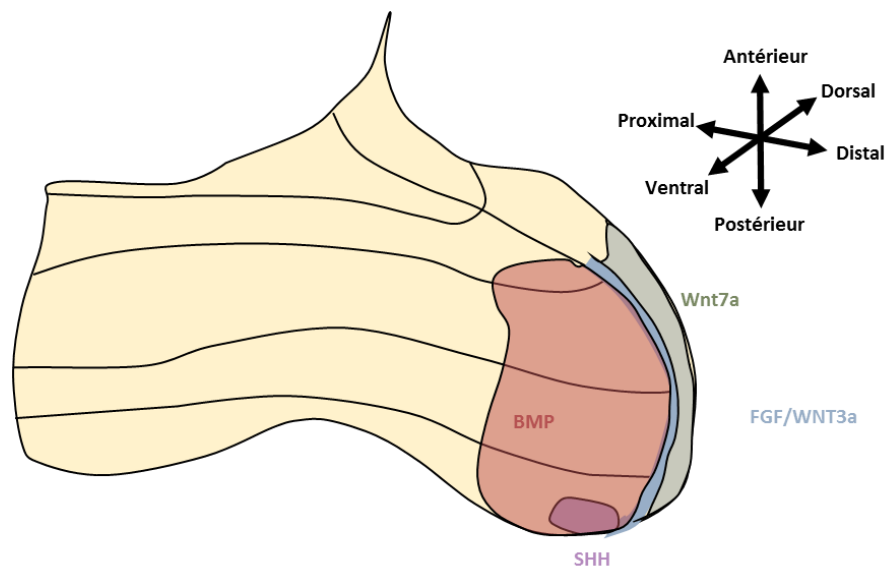


Figure 19 : Le bourgeon du membre des vertébrés comme modèle de morphogénèse.

2. L'établissement du gradient de concentration

La caractéristique qui rend les morphogènes si particulier, c'est leur diffusion en forme de gradient de concentration. La formation de ce gradient fait toujours l'objet de débats intenses dans la communauté, débats rendus complexe par l'utilisation de différents modèles tissulaires, et de différents morphogènes.

Le Dpp, homologue du BMP2/4 chez la drosophile, a fourni un paradigme dans l'étude de ce processus. Premier morphogène dont la sécrétion a été mise en évidence, il est responsable de la régionalisation dorso-ventrale dans l'embryon (Ferguson and Anderson, 1992) (Fig 20). Dans ce dernier, il s'est avéré

que Dpp était activement transporté pour établir son gradient de concentration (Shimmi et al., 2005). Alors que son domaine d'expression s'étend uniformément à toute la partie dorsale embryonnaire, son activité s'exerce uniquement dans la région de la ligne médiane dorsale, comme en témoigne le marquage du phospho-Mad (Mother against Dpp), l'effecteur activé de la voie. Ceci a pour résultat la définition de l'annexe extra-embryonnaire aminoséreuse (forte concentration) et de l'ectoderme dorsal (basse concentration) (Matsuda et al., 2016). En outre, le Dpp agit soit sous forme d'un homodimère Dpp/Dpp, soit sous la forme d'un hétérodimère Dpp/Screw, Screw étant l'homologue de BMP5. L'homodimère Dpp/Dpp serait utilisé pour spécifier l'ectoderme dorsal, tandis que l'hétérodimère Dpp/Screw spécifierait l'aminoséreuse (Matsuda et al., 2016). Le mécanisme de transport actif vise essentiellement l'hétérodimère et repose sur l'utilisation de Sog et Tsg, deux antagonistes extracellulaires des BMP les empêchant de se lier à leur récepteur (Ross et al., 2001; Shimmi et al., 2005). Ces deux protéines vont « escorter » le dimère Dpp-Screw jusqu'à la ligne médiane dorsale, où Sog est clivée par la métalloprotéase Tolloid, homologue de BMP1 chez les vertébrés (Shimell et al., 1991; Shimmi et al., 2005). Ce clivage entraîne le relargage du dimère Dpp-Screw qui peut alors interagir avec les récepteurs de la voie Dpp, Thickvein/Punt, et par conséquent déclencher la cascade de signalisation menant à l'activation du programme transcriptionnel spécifiant l'aminoséreuse.

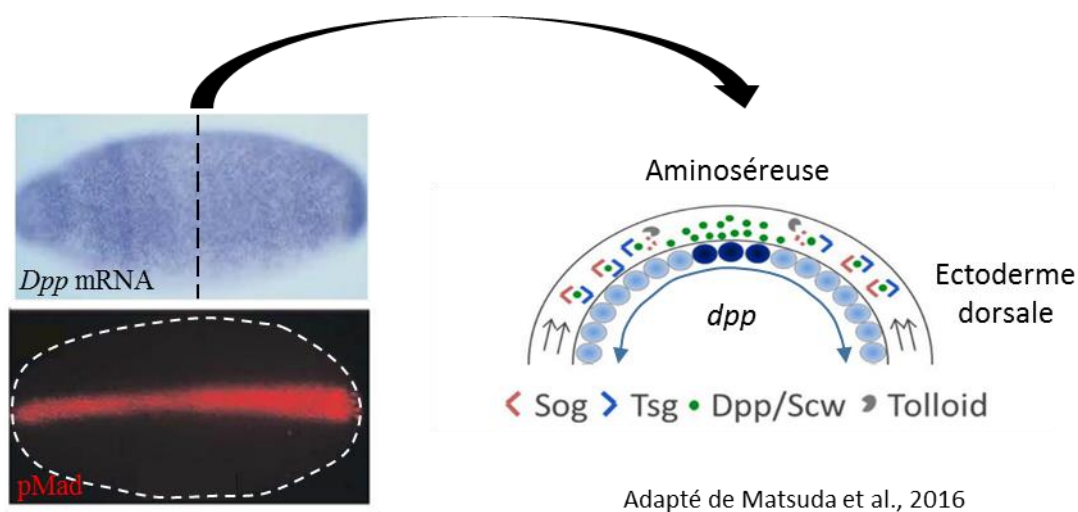


Figure 20 : L'établissement du gradient de Dpp dans l'embryon de *D.melanogaster*.

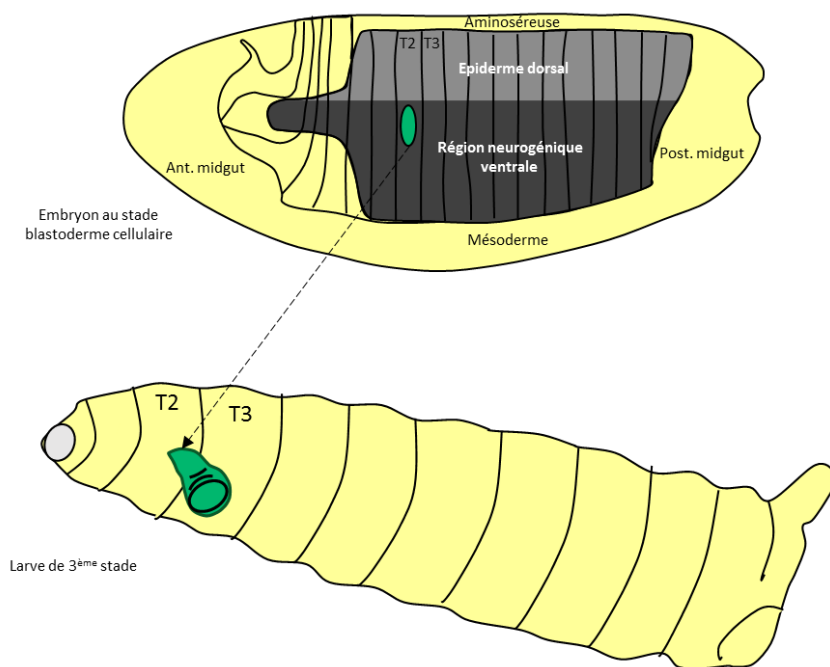
Le marquage du phospho-Mad (ou pMad) rend compte de l'activation de la voie Dpp.

Un autre tissu a aussi été extensivement utilisé afin de décrire l'établissement du gradient de Dpp. Ce tissu est le disque imaginal d'aile de drosophile.

B. Dpp et la morphogénèse du disque imaginal d'aile chez *D.melanogaster*

1. Origine et destin du disque imaginal d'aile

Le disque imaginal d'aile émane d'un groupe d'une vingtaine de cellules spécifiées dès le stade embryonnaire, appelé primordium dorsal (DP) et situé dans le deuxième segment thoracique (Ruiz-Losada et al., 2018) (Fig 21). Ce primordium va ensuite donner le disque imaginal d'aile au stade



Inspiré de Lewis I. Held, Jr, Imaginal Discs

Figure 21 : Origine du disque imaginal d'aile.

Le disque imaginal d'aile provient du primordium dorsal situé dans le segment thoracique T2 dans l'embryon.

larvaire. Ce tissu est un « sac » de cellules épithéliales constitué exclusivement de cellules cuboïdales au stade larvaire L1 (McClure and Schubiger, 2005). A partir de la fin du stade L2, les transitions de formes que vont subir ces cellules vont mener à l'obtention de trois types d'epithelia monostratifiés : un epithelium squameux (ES) que l'on appelle aussi « membrane péripodiale », un epithelium colonnaire (ECol) pseudostratifié et un epithelium cuboïdal (ECub) (Fig 22). Du côté apical de ces epithelia se trouve une lumière, séparant de manière notable les epithelia squameux et colonnaire. En outre, ces derniers n'ont pas exactement la même origine : alors que les cellules colonnaires dérivent à la fois de cellules antérieures et postérieures, les cellules squameuses sont uniquement d'origine postérieure (McClure and Schubiger, 2005). Le rôle de ces cellules squameuses de la membrane péripodiale fait l'objet d'une controverse. Alors qu'il était admis qu'elles servaient essentiellement durant le mécanisme d'éversion par lequel les cellules colonnaires sont externalisées pour pouvoir former une moitié de

thorax et l'aile adulte (Milner et al., 1984), d'aucun lui prête un rôle dans la régionalisation et la croissance de l'épithélium colonnaire (Gibson and Schubiger, 2000).

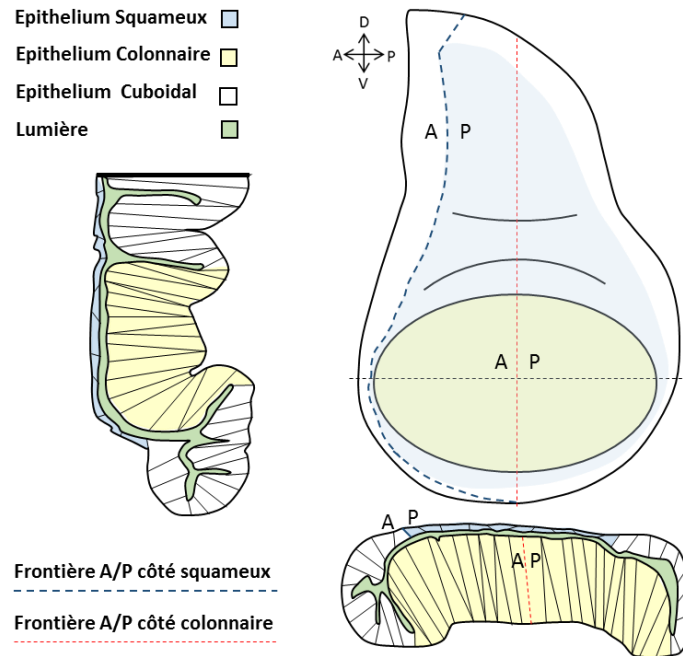


Figure 22 : Les epithelia du disque imaginal d'aile.

Durant les stades larvaires précoces (L1 et L2), Wg/WNT va définir le devenir d'une partie des cellules colonnaires que l'on appelle « la poche » en tant qu'aile (Swarup and Verheyen, 2012). Vein, ligand de la voie EGFR, va quant à lui spécifier le devenir de la partie proximale, le notum, en tant qu'hémithorax (Ruiz-Losada et al., 2018) (Fig 23). C'est cependant à l'étape du 3^{ème} stade larvaire (L3) que le disque imaginal d'aile a été le plus caractérisé.

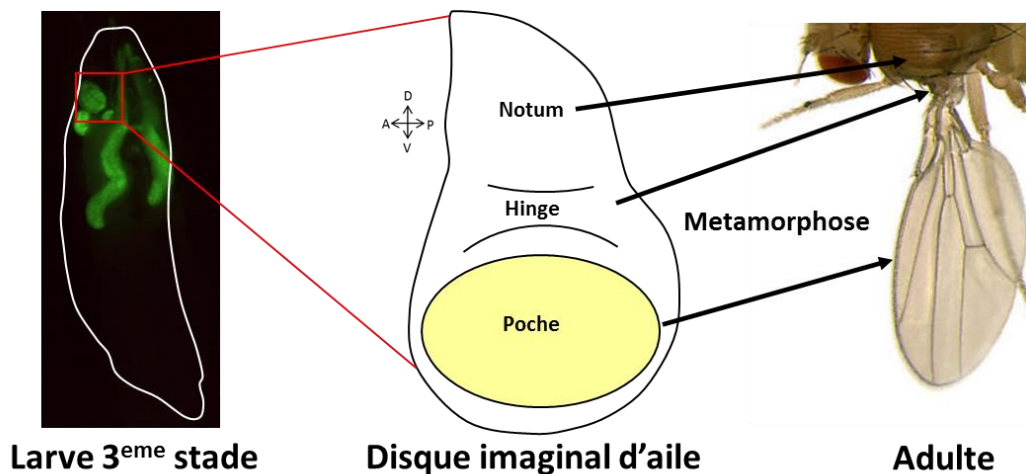


Figure 23 : Devenir du disque imaginal d'aile.

En effet, la régionalisation de la poche du disque imaginal d'aile est, à l'instar du bourgeon de membre chez les vertébrés, une « foire aux morphogènes ». Trois morphogènes distincts interviennent : Hedhehog (homologue de SHH) et Dpp qui contrôlent la régionalisation antéro-postérieure tandis que Wg dirige la régionalisation proximo-distale (Hartl and Scott, 2014; Restrepo et al., 2014; Swarup and Verheyen, 2012) (Fig 24). En plus de leur implication dans la régionalisation, Wg et Dpp interviennent aussi dans la croissance du tissu en favorisant la prolifération des cellules (Baena-Lopez et al., 2012).

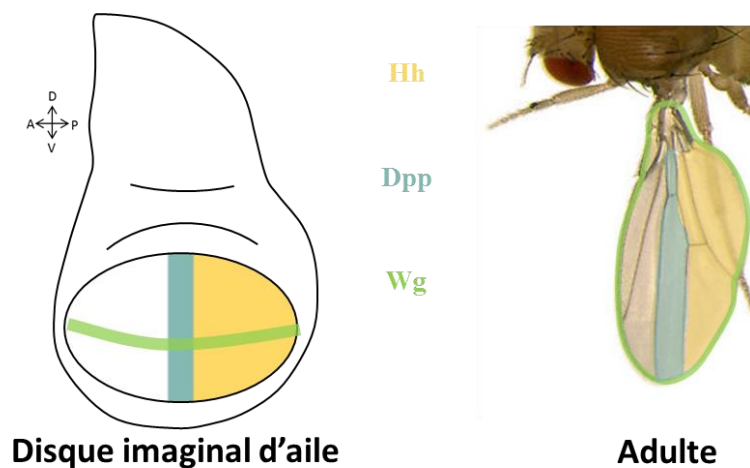


Figure 24 : Domaine d'expression des morphogènes Hh, Dpp et Wg dans la poche du disque imaginal d'aile et leur correspondance sur l'aile adulte.

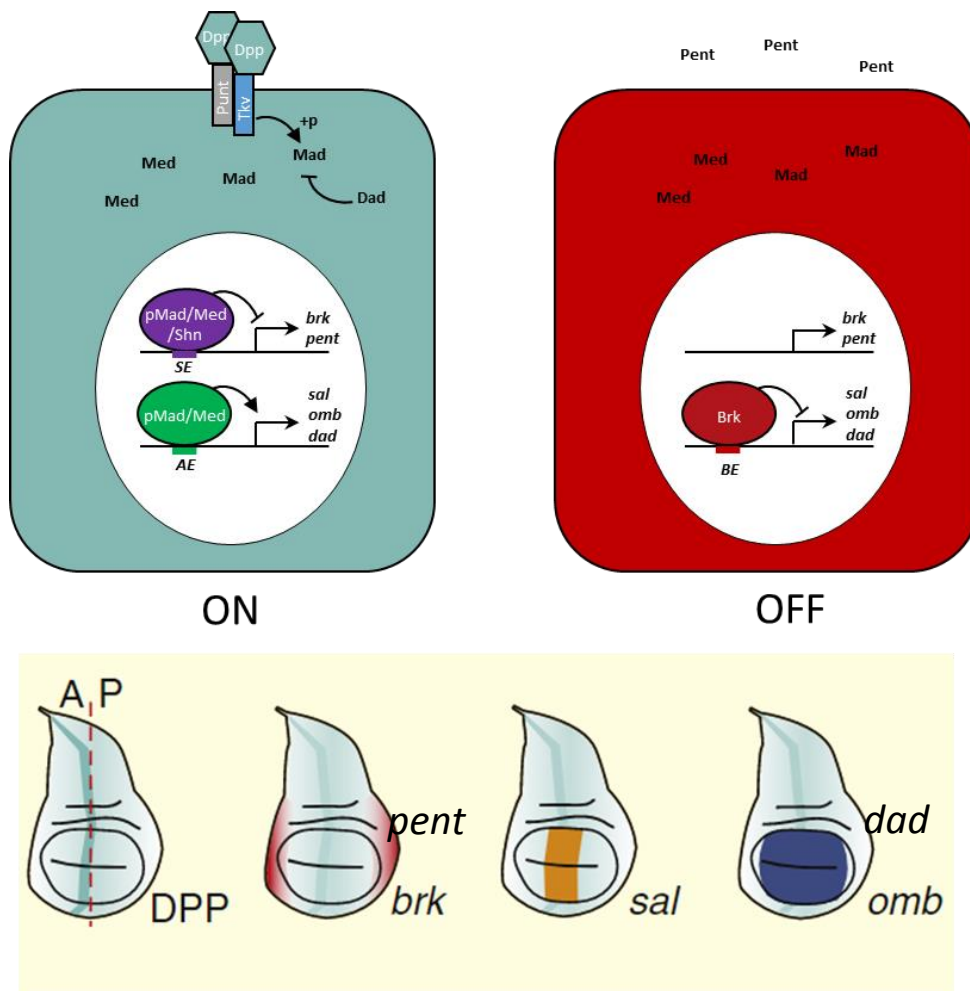
2. La voie de signalisation Dpp dans le disque imaginal d'aile

Au cours du troisième stade larvaire, le morphogène Hh va être exprimé du côté postérieur de la poche. Il va diffuser du côté antérieur, où il va activer différents gènes cibles. Parmi ces derniers, figurent *dpp* (Capdevila and Guerrero, 1994; Hartl and Scott, 2014). Ce dernier est transcrit dans une « bande » de cellules situées près de la frontière antéro-postérieure. Sa protéine va à son tour diffuser, mais pour sa part dans les deux compartiments, antérieur et postérieur.

a. Transduction et gènes cibles

Dans la poche, Dpp va activer sa voie de signalisation sous forme d'homodimère Dpp-Dpp ou d'hétérodimère Dpp-Gbb (Glass Bottom Boat, orthologue BMP 5/6/7/8) (Bangi and Wharton, 2006; Hamaratoglu et al., 2014; Khalsa et al., 1998; Ray and Wharton, 2001). Ces dimères vont se lier au complexe récepteur constitué de Thickvein/BMPRI1A-B (Tkv, Type I) et Punt/ACVR2A-B (Type II) (Hamaratoglu et al., 2014) (Fig 25). Cette liaison va induire la transphosphorylation de Tkv par Punt. Ainsi activé, Tkv va à son tour activer le SMAD1/5 Mother-against-Dpp en le phosphorylant (Mad,

pMad pour la forme activée). Le pMad va alors interagir avec le co-SMAD Medea (Med/SMAD4) et ce complexe de régulation transcriptionnelle va être transloqué dans le noyau. Sous la forme pMad/Med, le complexe est activateur et se lie à des éléments cis-régulateur appelés Activating Elements (AE) qui se situent en amont des gènes cibles Spalt/SALL 1/3 (Sal), Optomotor-blind/TBX2 (Omb) et Daughter-against-Dpp (Dad, inhibitory SMAD6/7) (Barrio and De Celis, 2004; Grimm and Pflugfelder, 1996; Sivasankaran et al., 2000; Weiss et al., 2010). Cependant, lorsque le complexe pMad/Med se lie à la protéine Shnurri/HIVEP2, le nouveau complexe pMad/Med/Shn qui en découle va être répresseur en se liant à des éléments cis-régulateurs appelés Silencing Elements (SE) (Gao et al., 2005; Marty et al., 2000). Ces éléments sont situés en amont des gènes cibles Brinker (Brk, pas d'orthologue connu) et Pentagone/SMOC2 (Pent) (Müller et al., 2003; Vuilleumier et al., 2010).



Adapté de Hamaratoglu et al., 2014 et Restrepo et al., 2014

Figure 25 : La voie Dpp dans le disque imaginal d'aile.

(A) Transduction. (B) Domaines d'expression des gènes cibles.

b. Diffusion

Avant d'activer toute cette cascade de signalisation dans la poche du disque imaginal d'aile, Dpp doit diffuser à travers ce tissu pour établir son gradient de concentration. La difficulté de l'étude de ce phénomène est initialement venue du manque d'outils pour suivre cette diffusion. Bien qu'un anticorps contre Dpp ait été généré (Gibson et al., 2002; Panganiban et al., 1990), il s'est avéré que ce dernier n'était pas « digne de confiance ». En effet, il reconnaît apparemment le prodomaine de Dpp, présent dans la proforme du Dpp mais absent de la forme sécrétée et active de ce dernier, obtenue après clivage au niveau des trois sites furine (Künnapu et al., 2009). Pour pallier à ce manque, différentes versions taguées de Dpp ont vu le jour, certaines exogènes (Entchev et al., 2000; Ross et al., 2001; Teleman and Cohen, 2000), d'autres directement réalisées au locus endogène (Bosch et al., 2017). Certains de ces outils ont permis d'étudier l'établissement du gradient de Dpp dans le disque imaginal d'aile et d'établir plusieurs modèles de diffusion (Matsuda et al., 2016; Restrepo et al., 2014). On distingue : (1) le modèle de diffusion médiée par transcytose (latérale), (2) le modèle de diffusion médié par les cytonèmes (apicale), (3) le modèle de diffusion libre (apicale ou basolatérale) et (4) le modèle de diffusion « restreinte » (apicale ou basolatérale). Le premier modèle reposait sur l'absence d'accumulation de Dpp-GFP au-delà de cellules clonales mutantes pour *shibire*, une dynamine requise pour l'endocytose (Entchev et al., 2000). Cette modèle a cependant été contredit par deux fois en faveur de la diffusion restreinte (Belenkaya et al., 2004; Schwank et al., 2011). Le deuxième type de diffusion proposé a pour origine la présence de Tkv et de Dpp-GFP le long de filopodes appelés cytonèmes (Hsiung et al., 2005; Roy et al., 2014). Le rôle de ces extensions cellulaires est cependant loin d'être clair, les outils pour les observer et les manipuler étant peu nombreux. Pour le modèle de diffusion libre, il s'agit d'une diffusion assortie d'une dégradation récepteur-dépendante. Le « cheval de bataille » de ce modèle consiste en fait à mesurer le coefficient de diffusion de Dpp dans la poche. Ces mesures ont tout d'abord été faites grâce à la technique du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), qui a mis en évidence un coefficient de diffusion faible, non compatible avec le modèle de diffusion libre (Kicheva et al., 2007). Une étude plus récente argue cependant que le FRAP n'est pas approprié dans ce genre d'analyse, car il ne tient pas compte de la présence éventuelle de deux groupes différents de Dpp : un rapide, et un lent (Zhou et al., 2012). Par une nouvelle analyse par Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence et par microscopie par fonction corrélative appariée, Zhou et ses collègues ont montré qu'une majorité de molécules Dpp diffusaient rapidement, tandis qu'une minorité diffusait lentement. Ainsi, il apparaît que deux modèles coexistent : la diffusion libre (groupe rapide) et la diffusion restreinte (groupe lent) que nous allons aborder dans le prochain paragraphe puisque reposant sur l'interaction Dpp/glypicans (Dally et Dally-like chez la drosophile).

c. Régulations

La voie Dpp est sujette à de nombreuses régulations. Tout d'abord, même si Hh permet la production de Dpp dans la fameuse « bande » de cellules antérieures, il en « profite » aussi pour réprimer l'expression de son récepteur Tkv dans cette même bande (Tanimoto et al., 2000). Le suivi de l'activité de la voie par l'immunomarquage de pMad permet d'ailleurs de mettre en évidence cette régulation, ce marquage présentant une « dépression centrale » caractéristique. Cette répression de l'expression de *tkv* dans le domaine d'expression de *dpp* n'est cependant pas du seul fait de Hh, puisque Dpp y participe aussi (Lecuit and Cohen, 1998). Le fait d'avoir moins de récepteur susceptible d'interférer avec la diffusion au niveau de la source elle-même permet à Dpp de se répandre à travers la poche. Hormis le contrôle de l'expression de son propre récepteur, il existe de nombreux rétrocontrôles que la voie Dpp met elle-même en place. En effet, la voie Dpp active la production de Dad et réprime celles de Brk et Pent. Ces trois protéines sont en fait des répresseurs de la voie Dpp qui agissent à différents niveaux. Brk est la « Némésis » de la voie Dpp. Il s'agit d'un facteur de répression transcriptionnelle qui agit sur les gènes cibles de la voie Dpp pour éteindre leur expression (Jaźwińska et al., 1999; Minami et al., 1999). La régulation de son expression étant Dpp-dépendante, la distribution de Brk se présente sous la forme d'un gradient de concentration inverse à Dpp. Il agit en rentrant en compétition avec le complexe pMad/Med pour la liaison aux éléments cis-régulateurs des gènes cibles. Ainsi, l'expression des gènes cibles de Dpp est en fait le reflet de cette « lutte fratricide ». Autre membre de la « famille », le SMAD inhibiteur Dad réprime la phosphorylation de Mad par Tkv (Inoue et al., 1998). Ce facteur joue un rôle clé puisqu'il sert à tamponner l'activation de la voie, et donc à garantir la robustesse de cette dernière (Ogiso et al., 2011). Enfin, le dernier arrivé, Pent, est une protéine extracellulaire dont la distribution est en gradient de concentration inverse à Dpp, à l'instar de Brk. Pent est nécessaire à la diffusion de Dpp. En son absence, le gradient est « contracté » et Dpp n'atteint pas les confins de son domaine d'activité, ce qui l'empêche de réguler l'expression de ses cibles à longue distance (Vuilleumier et al., 2010). En fait, Pent interagit avec les PGSH Dally et Dally-like et participe à la fonction de ces glypicans dans la diffusion à longue portée de Dpp (Norman et al., 2016; Vuilleumier et al., 2010, 2011). Cette interaction Pent/Dally ainsi que celle entre Pent et Dally-like (Dlp) permet d'internaliser ces deux glypicans (Norman et al., 2016). Ainsi, la régulation de la présence à la membrane de ces PGSH « ménage » la restriction de diffusion qu'ils induisent vis-à-vis de Dpp. Dally et Dally-like sont en effet les moteurs de ce modèle (Akiyama et al., 2008; Belenkaya et al., 2004; Fujise et al., 2003). Outre leur rôle dans la diffusion, ces glypicans sont aussi nécessaires pour l'activation de la voie Dpp dans les cellules receveuses du signal (Belenkaya et al., 2004; Fujise et al., 2003). Ces PGSH agissent sur Dpp en interagissant avec lui soit via leurs chaînes SH soit directement via leur cœur protéique (Bornemann et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2006).

3. Fonctions de la voie Dpp dans le disque imaginal d'aile

Dans le disque imaginal d'aile, Dpp est à la fois responsable de la régionalisation antéro-postérieure et de la croissance de la poche. Cependant, hormis ces deux fonctions majeures, ce morphogène semble être aussi impliqué dans d'autres processus. En particulier, Dpp régulerait l'élongation apico-basal des cellules du disque et serait au centre d'une communication inter-organe menant à la métamorphose. Nous allons donc dans cette partie passer en revue ces différentes fonctions.

a. Régionalisation de la poche

Le premier degré de régionalisation Dpp-dépendant dans la poche du disque imaginal d'aile vient de l'activation des gènes cibles Sal et Omb au stade L3 (Fig 26). L'expression de ces facteurs de transcription va définir des domaines le long de l'axe antéro-postérieur, ce qui va permettre d'accéder au deuxième degré de la régionalisation : le positionnement des futures structures appelées veines longitudinales L2 à L5 et des veines transverses antérieure et postérieures (Blair, 2007). Sal joue un rôle majeur, puisqu'il définit la position de la veine L2 dans le compartiment antérieur et participe aussi au positionnement des veines L3 (antérieur) et L5 (postérieur) (De Celis and Barrio, 2000; Sturtevant et al., 1997). Omb, avec l'aide de Brk, permet de positionner la veine L5 (Cook et al., 2004). Enfin, la voie Dpp participe, aux côtés de Hh, à la spécification de la future veine L4 et de la veine transversale antérieure L3-L4 (Crozatier et al., 2002), et est aussi requise pour la formation de la veine transversale postérieure L4-L5 (Ralston and Blair, 2005). Cette régionalisation, manifeste chez les adultes, peut être observé dès la fin du stade larvaire L3 et pendant le développement pupal grâce à un immunomarquage anti-dSRF (blistered) (Affolter et al., 1994; Conley et al., 2000; Cook et al., 2004).

Cette régionalisation est cependant étroitement lié à la croissance de la

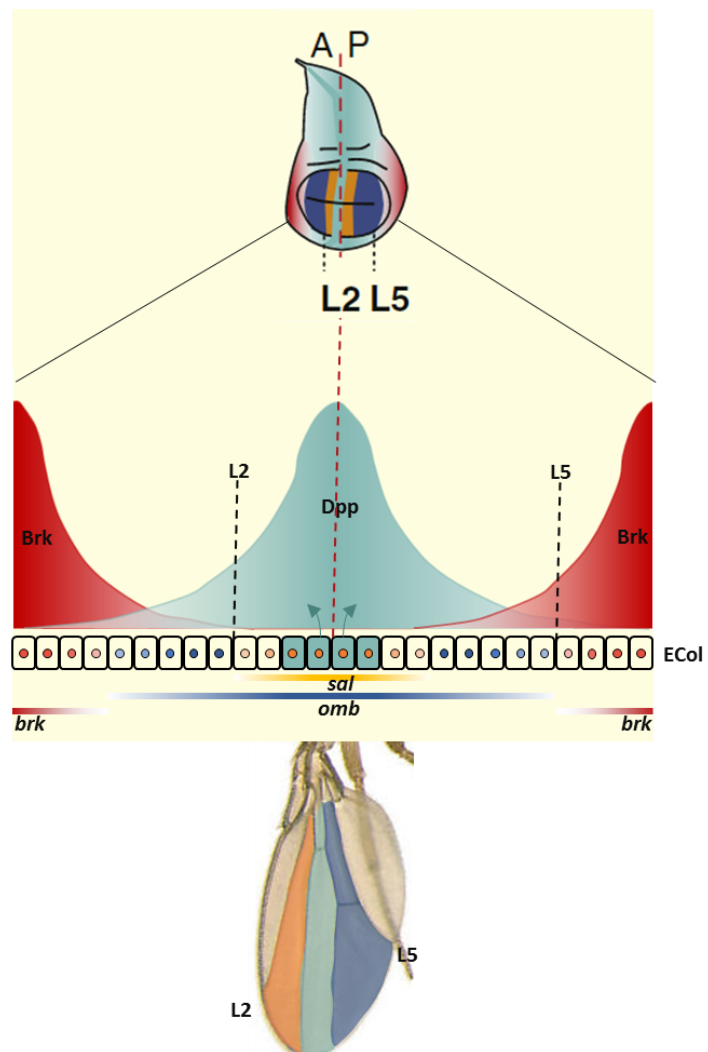


Figure 26 : Rôle de Dpp dans la régionalisation du disque imaginal d'aile.

poche elle-même (Restrepo et al., 2014). Ce couplage (aussi dénommé « scaling » du gradient Dpp pendant la croissance) est l'objet de débats intenses dans lesquels je n'interviendrai pas. Je me bornerai à mentionner l'implication de Pent dans ce processus (Hamaratoglu et al., 2011), qui pourrait donc suggérer l'intervention de PGSH...

b. Croissance de la poche

Ces dernières années ont vu la parution de nombreux articles concernant le rôle de Dpp dans la croissance du disque imaginal d'aile. Jusqu'en 2015, il était communément admis que Dpp était requis pour la prolifération des cellules dans le disque imaginal d'aile (Burke and Basler, 1996). Le débat portait essentiellement sur le fait de savoir si Dpp était directement impliqué dans cette croissance (Dpp instructif), ou bien si cette dernière était en fait liée à la répression de Brk par Dpp (Dpp permissif) (Hamaratoglu et al., 2014). Cependant, le 19 novembre 2015, deux articles parus dans Nature se font face à face, à l'image de bretteurs lors d'un assaut. D'un côté, Stefan Harmansa et ses collègues du laboratoire de Markus Affolter continuent de déchiffrer le rôle de la « bande » de Dpp dans la croissance du disque d'aile. Ils démontrent notamment que la diffusion du Dpp est requise pour la prolifération des cellules situées au milieu de la poche, mais non-nécessaire pour les cellules latérales. La balance penchait donc en faveur d'une croissance Brk-dépendante ou Dpp jouerait un rôle permissif. De l'autre côté, Akiyama et Gibson attaquent un dogme : leurs résultats indiquent que la « bande » Dpp n'est pas requise pour la prolifération des cellules du disque d'aile au stade larvaire L3 (Akiyama and Gibson, 2015).

Ce coup de théâtre va, apparemment, déchaîner les passions, puisque pas moins de trois articles vont être publiés ensemble sur le sujet, le 4 juillet 2017. Dans le premier, Matsuda et Affolter remettent en question l'utilisation d'un outil génétique utilisé par Akiyama en 2015. Le patron d'expression spatio-temporel du *dpp-gal4*, exprimant le facteur de transcription Gal4 sous contrôle du promoteur de *dpp* et censé induire, en combinaison avec un outil *UAS*, une perte de fonction de Dpp dans son domaine endogène, ne reflète pas le véritable patron d'expression du morphogène (Matsuda and Affolter, 2017). En utilisant un autre outil plus fidèle afin d'induire un mutant perte-de-fonction pour Dpp, Shinya Matsuda démontre que la bande de Dpp est requise pour une croissance en bonne et due forme, et ce durant les stades larvaires L2 et L3. Le deuxième article enfonce un peu plus le clou (Barrio and Milán, 2017). Tout comme Matsuda et Affolter, les auteurs émettent des doutes quant à la réactivité du système génétique utilisé afin de générer une perte de fonction pour Dpp. Ils se sont donc tournés vers l'utilisation d'ARN interférents combiné au système de contrôle spatio-temporel Gal4/Gal80 pour induire rapidement une déplétion de Dpp dans la poche. Et là encore, ils démontrent que le Dpp de la bande est requis pour la croissance de la poche entière, et ce depuis la spécification de la future aile au stade larvaire L2. En outre, Barrio et Milan suggèrent que le gradient de Dpp en lui-même n'est pas requis pour la croissance. Cette observation est confirmée dans le troisième article, où Bosch et ses collègues

démontrent que l'expression uniforme de Dpp dans la poche suffit à induire une croissance normale (Bosch et al., 2017) (Fig 27). Ce phénotype est expliqué par le fait que le niveau d'expression relativement faible du Dpp est suffisant pour réprimer l'expression de Brk, donc pour autoriser la prolifération. Ainsi, à l'issue de cette joute, il semblerait que Dpp ait en fait un rôle permissif pour la croissance plutôt qu'instructif.

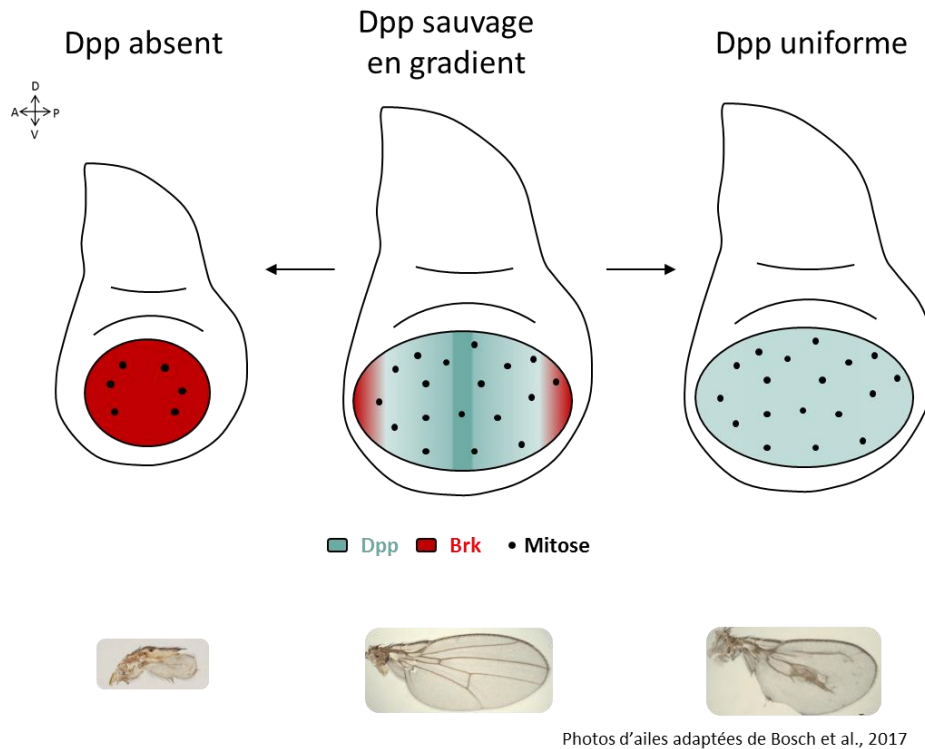


Figure 27 : Rôle de Dpp dans la croissance du disque imaginal d'aile.

c. Morphologie épithéliale

Hormis ces rôles dans la régionalisation et la croissance, la signalisation Dpp a aussi été impliquée dans la morphogénèse des cellules épithéliales du disque imaginal d'aile. Dans la poche, Gibson et Perrimon ont corrélé le gradient de Dpp avec la forme des cellules: colonnaire au centre (Haut niveau de Dpp), et tendant vers le cuboïdal sur les côtés (Bas niveau de Dpp) (Gibson and Perrimon, 2005). En outre, ils remarquent qu'il existe un gradient apical de microtubules dans la poche, gradient qu'ils corrélient aussi positivement avec celui de Dpp. Ils suggèrent donc que la voie Dpp pourrait avoir un rôle dans la morphologie des cellules de la poche à travers un mécanisme microtubule-dépendant. Widman et Dahmann ont confirmé par la suite que la signalisation Dpp était requise pour promouvoir et maintenir la forme allongée des cellules colonnaires en induisant une transition de forme cuboïdal-colonnaire via une modification du cytosquelette des cellules (Widmann and Dahmann, 2009a). A l'opposé, il a aussi été démontré la voie Dpp était requise pour la morphogénèse des cellules squameuses de la péripodiale (McClure and Schubiger, 2005). Dans cet article, les auteurs montrent que la voie Dpp est activée dans les cellules squameuses de la péripodiale, et que ces dernières deviennent toutes

cuboïdales quand ils inhibent la voie Dpp de manière autonome. L'activation de la voie Dpp dans les cellules péripodiales dépendrait du Dpp des cellules colonnaires et/ou cuboïdales, qui serait transmis aux cellules de la péripodiale via la lumière (Gibson et al., 2002). Ainsi la bande de Dpp pourrait contrôler à la fois les transitions cuboïdal-colonnaire et cuboïdal-squameuse. Une étude plus récente a pointé du doigt le rôle de Sal dans la régulation de ce mécanisme (Tang et al., 2016). Malgré l'activation de la voie Dpp dans les cellules de la péripodiale, Sal n'y est pas exprimé. En manipulant son expression dans la péripodiale et la poche, les auteurs ont montré l'implication de ce facteur de transcription dans l'allongement des cellules. Cet effet serait médié par Lines, protéine nucléaire connu pour promouvoir la morphologie colonnaire des cellules du disque imaginal d'aile (Nusinow et al., 2008). Ainsi, la présence de Sal Dpp-dépendant dans la poche induirait l'acquisition de la morphologie colonnaire, tandis que son absence (Dpp-indépendante) de la péripodiale promouvoir le destin squameux.

d. Métamorphose

Enfin, pour clore cette introduction, je vais brièvement mentionner le rôle de Dpp dans la métamorphose. En effet, deux publications parues en 2018 montrent que le Dpp agit sur l'initiation de la métamorphose (Denton et al., 2018; Setiawan et al., 2018). Même si ces études ne s'accordent pas sur la source du Dpp, les deux montrent l'activation de la voie Dpp dans la « ring gland » (équivalent de la glande pituitaire chez les vertébrés) jusqu'à l'initiation de la métamorphose. Denton et ses collègues pensent que le Dpp présent dans l'hémolymphe et responsable de cette activation provient du tube digestif, tandis que Setiawan et son équipe penchent pour le disque imaginal d'aile (Fig 28). Quoiqu'il en soit, l'activation de la voie Dpp dans la « ring gland » permettrait le blocage de la synthèse de l'ecdysone (hormone permettant la métamorphose) jusqu'à ce que les organes périphériques soient suffisamment matures. A ce moment-là, la source de Dpp se tarirait, permettant à la « ring gland » de produire l'ecdysone nécessaire à l'initiation de la métamorphose. Dans le scénario où le disque d'aile serait la source du Dpp systémique, la MB serait le commutateur qui permettrait de couper l'approvisionnement en Dpp de l'hémolymphe au moment venu. Il a en effet été montré que la dégradation de la MB du disque semblait promouvoir la sécrétion du Dpp vers l'hémolymphe (Ma et al., 2017)...

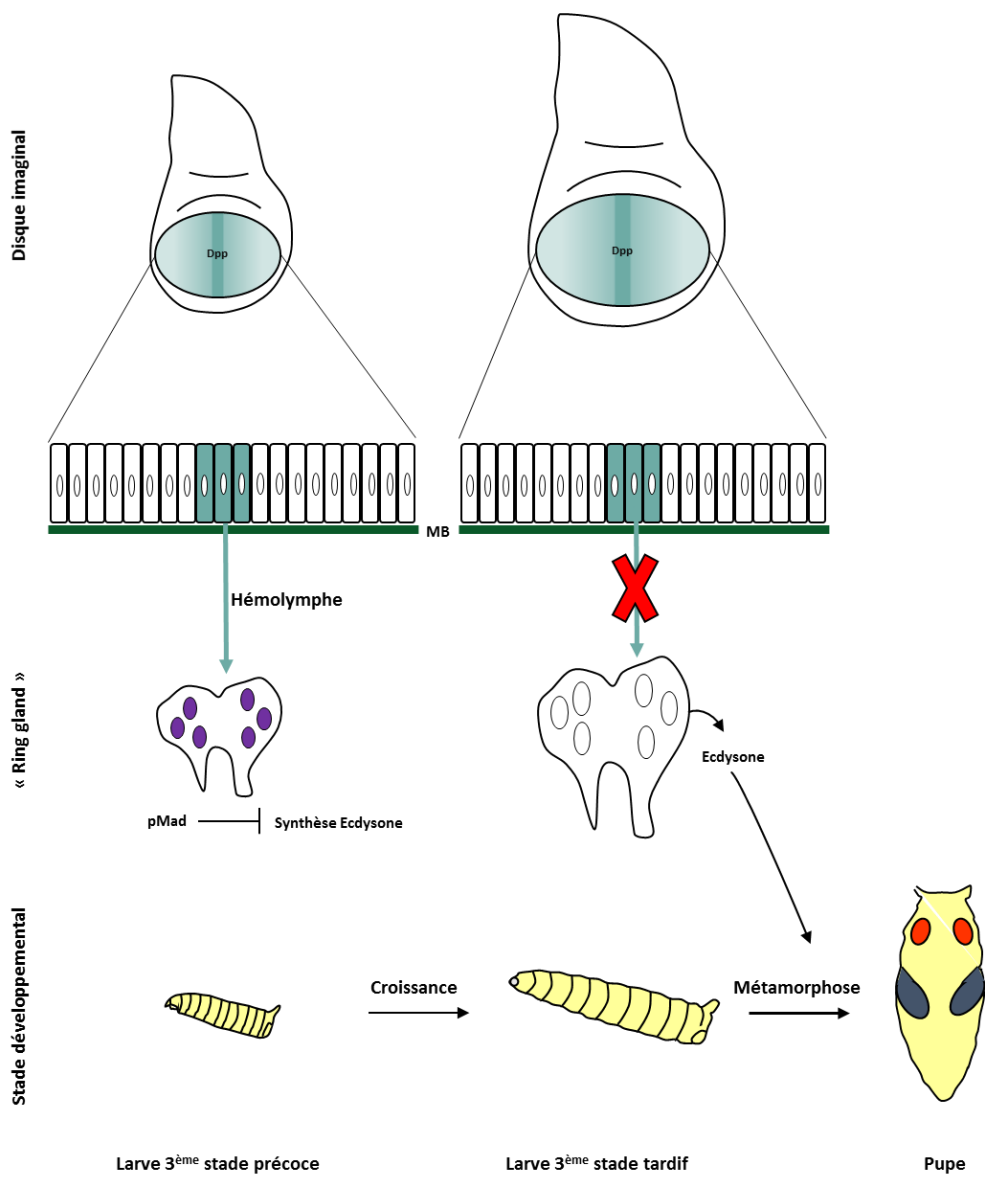


Figure 28 : Dpp du disque imaginal d'aile et métamorphose

Objectifs des travaux de thèse

A l'issue de cette introduction et avant de rentrer de plein fouet dans le détail des résultats, je me dois de clarifier d'entrée de jeu les interrogations auxquelles mes travaux de thèse ont tenté de répondre.

Comme je l'ai déjà (longuement !) expliqué, les MBs sont au centre de nombreux processus (Sekiguchi and Yamada, 2018). Leur impact sur le développement a notamment fait l'objet d'une attention toute particulière ces dernières années. L'utilisation de l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*, génétiquement plus simple et disposant d'outils génétiques puissants, a largement contribué à établir le rôle mécanique des MBs dans la morphogénèse (Isabella and Horne-Badovinac, 2015a; Ramos-Lewis and Page-McCaw, 2019). En substance, alors que le Col IV semble leur procurer la rigidité, le Pcan conférerait de l'élasticité (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017; Pastor-Pareja and Xu, 2011). Le Pcan est donc un élément essentiel au maintien et à la stabilité des MBs bordant les tissus en pleine morphogénèse, ces MB étant sujettes à des stress mécaniques intenses. Cependant, son rôle dans la formation des MBs *in vivo* reste un mystère. De plus, outre cette fonction mécanique, Pcan participerait activement à la signalisation liée aux MBs (Whitelock et al., 2008). Puisqu'il a été montré *in vitro* que Pcan interagit avec de nombreux ligands de signalisation. La plupart de ces ligands sont des morphogènes connus. Le Pcan serait donc le « chaînon manquant » permettant de coupler les aspects mécaniques et « signalisation » liés à la morphogénèse.

Par conséquent, en utilisant la morphogénèse du disque imaginal d'aile chez *D.melanogaster* comme modèle *in vivo*, je devais :

- Explorer le rôle du Pcan dans la formation de la MB et dans la morphogénèse du tissu sous-jacent ;
- Révéler l'existence d'interactions *in vivo* entre Pcan et les morphogènes dans ce tissu et caractériser le mécanisme d'action du Pcan sur ces derniers.

Ma partie Résultats sera donc constituée des deux articles en préparation correspondant respectivement à ces deux objectifs. Le premier article est orienté vers le rôle mécanique des MBs dans la morphogénèse, tandis que le second s'attarde sur la partie signalisation. S'ensuivra une discussion globale qui débouchera sur une conclusion où je tenterai d'harmoniser l'ensemble de mes résultats.

Résultats

I. Article n°1 :

Les MBs sont des MEC spécialisées entourant la plupart des organes. Elles leur procurent un support physique et leur garantissent une homéostasie tensionnelle. Sa biogénèse, dont le modèle est en grande partie bâti sur des travaux *in vitro*, découle de l'auto-assemblage péri-cellulaire de ces composants. La Lam et le Col IV forment deux réseaux distincts reliés par des protéines de liaisons, le Nid et des PGSH tels que le Pcan, majoritaire dans les MBs (Sekiguchi and Yamada, 2018). L'interaction de la Lam avec les récepteurs cellulaires intégrines et dystroglycans ancrent les MBs aux cellules qu'elles bordent. Il est communément admis que le réseau de Lam est nécessaire à la formation des MBs (Miner and Yurchenco, 2004; Miner et al., 2004; Smyth et al., 1999). De son côté, le réseau de Col IV est le garant de leur stabilité (Pöschl et al., 2004). Ce réseau est aussi requis pour l'incorporation du Pcan dans les MBs (Hollfelder et al., 2014; Matsubayashi et al., 2017). Ce dernier, quant à lui, n'est apparemment pas requis pour leur formation mais semble nécessaire à la stabilité des MBs subissant de grandes contraintes mécaniques (Costell et al., 1999).

Ces dernières années, le rôle mécanique des MBs lors de la morphogénèse des tissus a été l'objet d'une grande attention (Isabella and Horne-Badovinac, 2015a; Ramos-Lewis and Page-McCaw, 2019). L'utilisation de l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* a permis d'établir un modèle *in vivo* dans lequel le Col IV rigidifie les MBs et s'oppose au rôle élastogène du Pcan (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Cette interaction fonctionnelle entre ces deux composants a été extensivement étudiée dans le cadre de la morphogénèse de la chambre d'œuf et du disque imaginal d'aile, deux tissus où les MBs bordent des cellules épithéliales (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017; Isabella and Horne-Badovinac, 2015b, 2016; Pastor-Pareja and Xu, 2011).

Pendant le stade larvaire du développement de *D.melanogaster*, le disque imaginal d'aile est le précurseur de l'aile adulte. Durant le premier puis le deuxième stade larvaire, les cellules épithéliales le constituant sont cuboïdales. Au troisième stade, ces cellules acquièrent différentes formes. On distingue trois types d'épithélia monostratifiés : squameux (aussi appelé membrane péripodiale), cuboïdal et colonnaire pseudostratifié. La signalisation liée aux morphogènes Wg, Hh et Dpp, ainsi que le facteur de transcription Bowl et son régulateur Line ont été impliquées dans les transitions cuboïdale-squameuse et cuboïdale-colonnaire permettant la formation de ces différents épithélia (Gibson and Perrimon, 2005; McClure and Schubiger, 2005; Nusinow et al., 2008; Tang et al., 2016; Widmann and Dahmann, 2009a, 2009b). Ces protéines de signalisation induisent une réorganisation des microtubules et des filaments d'actine, acteurs primordiaux des changements de formes (Basu and Chang, 2007; Gibson and Perrimon,

2005; Tang et al., 2016; Widmann and Dahmann, 2009a). Cependant, la réorganisation du cytosquelette ne dépend pas uniquement de modifications chimiques de l'environnement : les contraintes mécaniques ont aussi un impact majeur sur ce processus. En effet, le cytosquelette des cellules est directement lié aux MB via les récepteurs intégrines et dystroglycans (LaFlamme et al., 2018; Yurchenco, 2015). Bien que les MBs participent activement au processus de morphogénèse, leur rôle dans la morphologie des épithelia reste à décrire.

En utilisant le disque imaginal d'aile de *D.melanogaster*, nous avons exploré les conséquences de l'absence de Pcan dans la biogénèse de la MB *in vivo* et la morphogénèse épithéliale. Nous avons démontré que le Pcan était nécessaire à la bonne formation de la MB bordant l'épithélium squameux du disque d'aile. Il permet une incorporation homogène du réseau de Col IV et du Nid. Sans Pcan, la tension de la membrane péripodiale est accrue, le réseau de microtubules est réorganisé et les cellules deviennent cuboïdales. La forme squameuse des cellules de la membrane péripodiale peut être restaurée en diminuant la quantité de Col IV. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois que le Pcan participait à la formation de la MB et qu'au sein de cette dernière, en interaction avec le Col IV, il permettait aux cellules d'acquérir leur caractère squameux.

N.B: La version du premier article que vous allez lire n'est pas la version définitive. Cette dernière inclura notamment les résultats concernant le rôle de l'intestin en tant que source non-autonome pour le Pcan déposé dans la MB du disque imaginal d'aile. En outre, la discussion des résultats de cet article a été écrite en vue d'une lecture par un jury de thèse, d'où son format plus long.

**Role of *Drosophila* Perlecan in basement membrane assembly and mechanical properties
in a model of epithelial morphogenesis**

Raphaël Bonche^{1*}, Aline Chessel^{1*}, Séverine Boisivon¹, Aaron Voigt², Sébastien Schaub¹,
Pascal Thérond¹ and Sandrine Pizette^{1,3}

¹Institute of Biology Valrose - iBV, CNRS UMR7277, Inserm U1091, Université Nice Côte d'Azur,
Centre de Biochimie, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

² Department of Neurology, University Medical Center, RWTH Aachen University,
Aachen, 52074, Germany

³Corresponding author (email: pizette@unice.fr)

*These authors contributed equally to this work

Running title: Pcan controls squamous cell morphogenesis

Key words: basement membrane, Perlecan, epithelial morphogenesis, cell shape, squamous
epithelium, tissue mechanics, *Drosophila*

RESULTS

1) *Drosophila* Perlecan is fully conserved

trol was identified as the gene encoding *Drosophila pcan* in 2002 (Voigt et al., 2002). At the time, the coding region associated to the characterized transcription unit showed a signal sequence and correspondences to domains II to V of vertebrate Pcan but a domain I was missing. We analyzed the latest FlyBase release of the *Drosophila* genome for the annotation of the *pcan* locus (<http://flybase.org/>). We discovered that a transcription initiation site upstream of the former one was predicted to drive the expression of nine additional exons, the first two being non-coding (Fig 1A). *In silico* translation of exons 3 to 9 (numbering according to FlyBase) yielded a peptide comprising a signal sequence and an SEA module followed by two LDLR-like motifs that belong to domain II. Furthermore, our analysis highlighted three consensus sequences for glycosaminoglycan attachment sites (Fig 1B). Those and the SEA module being the hallmark of vertebrate Pcan domain I, we conclude that *Drosophila pcan* possesses sequences consistent with a *bona fide* domain I.

We next sought to verify that sequences coherent with the two putative alternative transcription initiation sites were expressed *in vivo*. There are three reported ESTs at FlyBase that offer poor coverage of these regions and two of them (AY070857 and LM611479) contain either annotated intronic sequences or a mix of intronic and exonic. The last one (DQ327745.1) only straddles the junction between exon 3 and 4. We thus extracted RNA from wild-type late third instar larvae and performed RT-PCR with primers specific for each predicted mRNA sequence (Fig 1C). We found that both mRNAs are synthesized and, upon sequencing of the PCR products, that their sequence perfectly matched the sequence of the predicted transcripts (data not shown). In addition, amplification products corresponding to the junction of exon 9 to 13 as predicted in the isoform with a domain I were obtained whereas no amplification between exon 9 and exon 10 or 11 could be detected (data not shown). Our results demonstrate that *pcan* is fully conserved in *Drosophila* and that the choice between alternative transcription initiation sites controls the production of an mRNA isoform that encodes a domain I.

2) The expression pattern of *pcan* RNA and protein in the wing imaginal disc differ

Other studies in *Drosophila* have often relied on GFP protein trap lines to investigate Pcan expression pattern. Yet, two of these lines (Morin et al., 2001) have the *GFP* exon inserted upstream of the second predicted promoter (our unpublished observation), and hence do not allow visualization of an isoform without a domain I. Among the two other available lines (Besse et al., 2007), one is lethal in homozygosis indicating that the introduction of the GFP disrupts Pcan's function. The second one, *pcan-GFP*^{64.07}, is homozygous viable suggesting that this fusion protein behaves like the wild-type one. However, the *GFP* exon is inserted in a region predicted to undergo a lot of splicing out (between exons

18 and 19, our unpublished observation) and is therefore highly unlikely to be present in all isoforms. In addition, we found in the course of our experiments that the presence of this GFP-tagged Pcan enhances *pcan* loss-of-function phenotypes. This means that this protein is somehow abnormal and should not be trusted to faithfully recapitulate the distribution of the wild-type Pcan.

Recently, a YFP protein trap line was used to show that Pcan is not produced by the wing imaginal disc (Zang et al., 2015). Interestingly, this line is prone to the same caveats as the *pcan-GFP*^{64.07} line since the *YFP* exon is inserted in the same region as the *GFP* exon. This prompted us to re-evaluate Pcan synthesis by the wing imaginal disc and we started by performing RNA *in situ* hybridization. We first used NBT/BCIP substrate and an antisense probe against *pcan*'s exon 36 (Voigt et al., 2002) which encodes part of domain III and should be present in both transcriptional isoforms. *pcan* transcripts were not detected prior to the mid third instar larval stage, stage at which expression appeared at the level of the notum and the prospective wing costa (Fig 2A). By late third instar, these two sites of *pcan* mRNA production persisted and new ones became visible in four areas of the wing pouch that we will thereafter refer to as “quadrants” of *pcan* expression (Fig 2B, arrows). To address the cellular source of *pcan* transcripts at that stage, we switched to a fluorescent substrate (Fig 2C). No signal was observed in the squamous epithelium (SE) of the wing imaginal disc, and in the notum region, the mRNA was in fact present in adepithelial myoblasts (not shown). Nevertheless, *pcan* expression in the costa and the quadrants could clearly be assigned to cells from the columnar epithelium (CoE), establishing that Pcan is generated by the wing imaginal disc.

Pcan being a secreted protein, it might spread far away from its producing cells. As its distribution in the wing imaginal disc has been only partially documented (Herranz et al., 2014; Pastor-Pareja and Xu, 2011), we thoroughly examined its localization with an anti-Pcan antibody (Friedrich et al., 2000). Longitudinal xzy sections taken through the anterior and the posterior compartment and intersecting with the quadrants of *pcan* transcription (Fig 2D and not shown) showed that four zones on the basal side of the CoE were enriched in Pcan (arrows), which corresponded to the folds underneath the wing pouch. This was confirmed in xyz sections (Fig 2D') where faint intracellular Pcan staining was seen in the areas where its mRNA was synthesized (dashed circles), whereas it strongly accumulated in four quadrant-like regions on the basal side of the wing pouch CoE (arrows). This suggests that cells producing Pcan secrete it efficiently towards their basal side and that the bulk of Pcan remains in their close vicinity. More surprisingly, however, both longitudinal xzy and xyz sections revealed that a uniform layer of Pcan staining was covering the entire outer surface of the wing imaginal disc (Fig 2D,D'). This indicates that Pcan is also present in the BM lining the SE and cuboidal epithelium (CuE). Because these epithelia do not express *pcan* RNA, the protein is consequently provided non-autonomously to these regions. One possibility is that Pcan produced by the pouch CoE and notum adepithelial cells diffuses from their basal side and travels on the outer surface of the disc to first reach the CuE and then the SE. Another possibility is that CoE cells secrete Pcan to the lumen, either through

direct primary apical secretion, or by basal to apical transcytosis as described for Collagen type IV (Col IV) in follicle cells (Medioni and Noselli, 2005). Subsequently, luminal Pcan would have to be internalized through the apical pole of CuE and SE cells to be re-secreted at their basal pole. As both mechanisms rely on the production of Pcan by the wing imaginal disc, we reasoned that if one of these accounts for Pcan incorporation in the CuE and SE BM, then Pcan should be completely absent from this tissue at a stage when its transcripts are not detected. We first analyzed Pcan distribution at the mid third instar larval stage (Fig 2E) when its RNA is only synthesized in the notum and costa areas, and found that it was readily observable surrounding the whole wing imaginal disc. More remarkably, at early third instar (Fig 2F), when we find no *pcan* expression in this tissue, the protein is already decorating the basal surface of the entire wing imaginal disc. These results demonstrate that the Pcan deposited in the wing imaginal disc BM partly originates from another tissue.

3) The Perlecan incorporated in the wing imaginal disc basement membrane has an autonomous and a non-autonomous origin

Interestingly, it has been shown that the Col IV incorporated in the wing imaginal disc and other larval organs BM solely derives from the fat body (an equivalent of the liver and the adipose tissue of vertebrates) (Pastor-Pareja and Xu, 2011). We hence examined Pcan expression in this tissue (Fig 2G,H). The fat body displayed Pcan protein in its BM (arrows) as well as in between cells, interstitially. In addition, *pcan* transcripts were present in this tissue, indicating that it is a source for the protein. To test whether the fat body provides some of the wing imaginal disc BM's Pcan, we independently abrogated *pcan* expression in the fat body or in the wing imaginal disc using *RNAi* and the *GALA/UAS* system for tissue-specific expression.

We started by downregulating *pcan* expression in the wing pouch and as a control, we stained fat body for Pcan protein. Confirming the tissue-specificity of the system, fat body from *RNAi*-expressing animals showed BM and interstitial Pcan, similar to controls (Fig 3A,A'). In the wing imaginal disc (Fig 3B,B' and data not shown), however, the four Pcan quadrants on the basal side of the pouch were no longer detected upon *RNAi* expression (arrows). Strikingly, the uniform layer of Pcan staining that surrounds the whole disc was not affected. Since the *RNAi* might not fully deplete *pcan* RNA in the pouch, we generated big clones of cells mutant for the *trol^{null}* allele (Voigt et al., 2002). In such a context (Fig S1), the quadrant Pcan could be lost without impinging upon overall Pcan distribution. Thus, these data demonstrate that there is a pool of Pcan that is produced cell-autonomously by the disc and that this pool can only have a minor contribution to the non-autonomous deposition of Pcan into the CuE and SE BM.

We then targeted *RNAi* expression to the fat body from the first instar larval stage using different *GALA* drivers. With two of these drivers (*LppGALA*, fat body-specific, and *CgGALA*, fat body- and

haemocyte-specific, haemocytes being the equivalent of blood cells) interstitial but not BM's Pcan was lost in the fat body (Fig S2A,A',C,C' and not shown) and Pcan distribution remained unchanged in the wing imaginal disc (Fig S2B,B',D,D'). In contrast, *PplGAL4* efficiently decreased overall fat body Pcan (Fig 3C,C', arrows). Under these conditions, abnormal Pcan staining was observed in the wing imaginal disc. The SE's BM was almost totally devoid of Pcan and the staining was patchy in the CuE's BM (Fig 3D,D', asterisks and data not shown), ascertaining a non-autonomous origin for the Pcan deposited in these regions. Intriguingly, the Pcan quadrants were diminished (Fig 3D,D', arrows). Because we have shown that this pool is produced by the disc and therefore should not be targeted with *PplGAL4*, we verified the site of expression of this driver with a GFP reporter. We found that *Ppl* is also expressed in scattered cells in the center of the wing pouch (data not shown) which clarifies this last result. Moreover, besides expression in the fat body, we found expression in the larval gut (data not shown) which could explain why *PplGal4* is the most effective of the three fat body drivers in downregulating the uniform layer of Pcan staining surrounding the wing disc. Hence, we conclude that the Pcan of the wing imaginal disc comes from the disc itself, as well as from the fat body and/or the gut, or a still unidentified tissue.

4) Identification of a new *pcan* allele

To address the role of Pcan in epithelial wing imaginal disc morphogenesis, we attempted to raise animals entirely mutant for the *trol^{mutl}* allele until the late third instar larval stage. These animals, however, died between the first and second instar. To bypass this lethality, we generated big clones of cells mutant for the *trol^{mutl}* allele in an otherwise heterozygous background. Even though we obtained wing imaginal discs where up to two out of the four quadrants of Pcan staining had disappeared, these discs and the resulting adult wings were morphologically wild-type (Fig S1 and data not shown). It is possible that this lack of a phenotype is due to a rescue by the non-autonomous source of Pcan. To avoid this issue, we turned back to the use of animals entirely mutant, but for a hypomorphic allele of *pcan*. Our attention was caught by a fly line (*trol^{IO271#49}*) that yielded adult escapers. A fraction of these exhibited misshapen wings and/or eversion defects (not shown), providing a link between Pcan and wing imaginal disc morphogenesis. This line was issued from the genetic screen that produced the *trol^{mutl}* allele, designed to obtain a genomic deletion following concomitant mobilization of two P-elements flanking the second predicted *pcan* transcription start site and the last *pcan* exon (Voigt et al., 2002). To molecularly characterize this *trol^{IO271#49}* mutant, we analyzed its *pcan* locus by PCR and found that the 3' located P-element had been cleanly excised while the 5' one (G0271) was improperly excised creating a deletion of approximately 5 kb (Fig 1A). The 5' part of the G0271 P-element was still present but its 3' end was missing, together with downstream sequences of the *pcan* locus that encompassed the end of intron 9, exon 10, intron 10, exon 11 and the beginning of intron 11.

In the predicted mRNA encoding an isoform with a domain I, exon 9 is joined to exon 13. In the predicted mRNA encoding an isoform without a domain I, the mRNA starts at the non-translated exon 10 followed by exon 11 and then exon 13. The *JO271#49* deletion should thus prevent the production of the mRNA isoform without domain I. Yet, this deletion or the presence of the 5' part of the P-element might also alter synthesis of the isoform with a domain I if this region contains elements necessary for activity of the first promoter. This was assessed by RT-PCR and we found that RNA sequences specific to the isoform without domain I could not be detected, but also that the level of RNA sequences corresponding to the isoform with a domain I was drastically reduced (Fig S3). These results were validated by RT-qPCR (Fig 4A) and imply that the *trol*^{*JO271#49*} is not an isoform-specific mutation.

To confirm that this mutation was generally downregulating transcription at the *pcan* locus, we carried out RNA *in situ* hybridization with the probe directed against the sequence encoding part of domain III. As expected, RNA levels in wing imaginal discs from late third instar *trol*^{*JO271#49*} animals were strongly diminished, with no signal detected in the wing pouch and faint signal observed in adepithelial cells that are the cells with the highest expression level in wild-type (Fig 4B). Similarly, a much weaker signal was seen in the fat body of mutant animals compared to wild-type (Fig 4C). To appreciate the impact of this decrease in RNA levels on Pcan protein synthesis, we stained *trol*^{*JO271#49*} animals with the anti Pcan antibody (Fig 4D). In agreement with the results of the RNA *in situ* hybridization, some Pcan was still noticeable in the BM of the fat body of mutant animals, albeit at a lower amount than in wild-type ones. In wing imaginal discs, Pcan staining was inconspicuous in the SE's BM and the four quadrant-like regions on the basal side of the wing pouch CoE. Nevertheless, in the dorsal half of the wing imaginal disc, some patchy staining remained in the CuE's BM with a gradient in intensity, being fainter in the lateral pleura region and increasing towards the wing pouch. Since this staining is associated to the region that is the closest to the adepithelial cells, and that these cells still produce some Pcan, it is possible that in this context, Pcan diffuses from the adepithelial cells to reach the adjacent CuE's BM.

Altogether, these data show that this new *pcan* mutant allele is suitable to the study of Pcan function in wing imaginal disc morphogenesis.

5) Perlecan is crucial for squamous epithelial basement membrane biogenesis

Since some studies report a role for Pcan in maintaining epithelial apico-basal polarity (Schneider et al., 2006; You et al., 2014), we first analyzed the distribution of polarity markers in wing imaginal discs from late third instar *trol*^{*JO271#49*} animals. The cells, however, retained normal apico-basal polarity (Fig S4) and not only did they not round-up, but on the contrary, they exhibited an elongated apico-basal axis in the wing pouch CoE (Fig 4E). This phenotype, as well as the overall compact shape of the wing disc along the anterior/posterior (Fig 4E,F) and the dorsal/ventral axes (Fig 5A-C) is consistent with earlier

results achieved with ubiquitous overexpression of an *RNAi* directed against exon 36 of *pcan* or genetic mutants (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Interestingly, we found defects in the *trol*^{J0271#49} mutant that were not previously described. Indeed, the CuE reproducibly displayed ectopic folding in the posterior-lateral pleura (Fig 4E, asterisks) and anomalous distribution or packing of the folds of the anterior-lateral and ventral pleura (Fig 4E and 5A-C, respectively). Moreover, the area spanned by the SE was drastically reduced (arrows in Fig 4E, and Fig 4F). The loss of Pcan therefore affects morphogenesis of the three different epithelia of the wing imaginal disc.

To address whether these changes could stem from a function of Pcan in BM biogenesis, we looked at the incorporation of the other main BM structural components, Laminin (Lam), Nidogen (Nid) and Col IV. Others have found that Pcan is not needed for Col IV deposition in the wing imaginal disc, yet their analysis was restricted to this component and to the CuE of the posterior ventral pleura (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Upon examination of the three BM components, we did not detect any modification in their expression pattern in the BM of the CoE or most of the CuE of the *trol*^{J0271#49} wing discs (Fig 5A-C and not shown). However, at the level of the SE' BM and the posterior portion of the lateral CuE closest to the SE, although incorporation of Lam remained similar to wild-type, both Nid and Col IV distribution were aberrant in the mutant. Col IV positive fiber-like structures were seen running parallel to the anterior/posterior axis whereas fiber-like structures, also running parallel to the anterior/posterior axis, appeared in negative in the Nid layer (Fig 5A'-C', arrows in B',C'). Furthermore, the positive and negative fiber-like structures co-localized (see Fig 12). It has been published that the absence of Nid in the wing imaginal disc BM does not alter the incorporation of the other BM components (Dai et al., 2018). It thus appears that Pcan is required for proper assembly and/or maintenance of the Col IV network which in turn is necessary for proper incorporation and/or maintenance of Nid. These results show for the first time that Pcan holds a role in epithelial BM biogenesis but that this role is mainly confined to the SE' BM of the wing imaginal disc.

We then evaluated the consequences of the *pcan* mutation on the morphology of the BM by performing TEM. We started by characterizing The BM of the wild-type wing imaginal as it has not been described in great detail (Sedlak et al., 1984). At the level of the SE, the BM was thin and homogenous except for its outer surface that was darker and composed of dots giving it a hairy appearance (Fig S5 picture 1). The BM subjacent to the CuE, whether in anterior or posterior regions, was similar to the SE's BM though thicker (Fig S5 picture 2). At the anterior and posterior edges of the CoE, however, the BM, while progressively thickening toward the pouch, began to present a different organization. Indeed, closely apposed layers appeared which gradually became separated by electron-lucent material, eventually forming a lamellated mesh with punctate structures in between the layers (Fig S5 pictures 3-5). In the wing pouch region, the BM morphology remained the same, but its thickness kept increasing, reaching its maximal value underneath the folds, with an intermediate value underneath the center (Fig S5 pictures 6-7). The structure and thickness of the CoE's BM was symmetrical along

the anterior/posterior axis apart from the anterior costa region where the BM showed a thickness similar to that of underneath the folds (not shown). We acknowledge that what we designate as the CoE's BM may not be a very thick BM, but rather a regular size BM separated from the basal side of the CoE' cells by thick ECM. Nonetheless, owing to the striking ultrastructural resemblance between the outer-most layer and the internal layers, and the fact that Col IV and Lam have been shown to localize to the internal layers by IEM (Abbott and Natzle, 1992), we will tentatively keep referring to it as a BM. In conclusion, these data reveal the existence in the wing imaginal disc of not one, but three BMs, with unique features and specific to the epithelial type they are associated to.

We next analyzed the BMs of *trol*^{J0271#49} wing imaginal discs. The SE's BM was evidently abnormal: its thickness was reduced by half (Fig 6, brackets in A, quantified in B) and there was a number of regions where it was reduced to a thread (the "hairy" outer layer) no longer attached to the cell surface (Fig 6A, arrow). The situation was more complex for the BM subjacent to the CuE. On the posterior side, and in accordance with Pastor-Pareja and colleagues (2011) who limited their study to this region, the CuE's BM was thinner than that of the control, though we additionally noticed regions consisting of the hairy outer layer only. On the anterior side however, some portions of the BM were indistinguishable from the control and other regions displayed either split, lamellated or thicker BM (not shown). At the level of the CoE, the BM, as in wild-type, consisted of a lamellated mesh. It still differed from the control in that the regions where it was the thickest did not correspond to the pouch folds but seemed to be randomly distributed underneath the wing pouch (data not shown). Despite the strength and variety of defects observed, it should be mentioned that the BM, whichever the epithelial type it was associated to, was never absent nor ruptured. These results thus indicate that, at least in this hypomorphic background, Pcan is not required for BM integrity, and nevertheless confirm its involvement in biogenesis of the SE's BM. Whether Pcan is also needed for the biogenesis of the Cue and CoE BMs yet remains unclear, as the diversity and lack of penetrant phenotypes as seen by TEM in these regions suggest that they could arise in an indirect manner.

6) Perlecan controls epithelial tissue architecture via control of squamous epithelial morphogenesis

Because the effect of Pcan's loss on the incorporation and/or maintenance of Col IV and Nid is mostly restricted to the SE's BM, we reasoned that the anomalous architecture of the three epithelia observed in the *trol*^{J0271#49} wing imaginal discs might be the sole consequence of the defective SE morphogenesis. To test this hypothesis, we aimed at recapitulating the overall *trol*^{J0271#49} wing disc phenotype by specifically removing Pcan from the SE's BM. This seemed doable as the Pcan deposited in this BM does not originate from the wing imaginal disc (Fig 3). We thus targeted the non-autonomous Pcan source with RNAi and examined the discs morphology. As a control, we also separately targeted the

autonomous Pcan source. Upon *pcan* downregulation in the wing imaginal disc, all three epithelia appeared normally organized (Fig 7B,B' and data not shown), suggesting that when the non-autonomous source is still present, the Pcan produced by the disc is not crucial for overall tissue architecture. Surprisingly, the downregulation of the non-autonomous *pcan* source did not elicit obvious changes in the CoE or the CuE either (Fig 7C and not shown). Interestingly nonetheless, it led to a reduction of the area spanned by the SE, although not as severe as in the *trol*^{J0271#49} background (Fig 7C', compare to Fig 4F). This raises the possibility that the RNAi may not be efficient enough. Alternatively, the loss of the non-autonomous Pcan source might be somewhat compensated for by the autonomous one. To investigate the latter, we simultaneously depleted both sources. We found that Pcan staining was now inconspicuous in the wing disc, implying that the remnants of expression seen after eliminating the non-autonomous source come from the autonomous one (Fig S6). More importantly, the SE was strongly impacted and morphogenesis of both the CoE and the CuE was affected in a way similar to that of the *trol*^{J0271#49} mutant (Fig 7D,D' and data not shown). This data therefore uncover a partial redundancy between the two Pcan sources which unfortunately precludes us from concluding on whether the SE phenotype is causal to the overall disc phenotype in this experiment.

To circumvent this problem, we opted for the opposite approach, which was to attempt to specifically rescue the SE's phenotype of the *trol*^{J0271#49} mutant discs and assess the outcome on the rest of the tissue. It has been proposed that the thinner BM observed following *pcan* depletion reflects a Col IV-dependent increase in its tension (Pastor-Pareja and Xu, 2011). We hence decided to try to alleviate the SE's BM tension by directing the expression of the Col IV-cleaving matrix metalloprotease MMP2 to this epithelium using the *GAL4/UAS* system. A few *GAL4* lines have been reported to allow expression in the SE but not in the CuE or the CoE of the wing disc (Baena-López et al., 2003; Pallavi and Shashidhara, 2003). In our hands, however, the lines we tested always drove expression outside of the SE (Fig S7). Nevertheless, one of these (*CoroG4*) yielded a low expression level in the CoE when compared to the SE, and no expression at all in the CuE. Moreover, since the positive cells within the CoE were evenly scattered, this expression pattern seemed less likely to cause a phenotype. To confirm this, *trol*^{J0271#49} wing imaginal discs with or without expression of MMP2 driven with *CoroG4* were stained for Nid. As expected, the SE's BM was digested by MMP2 but the CuE and CoE BMs were left intact (Fig 8, compare C to B and C' to B', respectively). In this condition, the area covered by the SE was greatly expanded and similar to wild-type (Fig 8, A-C and arrows in A''-C''). Remarkably, the wing disc was no longer compacted along the dorsal/ventral axis (Fig 8, A'-C' and A''-C'') and the folds of the different regions of the CuE, even if not fully restored to their normal distribution, were more relaxed (Fig 8, A''-C'' and A'''-C'''). On the other hand, the confined expression of MMP2 to the CoE/et CuE did not save the *trol*^{J0271#49} phenotype and gave rise to grossly de-structured wing imaginal discs (not shown). These results thus show that the Pcan-dependent morphogenesis of the SE dictates wing disc architecture.

7) Perlecan regulates the spreading of squamous epithelial cells

We then sought to identify the mechanism by which Pcan controls SE morphogenesis. Since the loss of Pcan can generate cell death (Sher et al., 2006) or a decrease in cell proliferation (see for instance (Datta, 1995; You et al., 2014)), the reduction in the area spanned by the SE in the *pcan* mutant wing discs could be due to alterations in these processes. First, we evaluated the occurrence of apoptosis in this tissue with an antibody recognizing the activated form of Caspase 3, but apoptotic cells were detected neither in the SE of the wild-type late third instar discs (in agreement with (Milan et al., 1997)) nor in that of the *trol*^{J0271#49} (data not shown). Because cell death could still have taken place at an earlier time point, we expressed the caspase inhibitor P35 in the SE of the mutant discs from the first instar stage with *AGiRG4* (for expression pattern, see Fig S7). This did not rescue the defect of the SE, ascertaining that cell death does not trigger it (data not shown). Second, we addressed whether a lower mitotic rate could underlie this phenotype by performing a staining with an antibody targeting the phosphorylated form of histone H3. At the late third instar stage, cells were labelled in the CuE and CoE of both control and mutant conditions. However, SE cells were unlabeled in either of those (data not shown), a result that is in line with the literature describing a very slow division rate for the SE cells (McClure and Schubiger, 2005)). Again, as we did not conduct a time course, we could have overlooked an earlier change in cell division rate in the SE of *trol*^{J0271#49} wing discs. To bypass this issue, we attempted to overexpress as above the cyclin-D-Cdk4 in this tissue to stimulate its proliferation and see if a normal sized SE could be recovered. Unfortunately, this led to larval lethality, even when the overexpression was achieved at the mid third instar larval stage with the *tub-GAL80^{ts}* system. Last, and even though the lack of Pcan does not impinge on cell growth in the CoE of the wing imaginal disc (Ma et al., 2017), we wished to examine whether this process was impaired in the mutant SE. To this end, we tried to overexpress the Insulin Receptor in this tissue, but akin to the experiment concerning proliferation, early lethality ensued.

As we could not determine through genetics if Pcan plays a role in growth or proliferation of the SE, we analyzed in wild-type and *trol*^{J0271#49} wing discs the total volume of this tissue as well as the number and the surface area of its cells. Strikingly, we found that the cell density was higher in the mutant SE (quantified in Fig 9C). This was a consequence of the smaller volume occupied by the tissue while its cell number was not modified (Fig 9A-B', quantifications in C). Significantly, these results rule out that the rate of cell division is decreased in the absence of Pcan. Conversely, they strongly suggest that cell growth is impeded, which was verified by measuring cell size. There was indeed a drop in the surface area of the cells of the *trol*^{J0271#49} SE (Fig S8), but intriguingly, this drop was more drastic than that of the volume of the tissue (5.3 fold versus 2.4 fold, respectively). This could mean that the diminution of the surface area of the cells is partially compensated by an elongation along their apico-basal axis. This hypothesis was supported by the fact that we noticed that the cells of the *trol*^{J0271#49} SE

had a tendency to be less squamous and more cuboidal (not shown). We thought that such a transition in cell shape would be more readily observable in a stronger loss-of-function condition for *pcan*, and we therefore turned to the ubiquitous overexpression of *pcan RNAi*. As in the *trol^{J0271#49}* background, the distribution of Nid and Col IV was abnormal in the SE and the thickness of the BM of this epithelium was also reduced, but the wing imaginal disc was even more compact along the dorsal/ventral and anterior/posterior axes (Fig 9D',E' and data not shown). Furthermore, the SE no longer exhibited its distinctive monolayer of flat nuclei stretching orthogonally to its apico-basal axis, and instead, was replaced by what could be a multi-layered epithelium containing rounded nuclei (Fig 9D-E'). To gain more insight into the morphology of the cells, TEM was carried out. This revealed that the SE was folded back on itself and that it protruded toward the lumen, forming in some regions a bi-layered epithelium whose cells were clearly cuboidal (Fig 9F, cells from either side of the red dotted lines). This last set of data hence demonstrates that Pcan is mandatory for the SE' cells to fully spread onto their BM.

8) Perlecan controls the mechanical properties of the squamous epithelium

The absence of Col IV in the wing imaginal disc provoking its flattening, it has been inferred that Col IV normally acts to constrict this tissue (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Because *trol^{J0271#49}* discs are compacted and Col IV concentrates in parallel fiber-like structures in the SE's mutant BM, it is conceivable that these fibers induce a rise in the BM's tension responsible for the aberrant SE morphogenesis and the global wing imaginal disc phenotype. To tackle this possibility, we decreased the amount of Col IV by introducing in the *trol^{J0271#49}* context one copy of a hypomorphic allele of *Viking* which encodes one of the two alpha chains of Col IV (Wang et al., 2008). This did elicit changes in the morphogenesis of the three epithelia of the wing disc when compared to the mutant alone (Fig 10). The surface area of the SE was evidently widened (Fig 10A,B), as was the basal surface of the CoE (Fig 10 A',B'). In addition, the folding of all parts of the CuE was more similar to wild-type, yielding on the whole, discs that were much more relaxed (Fig 10A''-B'''). These results thus indicate that Pcan function is SE and wing imaginal disc morphogenesis is Col IV-dependent.

To appraise more directly the role of Pcan in the mechanical features of the SE, we started by studying the orientation of the cells in this epithelium (Fig 11A) In wild-type samples, the orientation of the major elongation axis of the cells was anisotropic in the center of the tissue, with a tendency to become tangentially oriented toward the periphery, such that posterior-most cells were aligned parallel to the dorsal/ventral axis and ventral-most cells were aligned parallel to the anterior/posterior the axis. In contrast, in the *trol^{J0271#49}* SE, with the exception of ventral-most cells, the direction of the major elongation axis of the cells was isotropic and parallel to the dorsal/ventral axis. This points to an increase in the compression of the tissue parallel to the anterior/posterior axis in the absence of Pcan. We then

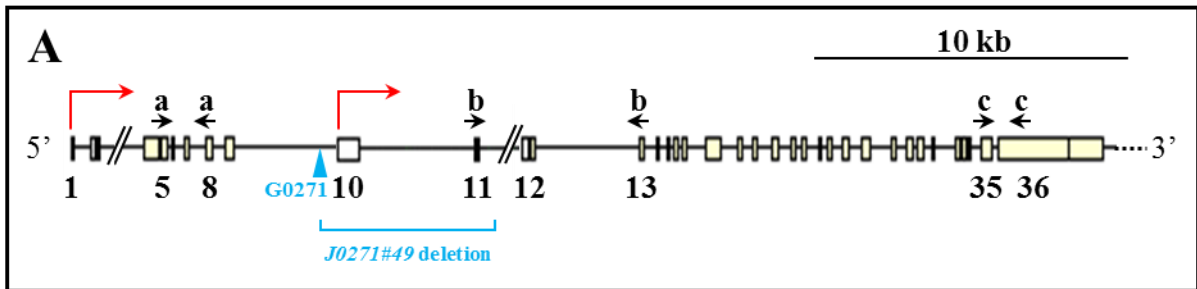
investigated the pattern of mechanical stress of the SE by following the tissue deformation consecutive to an *ex vivo* laser-slit (Fig 11B). The SE was identified by the spacing of its nuclei (marked with His2AV-GFP) and slits were made in its center either parallel to the dorsal/ventral axis or to the anterior/posterior axis (“D/V slit” and “A/P” slit, respectively). Note that because SE’s nuclei are set far apart at least in the wild-type, there were not enough of them in the vicinity of the slit to accurately quantify their displacement. As a substitute, we tracked more abundant intracellular vesicles seen by transmitted light. We found in the control condition that the A/P slit but not the D/V slit produced a stretch of the tissue, implying that the SE is naturally under tension along the dorsal/ventral axis (Fig 11C,D, quantified in E). This tension was also present in the *trol*^{J0271#49} SE, albeit amplified, and interestingly, a stretch after the D/V slit was now obtained (Fig 11C’,D’,E). We deduce from this last result that an abnormal tension is exerted in the mutant tissue along the anterior/posterior axis, in accordance with the increased compression witnessed along the same direction (Fig 11A). Taken together, our data strongly argue in favor of a direct mechanical function for Pcan, which is to provide tissue elasticity to the SE.

9) Perlecan affects the Tubulin-based cytoskeleton of the squamous epithelial cells

Finally, we set to explore how the mechanical input of Pcan was transduced to the SE’s cells. The cell surface Integrin receptors have well established roles in mediating cell-BM attachment and mechano-transduction (Kechagia et al., 2019), and they act to maintain the CoE’s cell shape in the wing imaginal disc (Domínguez-Giménez et al., 2007). We therefore assessed their distribution in the SE’s cells but found no differences between the control and the *trol*^{J0271#49} mutant background (data not shown). This is in agreement with the lack of effect of *Drosophila* Pcan on Integrin localization in the ovarian epithelium (Schneider et al., 2006). Nonetheless, Integrin signaling, which activates FAK, could still be affected and it has been shown that Pcan can, depending on the context, modulate in opposite ways FAK activation in *Drosophila* (Cho et al., 2012; You et al., 2014). However, a modification in the expression pattern of the phosphorylated form of FAK was not detected in the mutant SE (data not shown), which excludes a major contribution of Integrin to this process. Next, since the acto-myosin cytoskeleton is a target of mechanical regulation (Pandya et al., 2017), and Myosin II is needed for the expansion of central cells of the wing imaginal disc SE (Aldaz et al., 2013), we addressed its involvement in the transduction of Pcan mechanical function. As for the Integrin pathway, stainings for F-actin and the regulatory light chain of Myosin II with an antibody remained unchanged in the *trol*^{J0271#49} SE when compared to wild-type tissue (data not shown). It hence appears that this type of cytoskeleton is not implicated either. Last, we turned our attention to the microtubule cytoskeleton which is rearranged during cell shape changes (Dogterom and Koenderink, 2019), including upon transition of SE’s cells to CuE’s cells in the wing imaginal disc (Tang et al., 2016). In the control SE, the microtubule network was orthogonal to the apico-basal axis of the cells but otherwise anisotropic, and this distribution was

preserved in the central portion of the mutant SE where the cells kept their squamous morphology (Fig 12A,B, and data not shown). At the level of the tissue, however, parallel fiber-like structures that spanned the anterior/posterior axis were observed in negative, and strikingly, they co-localized with the Col IV-positive fibers and the Nid-negative ones (Fig 12B, arrows). We thus propose that the mechanical role of Pcan is relayed to the squamous cells through the microtubule cytoskeleton.

Figure 1



B

M	M	G	S	P	G	S	Q	A	S	A	I	A	T	S	V	G	I	R	S		
G	R	R	G	Q	A	G	G	S	L	L	L	R	L	L	A	V	T	F	V		
L	A	A	C	H	A	P	L	L	T	N	A	K	Q	I	S	N	L	G	D		
D	Q	D	F	M	L	A	D	D	E	S	L	Q	G	I	N	D	S	E	W		
Q	L	M	G	D	D	I	D	D	G	L	L	D	D	V	D	E	T	L	K		
P	M	E	T	K	S	E	E	E	D	L	P	T	G	N	W	F	S	Q	S		
V	H	R	V	R	R	S	I	N	R	L	F	G	S	D	D	N	Q	E	R		
G	R	R	Q	Q	R	E	R	S	Q	R	N	R	D	A	I	N	R	Q	K		
E	L	R	R	R	Q	K	E	D	H	N	R	W	K	Q	M	R	M	E	R		
Q	L	E	K	Q	R	L	V	K	R	T	N	H	V	V	F	N	R	A	T		
D	P	R	K	R	A	S	D	L	Y	D	E	N	E	A	S	G	Y	H	E		
E	D	T	T	L	Y	R	T	Y	F	V	V	N	E	P	Y	D	N	E	Y		
R	D	R	E	S	V	Q	F	Q	N	L	Q	K	L	L	D	D	D	L	R		
N	F	F	H	S	N	Y	E	G	N	D	D	E	E	Q	E	I	R	S	T		
L	E	R	V	E	P	T	N	D	N	F	K	I	R	V	Q	L	R	I	E		
L	P	T	S	V	N	D	F	G	S	K	L	Q	Q	Q	L	N	V	Y	N		
R	I	E	N	L	S	A	A	T	D	G	V	F	S	F	T	E	S	S	V		
T	E	E	S	V	R	H	L	D	V	G	F	V	E	P	H	I	T	L	F		
H	E	Q	N	T	G	Y	D	D	F	D	R	K	P	T	T	E	T	Q	D		
I	E	E	E	A	I	D	V	T	L	P	Q	E	E	V	E	G	S	G	S		
D	D	S	S	C	R	G	D	A	T	F	T	C	F	R	S	G	K	T	I		
C	D	E	M	R	C	D	R	E	I	Q	C	P	D	G	E	D	E	E	Y		
C	N	Y	P	N	V	C	T	E	D	Q	F	K	C	D	D	K	C	L	E		
L	K	K	R	C	D	G	S	I	D	C	L	D	Q	T	D	E	A	G	C		
I	N	A	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	S		
E	P	E	A	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	S	E	P	E	Q
E	P	E	P	Q	V	P	E	A	N												

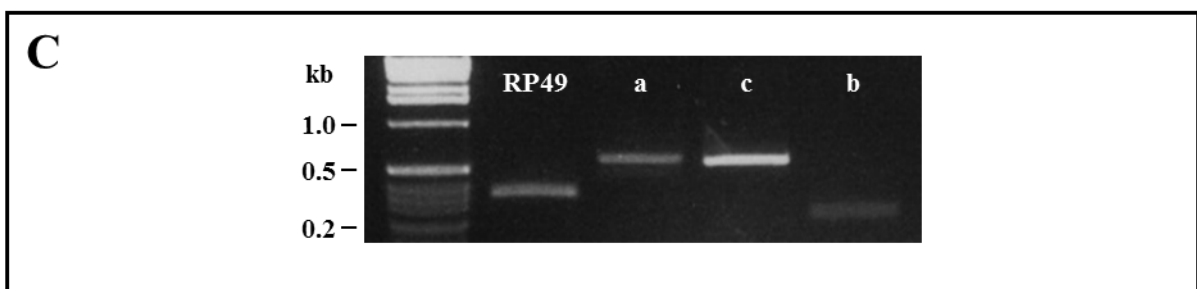


Figure 1: Two alternative transcription start sites drive the expression of *perlecan* isoforms with or without a Domain I

(A) Genomic representation of the *pcan* locus with the exons relevant to this study (numbering according to flybase). For simplicity, long introns are not shown to scale (non-represented intervening sequences are indicated by slashes). White rectangles correspond to non-coding exons (1, 2 and 10), and yellow rectangles correspond to coding exons. Red arrows show the position of the two predicted transcription start sites. The blue arrowhead indicates the location of the P-element (G0271) that was jumped out, generating the deletion found in the *pcan* mutant allele *trol*^{G0271#49} (blue bracket). Lettered arrows (a,b,c) show the position of pairs of primers used in (C).

(B) *In silico* translation of exons 3 to 9. Three sites for glycosaminoglycan (GAG) attachment (underlined amino acids) are identified by the presence of the Ser-Gly dipeptide (red) together with acidic amino acids (light orange) and hydrophobic amino acids (blue) in the vicinity. An SEA module is also present (highlighted in light grey) as well as two LDLR motifs (highlighted in dark grey). The GAG sites and the SEA are the characteristics of the Domain I of vertebrate Pcan.

(C) RT-PCR on RNA extracted from wild-type late third instar larvae. RP49: loading control. a,b,c: amplification product of a region, respectively, specific to predicted RNA isoforms with a *Domain I*, specific to predicted RNA isoforms without a *Domain I*, common to all predicted *pcan* RNA isoforms. The location of the pairs of primers used to obtain the amplification products a, b and c, is indicated in (A).

Figure 2

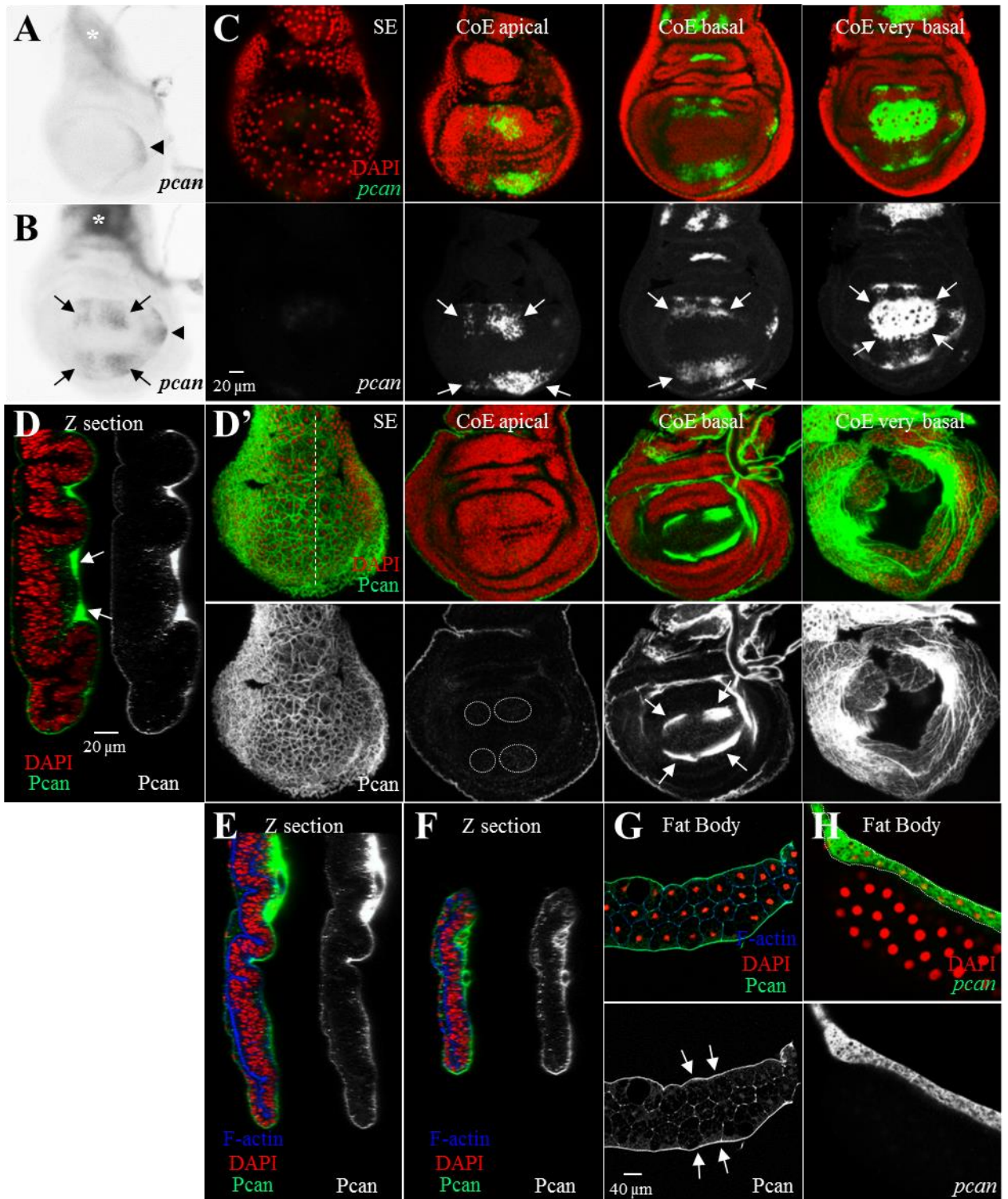


Figure 2: Temporal and spatial differences between the expression pattern of *perlecan* RNA and protein in the wing imaginal disc

(A-C) Bright-field (A,B) or confocal (C) images of mid (A) or late (B,C) third instar wing imaginal discs processed for RNA *in situ* hybridization with a *pcan* probe against exon 36 and the NBT/BCIP substrate (A,B) or the fluorescent Fast Red substrate (C). At the mid third instar larval stage (A), *pcan* transcripts (black signal) are detected in the prospective notum (asterisk) and costa (arrowhead). At the late third instar larval stage, *pcan* RNA is still produced at these two sites, but new expression appears in four quadrant-like regions (arrows in B). Fluorescent RNA *in situ* hybridization (C) reveals that these *pcan* quadrants of expression (green) correspond to RNA synthesized by the columnar epithelium (CoE) but not by the squamous epithelium (SE) of the wing imaginal disc (arrows).

(D-F) Confocal images of longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis (D,E,F, Z section, plane of section shown by the white dashed line in D') and confocal images of xyz sections (D'), of wild-type late (D,D'), mid (E) or early (F) third instar wing imaginal discs, labeled by immunofluorescence for Pcan (green). (D,D') At the late third instar stage, Pcan is present at the level of the BM of all three epithelia of the wing imaginal disc, and strongly accumulates in four quadrant-like regions on the basal side of the CoE (arrows). Faint intracellular staining can be seen in the regions where its mRNA is expressed (dashed circles). (E) At the mid third instar stage, while *pcan* transcripts are barely detected in the wing imaginal disc (A), Pcan protein surrounds the whole surface of the tissue. (F) Pcan protein is already present in the BM of the wing imaginal disc at the early third instar stage.

(A-C,D') Anterior is to the right and dorsal is up, scale bar (20 μ m) is indicated in (C) on the separate channel for *pcan*. (D,E,F) The SE is to the left and dorsal is up, scale bar (20 μ m) is indicated in (D).

(G,H) Confocal images of wild-type late third instar fat bodies, labeled by immunofluorescence for Pcan (G, green) or processed for RNA *in situ* hybridization with a *pcan* probe and the fluorescent Fast Red substrate (H, green). Pcan protein is seen between fat body cells and is enriched in the BM of this tissue (G, arrows). *pcan* transcripts are also present in the fat body (H, fat body outlined by the white dotted line, the rest of the tissue belonging to a salivary gland). Scale bar (40 μ m) is indicated in (G) on the separate channel for Pcan.

Figure 3

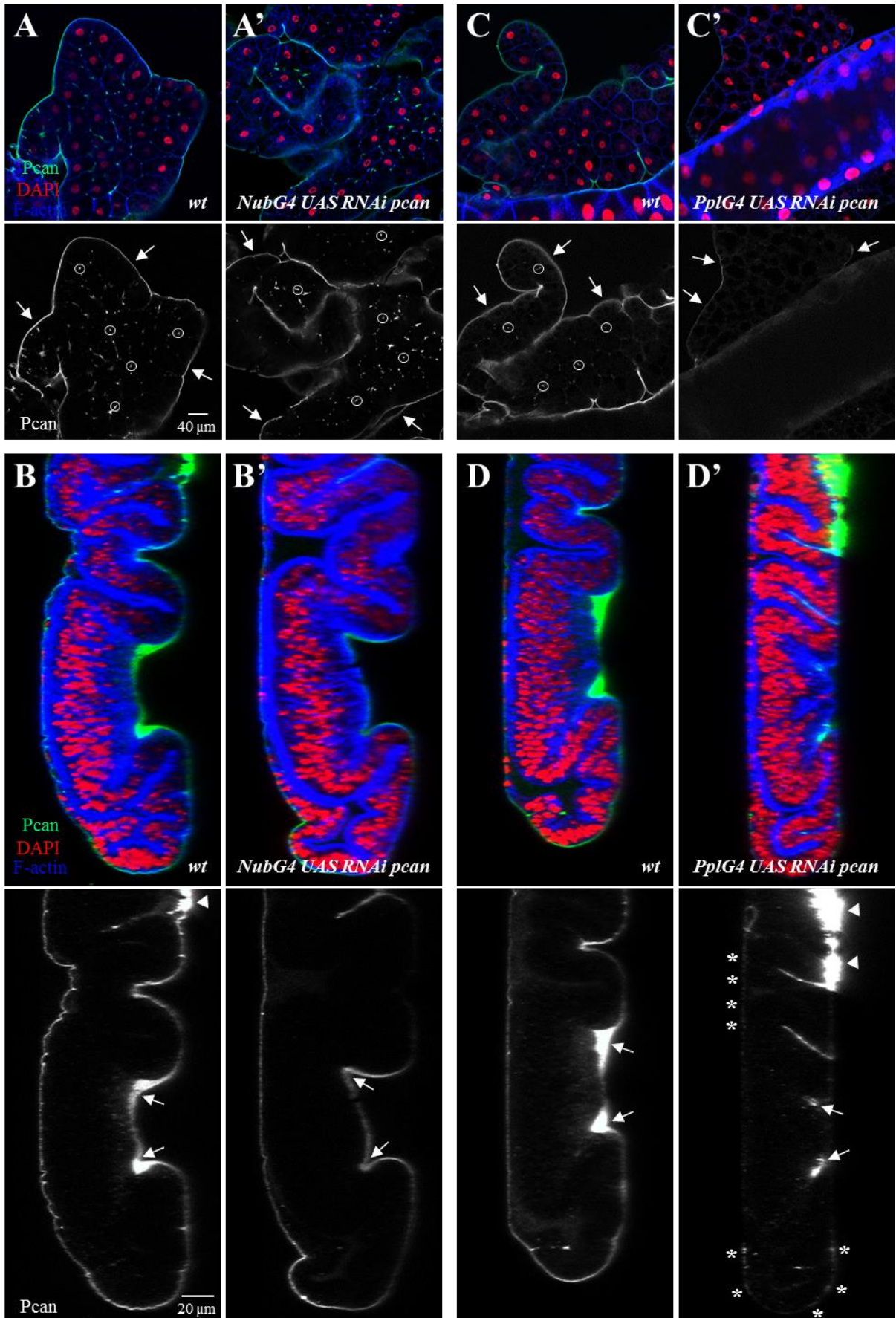


Figure 3: An autonomous and non-autonomous source for the Perlecan of the wing imaginal disc BM

(**A,A',C,C'**) Confocal images of late third instar fat bodies of the indicated genotypes, labeled by immunofluorescence for Pcan (green, or white when shown alone). Scale bar (40 μm) is indicated in (**A**) on the separate channel for Pcan.

(**B,B',D,D'**) Confocal images of longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Pcan (green, or white when shown alone). The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. Scale bar (20 μm) is indicated in (**B**) on the separate channel for Pcan.

pcan depletion with the *UAS-trol.RNAi^{HMS01759}* in the wing pouch with *Nub-GAL4 (NubG4, A-B')* has no effect on the distribution of fat body interstitial or BM Pcan (circles and arrows, respectively, in **A,A'**) but extinguishes the “quadrant” Pcan in the wing imaginal disc (arrows in **B,B'** point to where the quadrants should be). With the same *RNAi*, *pcan* depletion in the fat body with *PplGAL4 (PplG4)* abolishes fat body interstitial Pcan (circles in **C**) and diminishes fat body BM Pcan (arrows in **C,C'**). In addition, in the wing imaginal disc, the “quadrant” Pcan (arrows in **D,D'**) as well as the thin layer of Pcan surrounding the tissue (asterisks in **D'** point to remnants of Pcan staining) are reduced. Pcan staining in the notum region where *PplG4* is not expressed remains similar to the control (arrowheads in **B,D'**). Note that *PplG4* is also expressed in few cells of the pouch and in the gut (not shown).

Figure S1

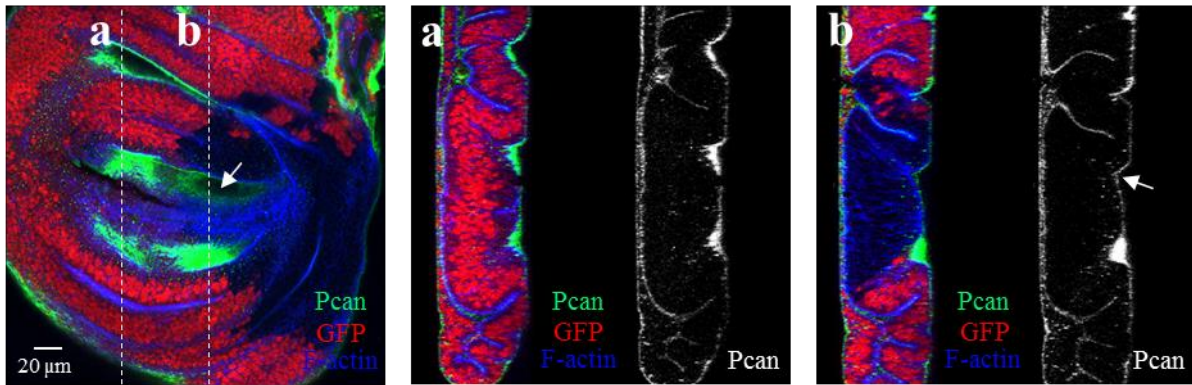


Figure S1: The depletion of the wing imaginal disc autonomous Perlecan does not affect the thin layer of Perlecan protein surrounding the tissue

Confocal images of an xyz section (left) or orthogonal views of a z-stack (a,b) of a late third instar wing imaginal disc, displaying a large clone of cells mutant for the *trol^{null}* allele, marked by the absence of nuclear GFP (red). The plane of section for (a,b) is indicated by a white dotted line on the left image. An immunofluorescent staining for Pcan (green, or white when shown alone) reveals that the “quadrant” Pcan (arrow on the left image and in b), but not the thin layer of Pcan, is lost in the clone (compare a and b). For the image on the left, anterior is to the right and dorsal is up. For the orthogonal views, the SE is to the left and dorsal is up. Scale bar for all images (20 μm) is indicated on the left image.

Note that on the left image, the section is taken at a very basal level of the wing imaginal disc columnar epithelium and that at this level, nuclei of the pouch region are naturally out of the plane of the section. Therefore, the extent of the clone is best seen on the orthogonal view in (b).

Figure S2

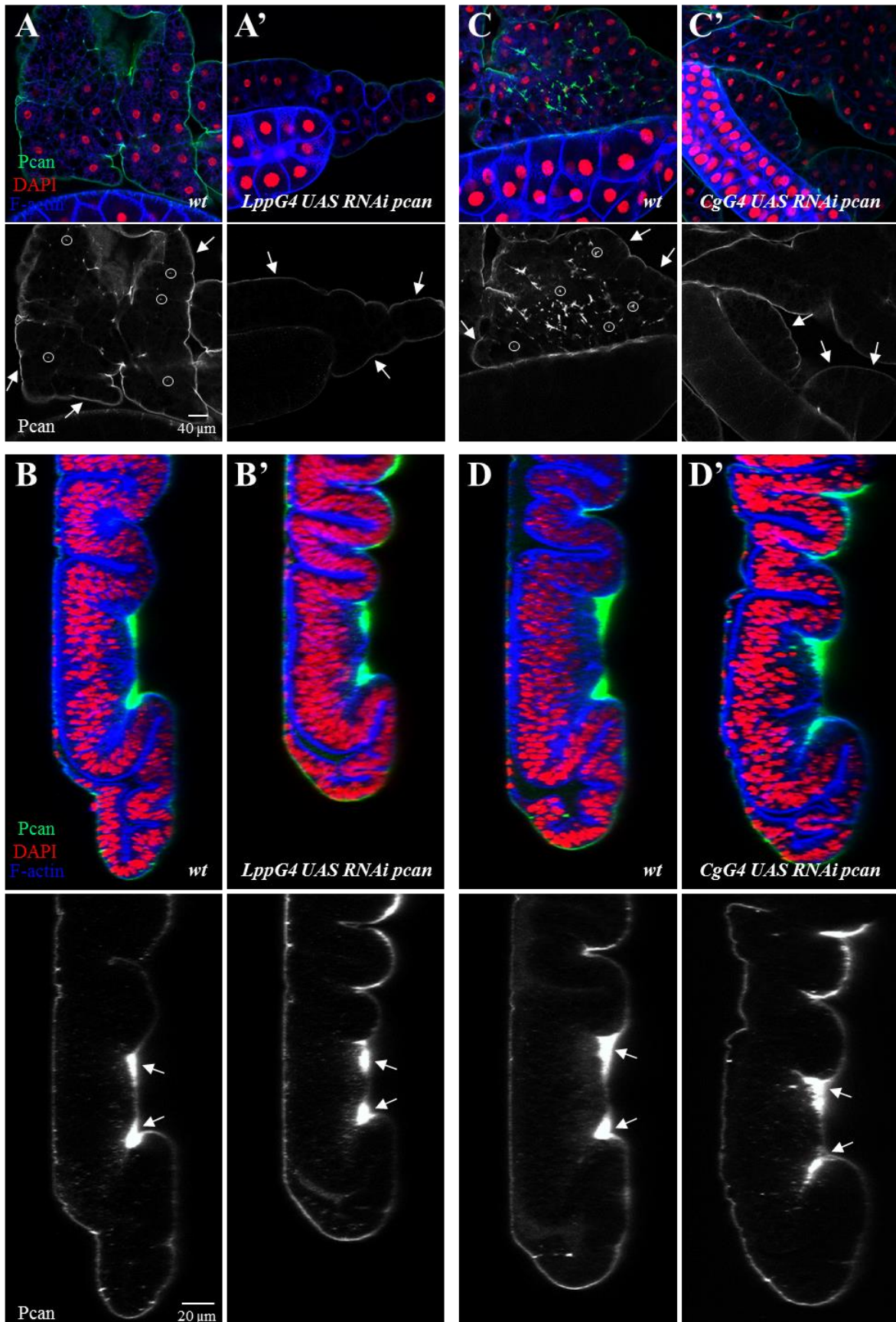


Figure S2: Perlecan depletion in the fat body and haemocytes partially reduces the amount of Perlecan in the fat body but does not alter its distribution in the wing imaginal disc

(**A,A',C,C'**) Confocal images of late third instar fat bodies of the indicated genotypes, labeled by immunofluorescence for Pcan (green, or white when shown alone). Scale bar (40 μ m) is indicated in **A** on the separate channel for Pcan.

(**B,B',D,D'**) Confocal images of longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Pcan (green, or white when shown alone). The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. Scale bar (20 μ m) is indicated in (**B**) on the separate channel for Pcan.

pcan depletion with the *UAS-trol.RNAi^{HMS01759}* in the fat body with *Lpp-GAL4* (*LppG4*, **A-B'**) or in the fat body and haemocytes with *Cg-GAL4* (*CgG4*, **C-D'**) strongly decreases fat body interstitial Pcan (circles in **A,C**) but not fat body BM's Pcan (arrows in **A,A',C,C'**) and has no effect on Pcan distribution in the wing imaginal disc (**B,B',D,D'**, arrows point to the “quadrant” Pcan).

Figure S3

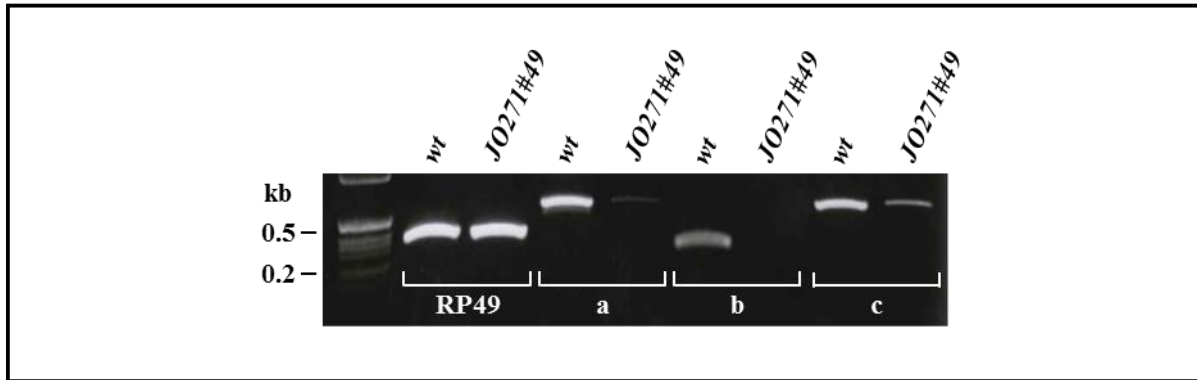


Figure S3: The *trol*^{JO271#49} mutation decreases the *perlecan* mRNA level of both isoforms with and without a Domain I

RT-PCR on RNA extracted from late third instar larvae of the indicated genotypes. RP49: loading control. a,b,c: amplification product of a region, respectively, specific to RNA isoforms with a *Domain I*, specific to RNA isoforms without a *Domain I*, common to all *pcan* RNA isoforms. The *pcan* mutation leads to a downregulation of all RNA isoforms. The location of the pairs of primers used to obtain the amplification products a, b and c, is indicated in Fig 1A.

Figure 4

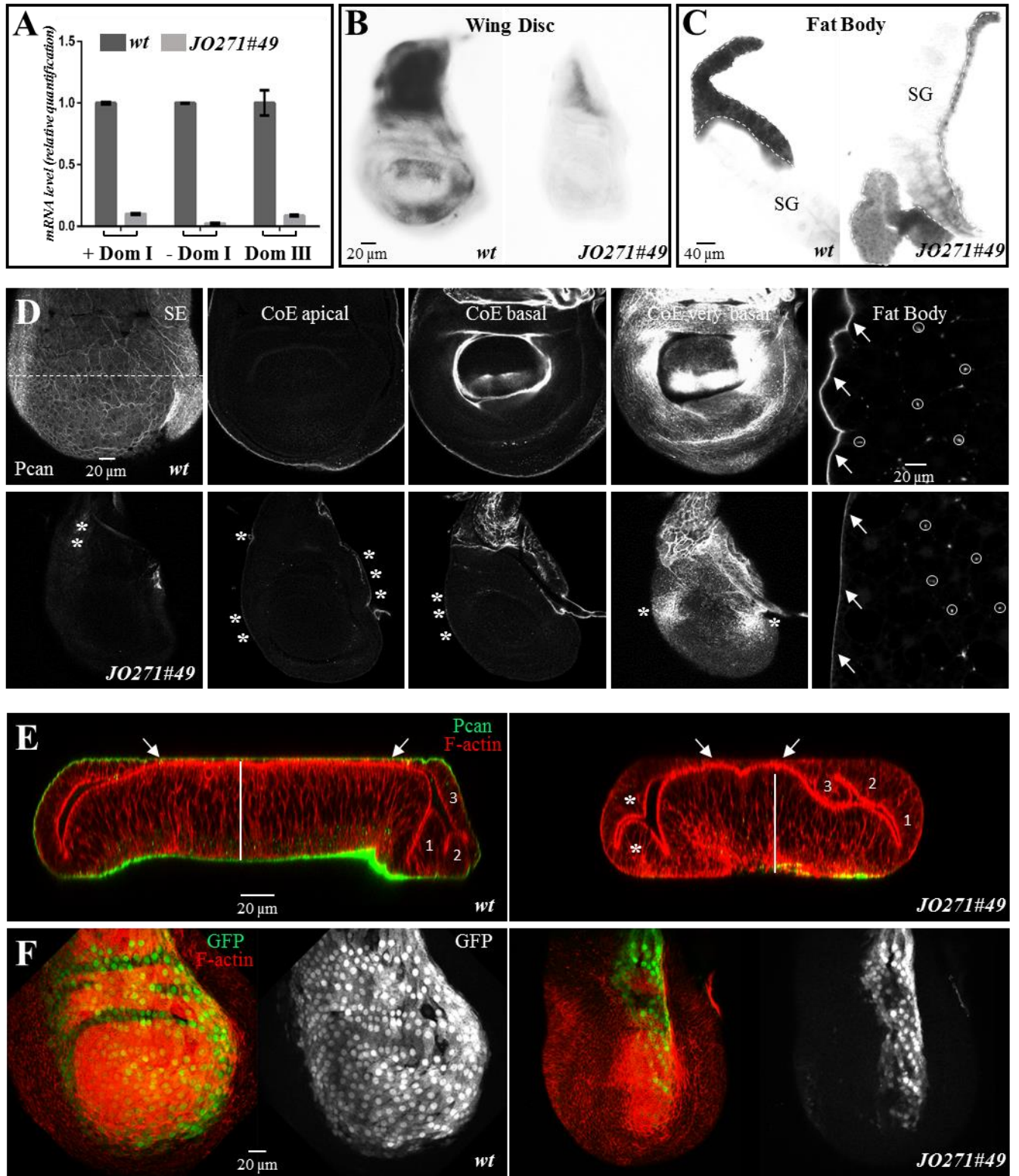


Figure 4: The *trol*^{J0271#49} mutation leads to a general reduction of Perlecan in a non-isoform specific manner and impacts the morphogenesis of the three different epithelia of the wing imaginal disc

(A) RT-qPCR on RNA extracted from late third instar larvae of the indicated genotype. Primers specific for *pcan* isoforms with a *Domain I* (+DomI), *pcan* isoforms without a Domain I (-DomI) or common to all isoforms (DomIII) were used. Average values plus and minus SEM are shown. The *pcan trol*^{J0271#49} mutant allele leads to the downregulation of all *pcan* isoforms.

(B,C) Bright field images of late third instar wing imaginal discs (B) and fat bodies (C) of the indicated genotypes, processed for RNA *in situ* hybridization with a *pcan* probe against exon 36. (B) Anterior is to the right and dorsal is up, scale bar (20 μm) is indicated on the picture of the control (*wt*). (C) Scale bar (40 μm) is indicated on the picture of the *wt*, SG: Salivary Gland. *pcan* mRNA is strongly reduced in the *trol*^{J0271#49} mutant, both in the wing imaginal disc (B) and in the fat body (C, outlined by the white dotted line).

(D) Confocal images of late third instar fat bodies and wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Pcan (white). For discs, anterior is to the right and dorsal is up. Scale bars (20 μm) are shown on the wild-type (*wt*) fat body and on the image for the *wt* squamous epithelium (SE) of the wing imaginal disc. In the *pcan* mutant (*trol*^{J0271#49}), Pcan protein is almost absent from the BM of the wing imaginal disc SE and cuboidal epithelium (asterisks point to remnants of expression), but some protein is still detected at the very basal level of the columnar epithelium (CoE) as well as between the cells of the fat body (circles) and in its BM (arrows).

(E) Confocal images of transverse sections parallel to the anterior/posterior axis of late third instar wing imaginal discs (dashed line in D illustrates the plane of section) of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Pcan (green) and F-actin (red). Anterior is to the right and the squamous epithelium is up. Scale bar (20 μm) is shown on the wild-type (*wt*). In the *pcan* mutant (*trol*^{J0271#49}), the columnar epithelium is taller (white bar, same size as the one on the *wt*), the folds of the lateral anterior cuboidal epithelium (numbered 1 to 3) are abnormally packed, the lateral posterior cuboidal epithelium exhibits ectopic folds (asterisks), and the squamous epithelium is reduced (delimited by the arrows).

(F) Confocal images of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, and expressing a cytoplasmic GFP (green) under the control of *AGIRGAL4* to label the squamous epithelium, confirm that the surface area of this epithelium is drastically reduced in the *pcan* mutant (*trol*^{J0271#49}). Anterior is to the right and dorsal is up. Scale bar (20 μm) is shown on the wild-type (*wt*).

Figure S4

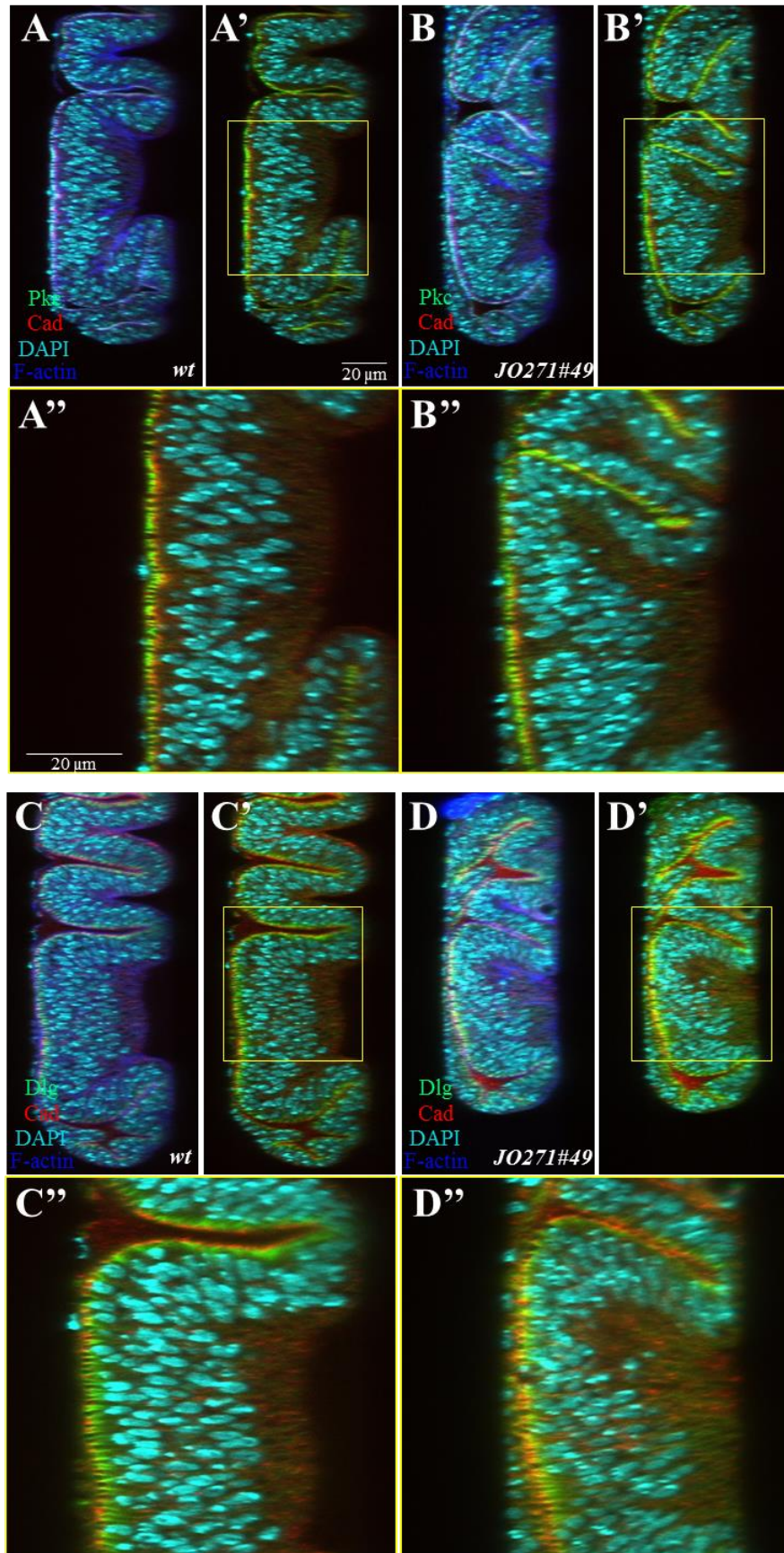


Figure S4: Epithelial cells of the wing imaginal disc retain normal apico-basal polarity in the absence of Perlecan

(A-D'') Confocal images of longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for PKC ζ (Pkc, green) and DE-cadherin (Cad, red) (A-B''), or Cad (red) and Disc large (Dlg, green) (C-D''). Enlargements in (A'',B'') and in (C'',D'') of the regions boxed in (A',B') and (C',D'), respectively, show no differences in the distribution of the polarity markers in the three epithelia of the *pcan* mutant (*trol*^{J0271#49}). Scale bar (20 μ m) is indicated in (A') for complete sections and in (A'') for close-ups. The squamous epithelium is to the left and dorsal is up.

Figure 5

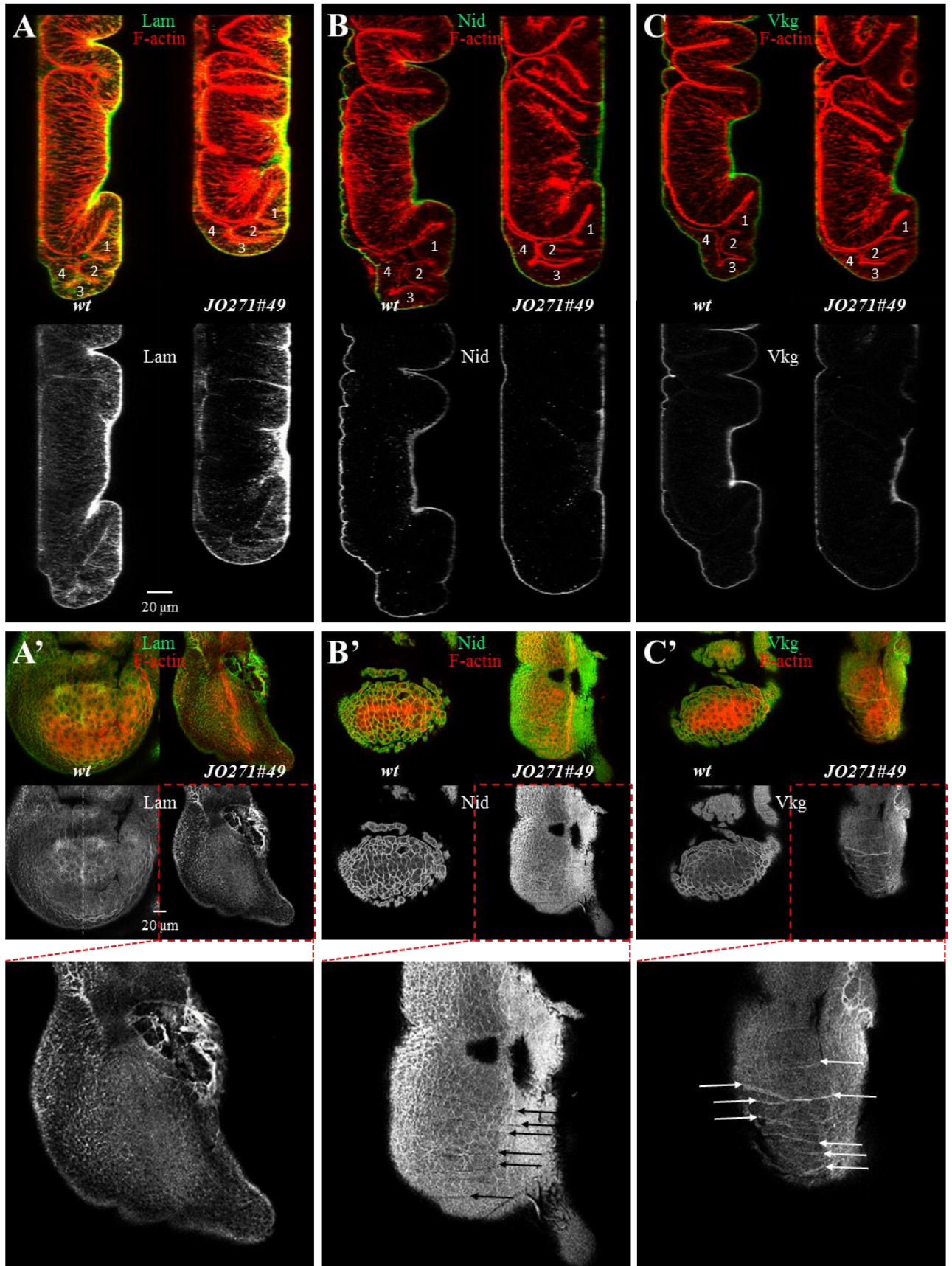


Figure 5: Perlecan is required for proper incorporation and/or maintenance of Collagen IV and Nidogen in the SE' BM

Confocal longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis (**A-C**, plane of section shown by the white dashed line in **A'**) and confocal images of xyz section of the squamous epithelium (**A'-C'**) of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Laminin (Lam, green in **A,A'**), Nidogen (Nid, green in **B,B'**) and directly visualized for Viking-GFP, a protein trap of one of the two alpha chains of Collagen IV (Vkg, green in **C-C'**). (**A-C**) The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. Scale bar (20 μm) is indicated in (**A**) on the separate channel for Lam. Lam, Nid and Vkg are still deposited around the wing imaginal disc in the *pcan* mutant (*trol^{J0271#49}*), however the folding of the cuboidal epithelium of the ventral pleura is abnormal (folds of are numbered from 1 to 4). (**A'-C'**) Anterior is to the right and dorsal is up. Scale bar (20 μm) is indicated in (**A'**) on the separate channel for Lam. Bottom images are enlargements of the images delimited by red dashed lines. In the absence of Pcan (*trol^{J0271#49}*), Lam distribution is normal in the squamous epithelium BM, whereas the distribution of Nid and Vkg is altered, as fiber-like structures parallel to the anterior/posterior axis are visible in, respectively, negative or positive, in the squamous epithelium BM (arrows).

Note that in (**A',B',C'**) the apparent pattern seen with the staining for the BM components at the level of the squamous epithelium in *wt* specimen is an artefact. The staining actually reveals a uniform layer but as the tissue is not stretched (see Fig **9A**) and the image acquisition corresponds to a single confocal plane, it appears as if the staining outlines cells.

Figure S5

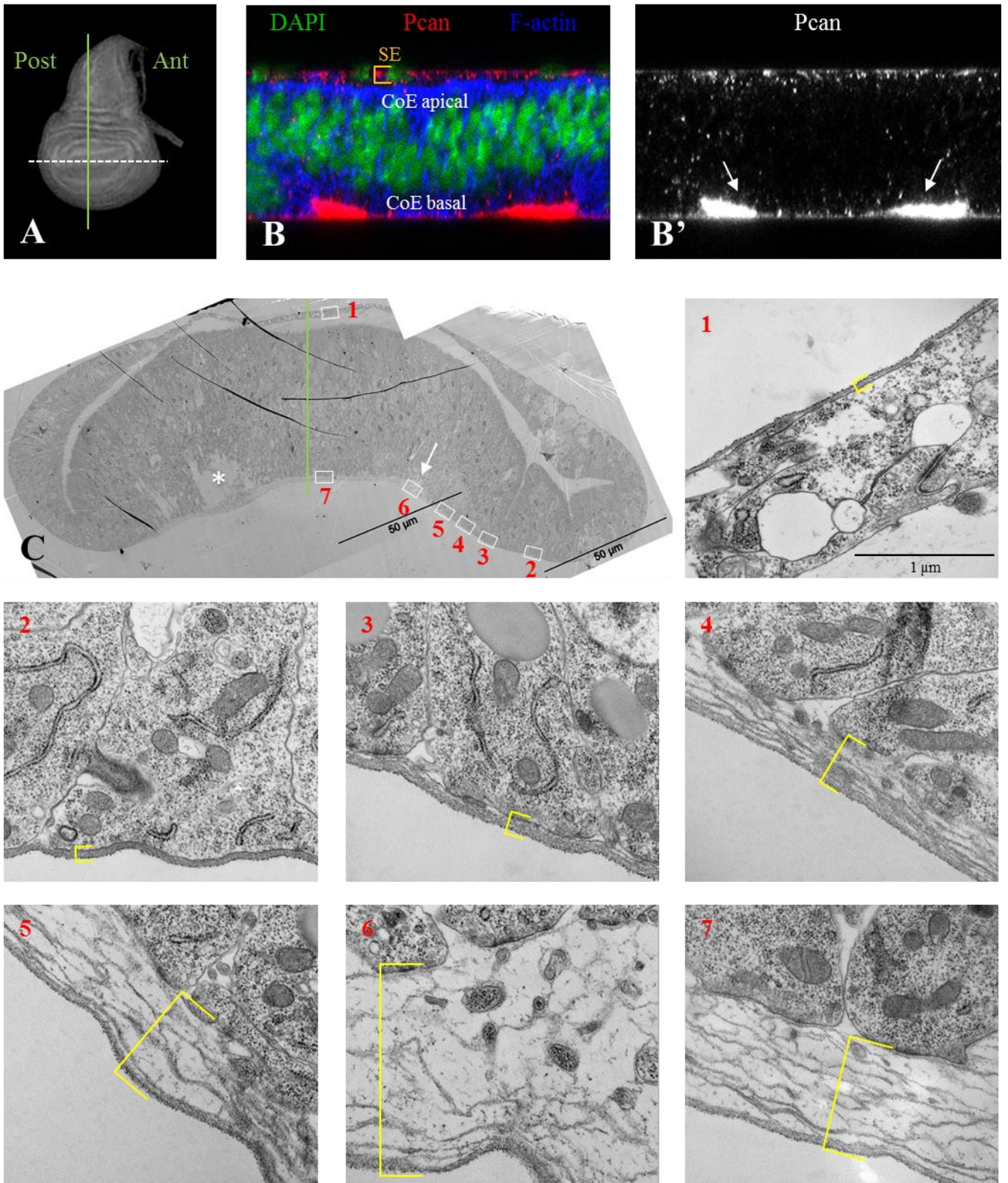


Figure S5: The wing imaginal disc displays three BMs with different ultrastructure and specific to the epithelium they underline

(A) Bright-field picture of a late third instar wing imaginal disc illustrating the plane of section (white dotted bar) of confocal images (**B,B'**) or TEM micrographs (C, ultra-thin section, picture 1 to 7 ultra-thin sections taken at the same magnification, close-ups corresponding to the regions boxed and numbered in C). (A,C) the green line indicates the approximate anterior/posterior compartment boundary and the asterisk in (C) points to a tear in the tissue. Scale bar for the TEM semi-thin section (50 μm) is indicated on the micrograph (C), and scale bar for the TEM ultra-thin sections (1 μm) is indicated on picture 1.

(**B,B'**) in a wild-type wing imaginal disc, Pcan protein (red, shown alone in **B'**) is present on the basal side of cells (SE: squamous epithelium, CoE: columnar epithelium) and accumulates in two regions underneath the folds of the wing pouch (white arrows).

(1-7) The BM (yellow brackets) changes morphology as the epithelium converts from a squamous to cuboidal shape and then from a cuboidal to columnar shape. The BM of the SE is thin and dense (picture 1). As the epithelium changes shape, the BM remains dense but starts to thicken in the region where cells are cuboidal (picture 2). When the epithelium adopts its columnar shape, the BM begins to show a layered structure (picture 3) which becomes obvious in picture 4. Thereafter, the BM exhibits electron-lucent parts with dots in between the layers forming a network (picture 5). It reaches its maximum height at the fold of the wing pouch (picture 6 and arrow in c) and maintains its organization with a slight decrease in height underneath the center of the pouch (picture 7). The maximum height of the BM roughly corresponds to regions of Pcan accumulation (**B,B'**).

Figure 6

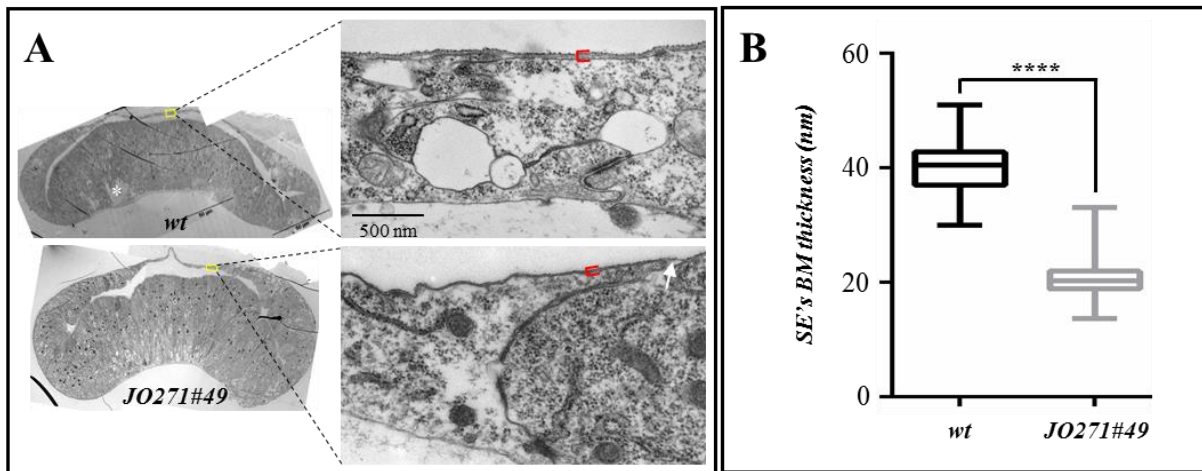


Figure 6: The ultrastructure of the SE' BM is abnormal in the absence of Perlecan

(A) TEM micrographs of transverse ultra-thin sections parallel to the anterior/posterior axis of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype. Left images show the entire tissue. Right images are close-ups of the regions boxed in yellow on the left images. Scale bar for the entire tissue (50 μ m) is indicated on the micrograph for the control (*wt*) of the left images, and scale bar for the close-ups (500 nm) is indicated on the micrograph for the *wt* of the right images. Anterior is to the right and the squamous epithelium is up. The red bracket indicates the localization of the BM of the squamous epithelium in the *wt* and *pcan* mutant (*tro1^{JO271#49}*) conditions and the arrow points to a region consisting of the hairy outer layer only in the *pcan* mutant (see text for details). (B) Quantification of the squamous epithelium (SE) thickness. Data were subjected to the non-parametric pairwise Wilcoxon test and show a significant decrease of the BM thickness in the *pcan* mutant.

Figure 7

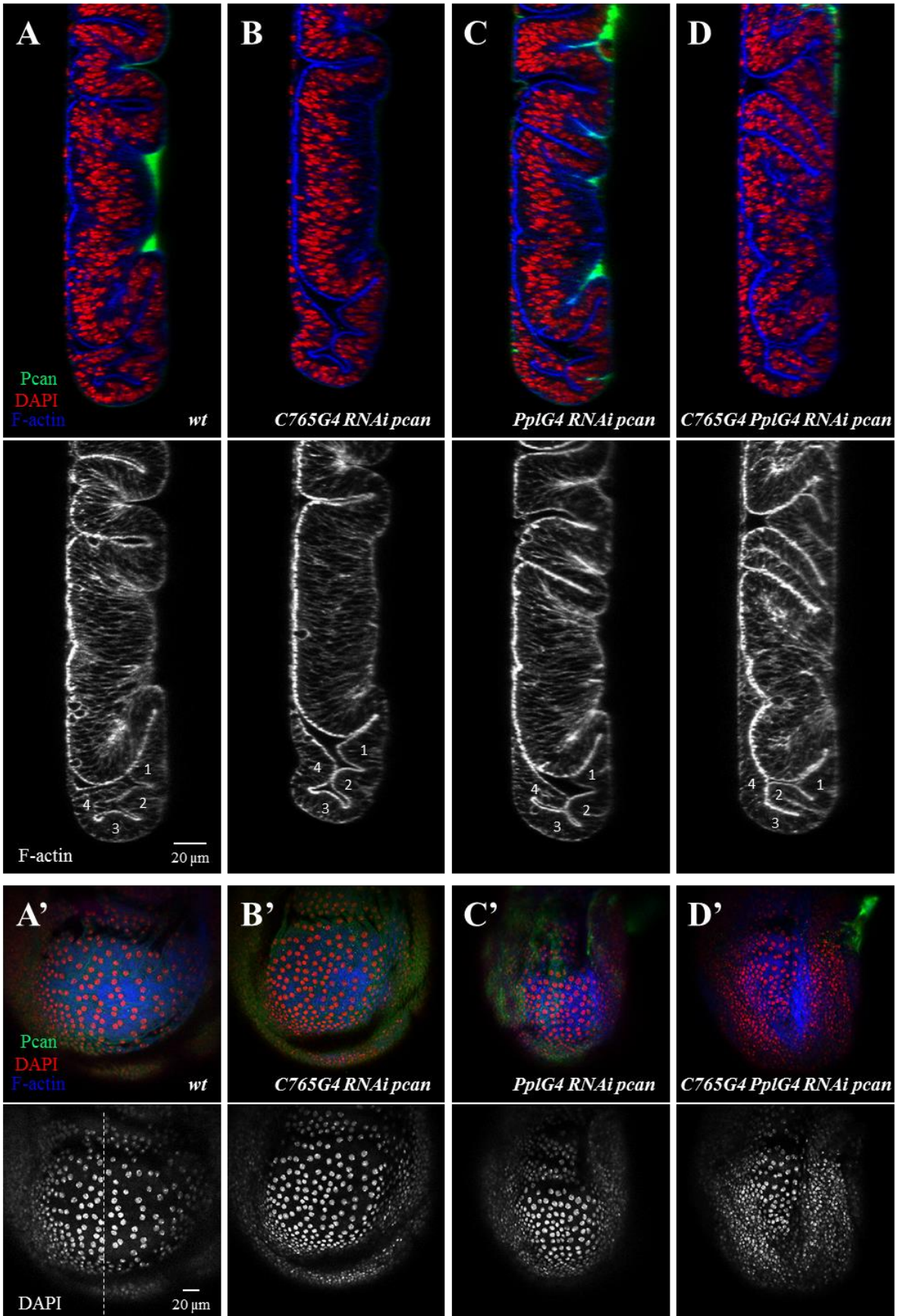


Figure 7: The autonomous and non-autonomous Perlecan both contribute to the overall architecture of the wing imaginal disc

(**A-D'**) Confocal longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis (**A-D**, plane of section shown by the white dashed line in **A'**) and confocal images of xyz section of the squamous epithelium (**A'-D'**) of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Pcan (green), stained with DAPI to highlight nuclei (red, or white when shown alone) and with phalloidin to reveal F-actin (blue, or white when shown alone).(**A-D**) The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. (**A'-D'**) Anterior is to the right and dorsal is up. Scale bars (20 μm) are shown on the separate channel for F-actin in (**A**) for xyz sections, and on the separate channel for DAPI in (**A''**) for xyz sections.

(**A-D'**) Autonomous or non-autonomous depletion of the wing imaginal disc BM Pcan using *UAS-trol.RNAi^{JF03376}* and *C-765-GAL4 (C765G4)* or *PplGAL4 (PplG4)*, respectively, does not have much of a consequence on the folding of the cuboidal epithelium of the ventral pleura (**A,B,C**, folds numbered 1 to 4), or on the morphology of the squamous epithelium as seen by the distance between its cell nuclei (**A',B',C'**). We note nonetheless that with *PplG4*, nuclei are closer to one another than in the control (compare **C'** to **A'**). *pcan* depletion with both *GAL4* however, induces a compression of the cuboidal epithelium of the ventral pleura (**D**, particularly visible for the fold number 2) and causes a packing of most of the nuclei at the level of the squamous epithelium (**D'**).

Figure S6

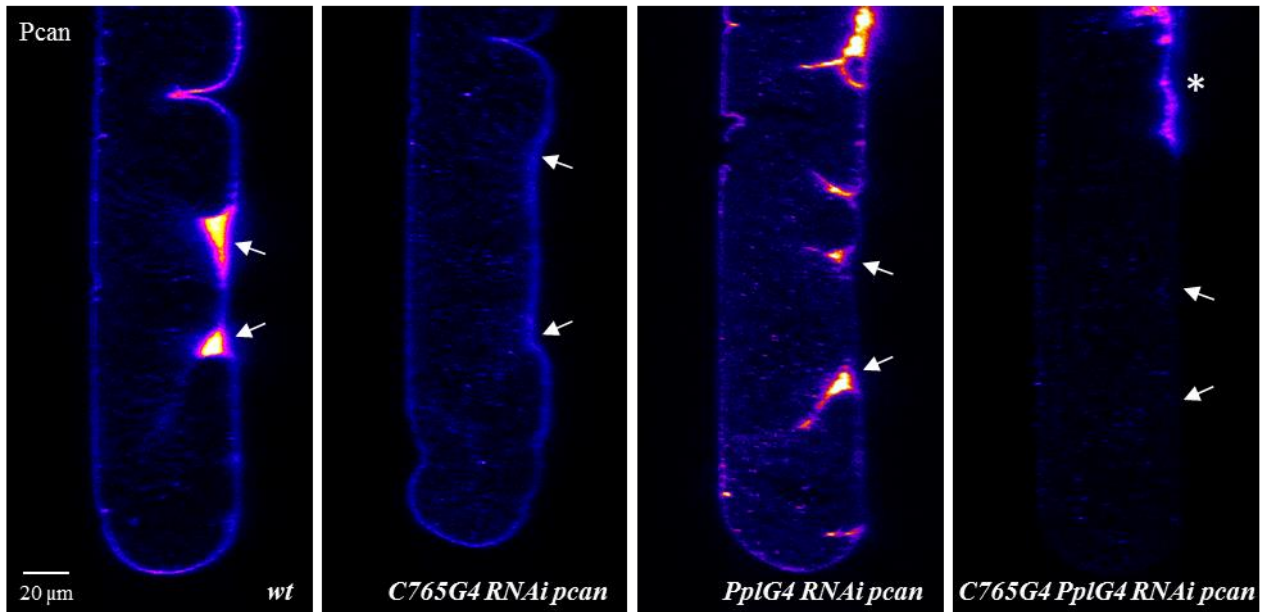


Figure S6: Compensation between Perlecan autonomous and non-autonomous sources for its deposition in the wing imaginal disc BM

Confocal images of longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for Pcan (heat map “fire” representation from the FIJI software). Scale bar (20 μm) is indicated on the left image. The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. *pcan* depletion with the *UAS-trol.RNAi^{JF03376}* in the wing imaginal disc with *C-765-GAL4* (*C765G4*) causes the disappearance of the Pcan “quadrants” only (arrows in all images point to where the quadrants should be), whereas its depletion in few cells of the pouch, the fat body and the gut with *PplGAL4* (*PplG4*) decreases Pcan levels in the quadrants and in the thin layer surrounding the tissue. However, *pcan* depletion with both *GAL4* induces a total loss of Pcan staining (except in the notum region where none of the two *GAL4*s are expressed, asterisk).

Figure S7

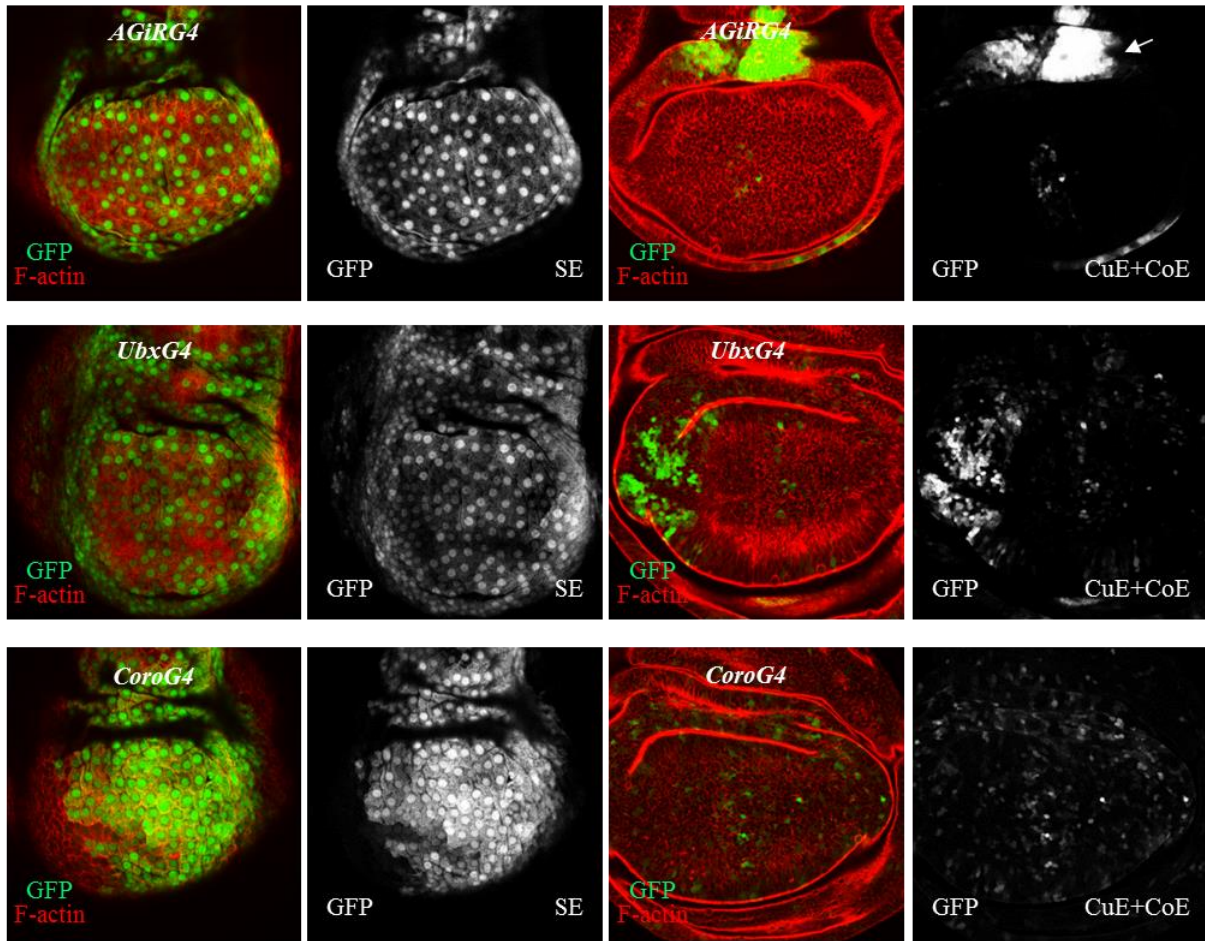


Figure S7: Wing imaginal disc expression pattern of *GAL4* drivers expressed in the SE

Confocal images of late third instar wing imaginal discs showing unamplified GFP reporter signal (green, or white when shown alone) at the level of the squamous epithelium (SE) or the cuboidal and columnar epithelium (CuE and CoE, respectively). The same imaging settings were conserved in between the SE and CuE/CoE to allow direct comparison of fluorescence intensity. Anterior is to the right and dorsal is up. Flies carrying a *UAS-GFP* construct were crossed with flies carrying the *GAL4* (*G4*) indicated on the images together with *tub-GAL80^{ts}*. Crosses were maintained at 18°C (*GAL80^{ts}* permissive temperature) until the mid third instar larval stage (8 days) and then switched at 29°C (*GAL80^{ts}* restrictive temperature) for 24h prior to dissection. All three *GAL4* are expressed at the third instar larval stage in the SE, but also strongly in the CoE of the hinge for *AGiRGAL4* (arrow), in the CoE of the posterior part of the pouch for *UbxGAL4*, and to a lesser extent in scattered cell of the CoE of the pouch for *CoroGAL4*.

Figure 8

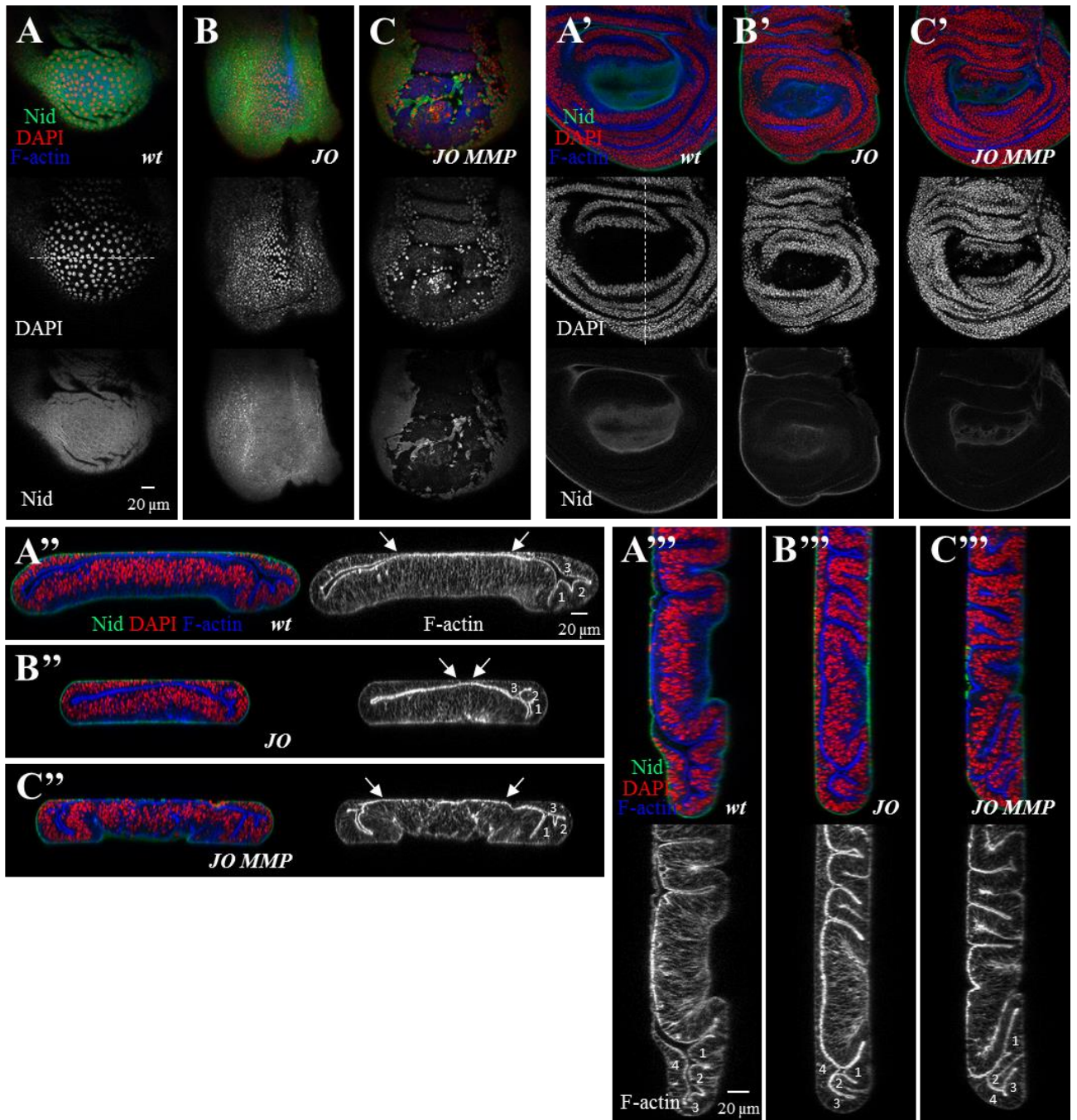


Figure 8: The defective SE's morphogenesis of the *perlecan* mutant triggers overall defective wing imaginal disc architecture

(A-C'') Confocal images of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, taken at the level of the squamous epithelium (A,B,C), at the very basal side of the columnar epithelium (A',B',C'), or corresponding to transverse sections parallel to the anterior/posterior axis (A'',B'',C'', dashed line in A shows plane of section) and to longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis (A''',B''',C''', dashed line in A' shows plane of section). (A-C') Anterior is to the right and dorsal is up. (A''-C'') Anterior is to the right and the squamous epithelium is up. (A'''-C''') The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. Scale bars (20 μ m) are shown in (A) for xyz sections and in (A''') for all xzy sections.

(A-C''') The tissue is labeled by immunofluorescence for Nid (green, or white when shown alone) and stained with DAPI to highlight nuclei (red, or white when shown alone) and with phalloidin to reveal F-actin (blue, or white when shown alone). (A,A',A'',A''') control sample (*wt*). (B,B',B'',B''') *pcan* mutant (*trol^{J0271#49}: JO*). (C,C',C'',C''') *pcan* mutant with time-controlled expression of the MMP2 collagenase in the wing imaginal disc squamous epithelium (*JO MMP*). This was achieved by crossing flies carrying the *JO* allele and *MMP* with flies carrying *CoroGAL4* together with *tub-GAL80^{ts}*. Crosses were maintained at 18°C (GAL80^{ts} permissive temperature) until the mid-late third instar larval stage (9 days) and then switched at 29°C (GAL80^{ts} restrictive temperature) for 24h prior to dissection. The expression of MMP with *CoroGAL4* in the *pcan* mutant digests the squamous epithelium BM but not the cuboidal and columnar BMs, as seen with Nid staining (A-C and A'-C', respectively). This leads to an increased spacing of the nuclei of the squamous cells (A-C, DAPI) and to a restoration of the surface area covered by these cells (delimited by arrows in A''-C'', F-actin). Strikingly, the basal surface of the columnar epithelium is also widened (A'-C', DAPI), and the folds of the lateral anterior and ventral pleura cuboidal epithelium are less compacted (A''-C'', numbered 1 to 3, F-actin, and A'''-C''', numbered 1 to 4, F-actin, respectively).

Figure 9

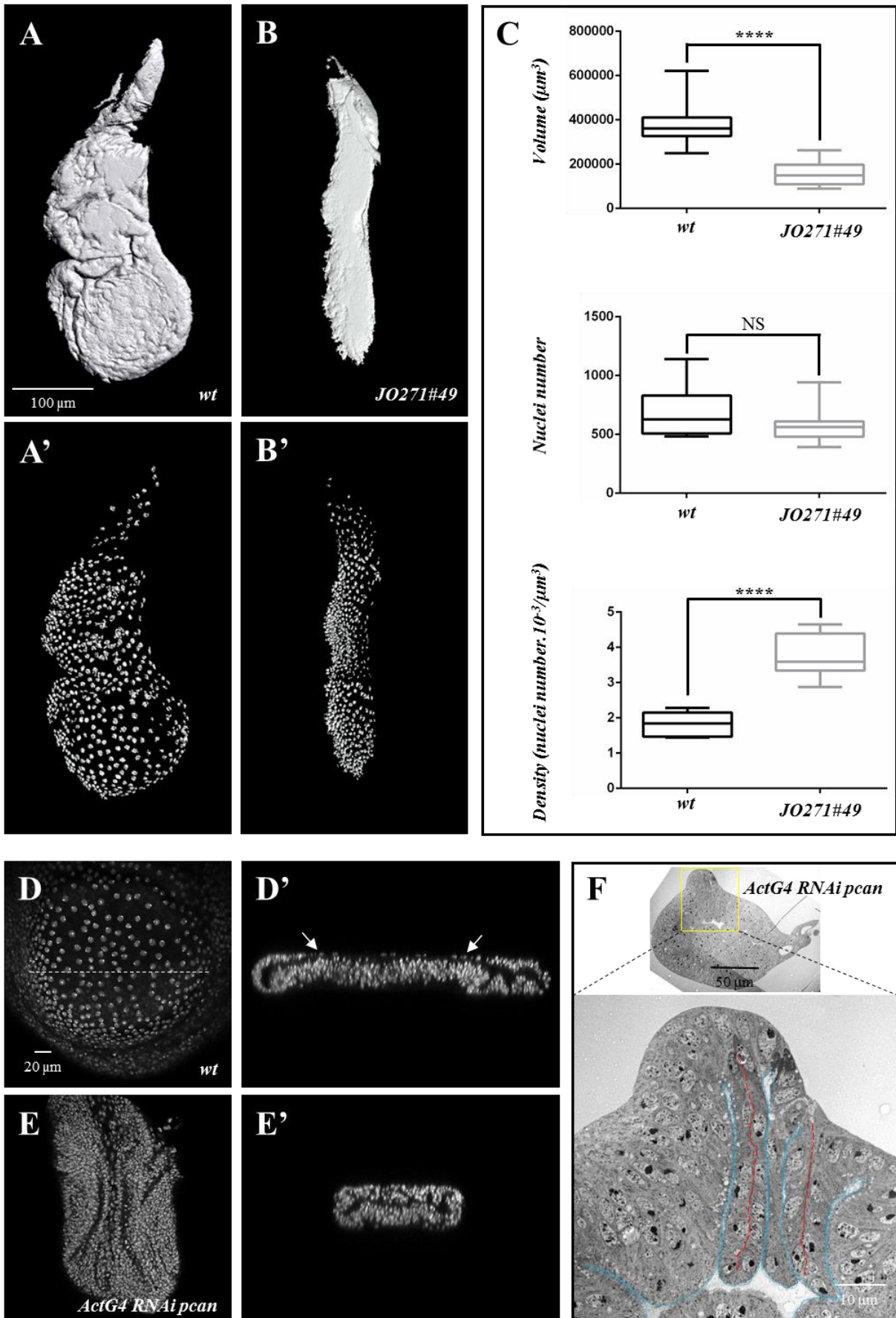


Figure 9: Perlecan is necessary for the spreading of the SE's cells

(A-B') Imaris 3D reconstitution of the squamous epithelium of late third instar wing imaginal discs. The volume of the tissue (A,B) is based on the expression of a cytoplasmic GFP under the control of *AGiRGAL4* in the indicated genotypes. Nuclei (A',B') were then segmented within this volume. Anterior is to the right and dorsal is up. Scale bar (100 μm) is shown in (A).

(C) Plots of the squamous epithelium volume, nuclei number and density. Data were subjected to the non-parametric pairwise Wilcoxon test and show that in the *pcan* mutant (*trol*^{J0271#49}), while the cell number of the tissue is not significantly different (witnessed by the nuclei number), its volume is reduced and this is accompanied by a rise in cell density.

(D-E') Confocal images of the squamous epithelium (D,E) and of transverse sections parallel to the anterior/posterior axis (D',E', plane of section shown by the white dashed line in D) of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, stained with DAPI to highlight nuclei. Anterior is to the right and dorsal is up in (D,E), and anterior is to the right and the squamous epithelium is up in (D',E'). Scale bar (20 μm) for (D-E') is shown in (D). Ubiquitous depletion of *pcan* with the *UAS-trol.RNAi*^{JF03376} expressed with *Actin-GAL4* (*ActG4*), results in the loss of squamous cell morphology as seen by the absence of spaced and flat nuclei (E and E', respectively, wild-type squamous epithelium delimited by arrows in D'). Furthermore, the wing imaginal disc is extremely compacted along both anterior/posterior and dorsal/ventral axes (E,E', compare with D,D').

(F) TEM micrographs of transverse ultra-thin sections parallel to the anterior/posterior axis (plane of section shown by the white dashed line in D) of a late third instar wing imaginal disc of the indicated genotype. Top image shows the entire tissue, scale bar (50 μm) is indicated on the micrograph. Bottom image is an enlargement of the region boxed in yellow on the top image, scale bar (10 μm) is indicated on the micrograph. Anterior is to the right and the region where the squamous epithelium should be is up. Bottom image: The ubiquitous depletion of *pcan* converts squamous cells into cuboidal ones (see morphology of the cells on either side of the red dashed line), and the former squamous epithelium becomes bi-layered in some regions (the red dashed line is drawn in between the two layers) and invades the lumen of the wing imaginal disc (delimited by blue dotted line).

Figure S8

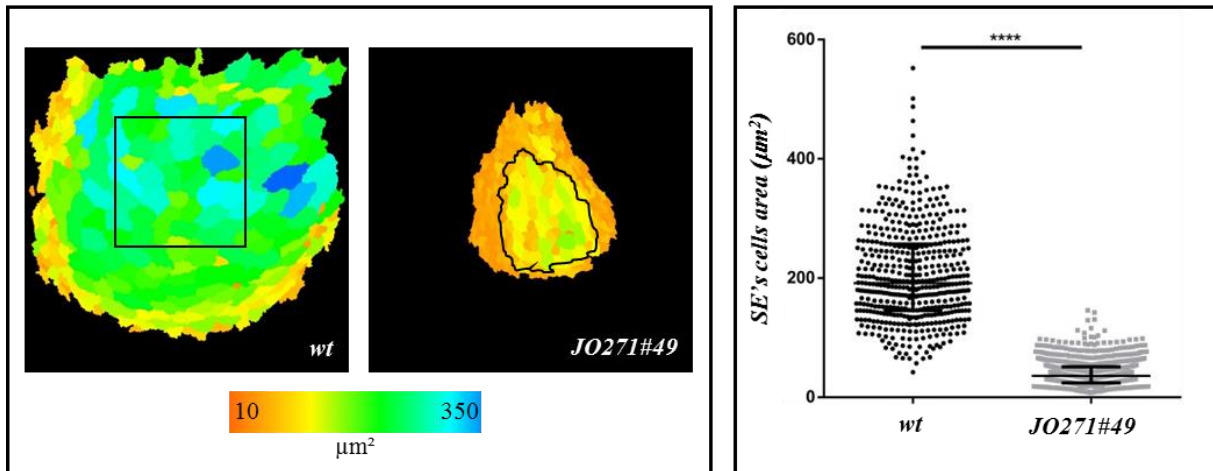


Figure S8: The surface area of the SE's cells is reduced in the *perlecan* mutant

(**Left**) Maximum-intensity projections of Dlg staining of wing imaginal discs of the indicated genotype were used to segment the cells of the squamous epithelium with Epitools. The black square for the wild-type (*wt*) and the black outline for the *pcan* mutant (*tro1^{JO271#49}*) indicate the region where the cell surface area was plotted in the right panel. Anterior is to the right and dorsal is up. (**Right**) Data were subjected to the non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test and show a significant decrease in the surface area of the SE's cells in absence of Perlecan.

Figure 10

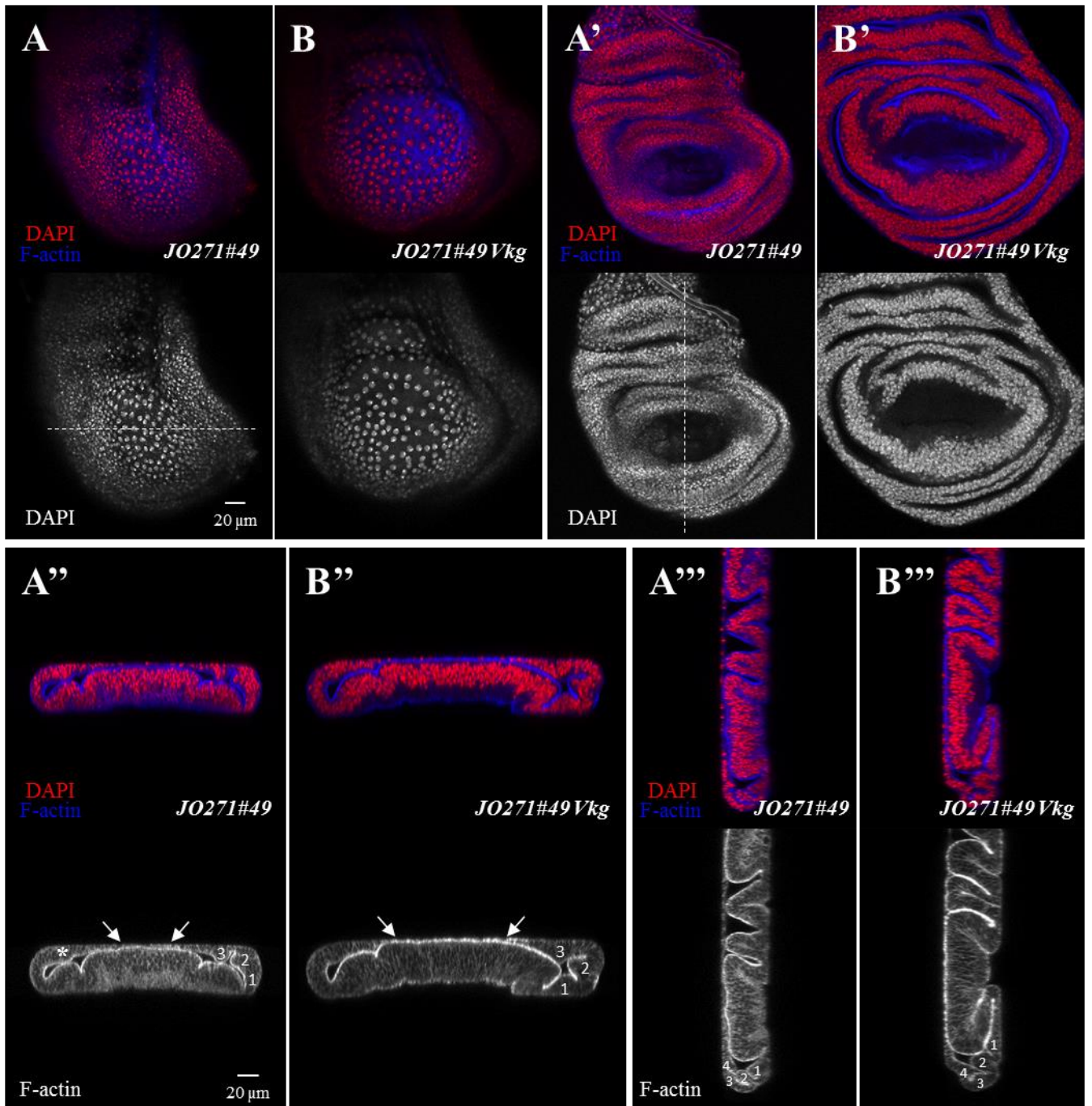


Figure 10: Decreasing Col IV in the *perlecan* mutant reinstates almost normal wing imaginal disc morphogenesis

(**A-B''')** Confocal images of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, taken at the level of the squamous epithelium (**A,B**), at the very basal side of the columnar epithelium (**A',B'**), or corresponding to transverse sections parallel to the anterior/posterior axis (**A'',B''**, dashed line in **A** shows plane of section) and to longitudinal sections parallel to the dorsal/ventral axis (**A''',B'''**, dashed line in **A'** shows plane of section). (**A-B'**) Anterior is to the right and dorsal is up. (**A'',B''**) Anterior is to the right and the squamous epithelium is up. (**A''',B'''**) The squamous epithelium is to the left and dorsal is up. Scale bars (20 μm) are shown in (**A**) for xyz sections and in (**A''**) for all xzy sections.

(**A-B''')** The tissue is stained with DAPI to highlight nuclei (red, or white when shown alone) and with phalloidin to reveal F-actin (blue, or white when shown alone). The introduction of a mutant allele for *Viking* (*Vkg*) in the *pcan* mutant context (*trol*^{JO271#49}) increases the spreading of the squamous cells as seen by the distance between their nuclei (compare **A** and **B**) and the extent of the surface spanned by the squamous epithelium with F-actin (delimited by arrows in **A'',B''**). In addition, the surface of the basal columnar epithelium is expanded (compare **A'** and **B'**). Moreover, the folds of the lateral anterior cuboidal epithelium (numbered 1 to 3 in **A'',B''**) and of the ventral pleura cuboidal epithelium (numbered 1 to 4 in **A''',B'''**) are more relaxed, and the lateral posterior cuboidal epithelium is no longer ectopically folded (asterisk in **A''**).

Figure 11

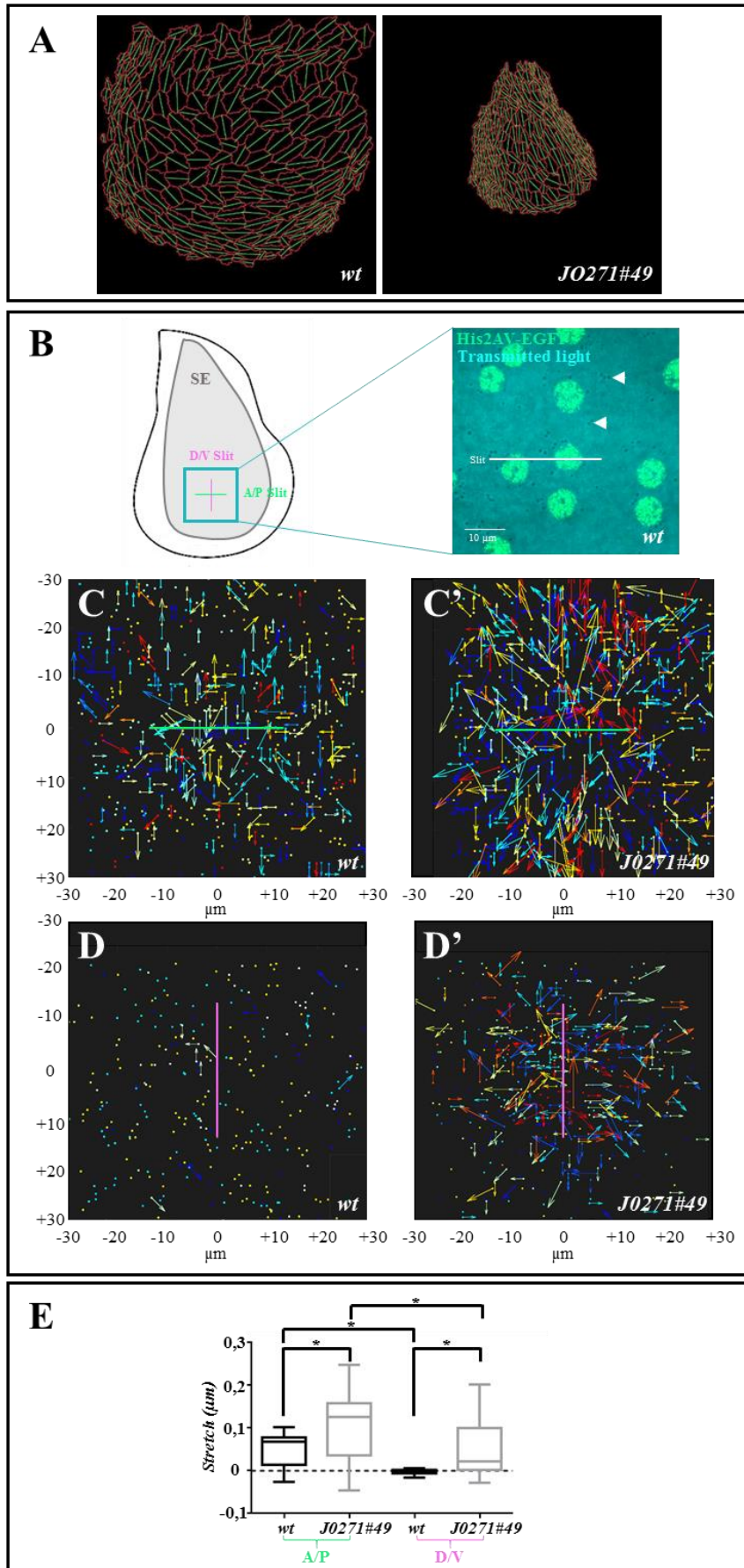


Figure 11: Perlecan controls the mechanical properties of the SE

(A) Maximum-intensity projections of Dlg staining of wing imaginal discs of the indicated genotype were used to segment the cells of the squamous epithelium with Epitools. The resulting cell skeletons are represented in red with the major elongation axis of the cell in green. (B-D') Assessment of squamous epithelium (SE) tension along the dorsal/ventral (D/V) and anterior/posterior (A/P) axis. The central region of the SE (boxed on the wing imaginal disc scheme in B) of *wt* (image shown in B as an example) and *J0271#49* wing imaginal discs expressing His2AV-EGFP reporter were slit (white line on the image in B) along the D/V or A/P axis (color-coded on the scheme in B), and the consecutive stretch of the tissue was quantified by tracking intracellular vesicles visible in transmitted light (white arrowheads on the image in B). The A/P slit (green line on the scheme in B and in C,C') allowed the analysis of the tension along the D/V axis, whereas the D/V slit (magenta line on the scheme in B and in D,D') allowed the analysis of the tension along the A/P axis. Vesicles movements are represented by colored vectors in (C-D') and each color corresponds to vesicles tracked from a single wing disc. Anterior is to the right and dorsal is up. (E) Stretch values were obtained by averaging the distances covered by the vesicles from the wound. Data were subjected to the non-parametric pairwise Wilcoxon test and show significant increases in the stretch of the SE upon both D/V and A/P slits in the *pcan* mutant (*troJ0271#49*). No less than 10 discs were analyzed in each conditions, except for the D/V slit on the *wt* SE (6 discs) in which the stretch was null.

Figure 12

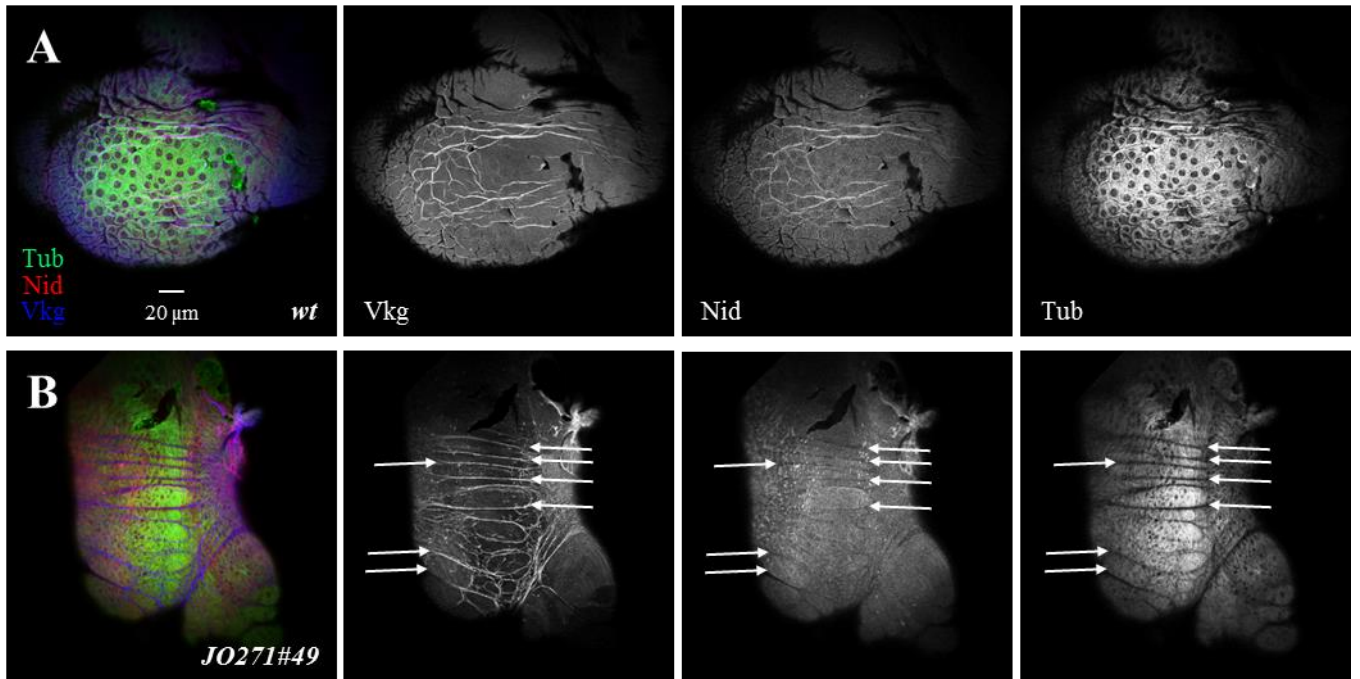


Figure 12: The lack of Perlecan compromises the SE's microtubule network

(A,B) Confocal images taken at the level of the squamous epithelium of late third instar wing imaginal discs of the indicated genotype, labeled by immunofluorescence for α Tubulin (Tub, green) and Nid (red), and directly visualized for Vkg-GFP (Vkg, blue). Anterior is to the right and dorsal is up. Scale bar (20 μ m) is indicated in A. In the *pcan* mutant (*trol*^{JO271#49}), Vkg forms fiber-like structures which co-localize with “negative” fiber-like structures in the Nid layer and in the cell microtubule cytoskeleton as seen with Tub (arrows in the separate channels for Vkg, Nid and Tub in B).

DISCUSSION

Drosophila Perlecan is fully conserved

Few years ago, it was admitted that the invertebrate Pcan did not possess a domain I (Farach-Carson et al., 2014). Among the five domains of Pcan, this domain I, constituted by a SEA module, is the only one to be unique to the molecule. It was considered as a hallmark of the evolution specific to the vertebrates (Hummel et al., 2004). Here, we show for the first time that the *Drosophila* Pcan possesses a *bona fide* domain I, containing a SEA module and GAG attachment sites. Our study reinforces a previous work, which reported the conservation of the SEA module in the Pcan of the invertebrate *T.adhaerens* (Placozoa) (Warren et al., 2015). It is therefore surprising that a domain I has not yet been reported in the Pcan of *C.elegans*, Unc-52, given the importance of this domain in BM organisation and growth factors binding. Indeed, the HS chains harboured by this domain are the main binding site for Laminin and Collagen IV (Battaglia et al., 1992; Ettner et al., 1998; Friedrich et al., 1999; Talts et al., 1999), and are also described as being the ones interacting with growth factors such as BMP2 or FGFs (Chu et al., 2005; DeCarlo et al., 2012; Knox et al., 2002; Melrose et al., 2006). Yet, *C.elegans* BM structure and growth factors activity are conserved. Thus, this could indicate that it exists HS attachment sites outside the domain I, and that this alternative HS chains could entirely fulfil the function normally attributed to the N-terminal HS chains. Such alternative HS attachment sites have been demonstrated in human and mice, in which the domain V of Pcan is supplemented with HS chains (Brown et al., 1997; Friedrich et al., 1999). Moreover, in total contrast to the mice completely lacking Pcan (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999), the mutant mice possessing an allele of *pcan* devoid of the HS attachment sites in the domain I are viable and fertile, and exhibit a weak phenotype in terms of BM organisation (Rossi et al., 2003). In addition, this version of Pcan is more sulfated, likely in the domain V, suggesting a compensation for the loss of the N-Terminal chains (Morita et al., 2005). Thus, this indicates that the C-terminal HS chains of Pcan could partially take on the functions of the N-terminal HS chains. The presence of these chains in the domain V could also explain the role of Trol (*Drosophila* Pcan) in motor axon guidance (Cho et al., 2012). In this study, the authors showed that the HS chains of Pcan are necessary for this activity. Interestingly, the guidance defect due to Pcan loss was restored by overexpressing a Pcan devoid of domain I, i.e. theoretically devoid of HS chains. This means that *Drosophila* Pcan could also bear HS chains in domains other than the domain I. To confirm this, we analysed the sequence of Trol and found that the domain V possesses GAG attachment sites (our unpublished results). Therefore, the C-terminal HS attachment sites are conserved in *Drosophila* as well.

Our study also uncovered the use of two alternative transcription initiation sites in the *trol* locus which allow the production of mRNAs encoding isoforms either with or without a domain I, i.e. with or without the N-terminal HS chains. This type of regulation seems to be specific to *Drosophila pcan* since

alternative transcription initiation sites have not been reported in other species. Interestingly nonetheless, in mouse, all N-terminal HS chains are carried by exon 3, which while artificially deleted (Morita et al., 2005; Rossi et al., 2003) does not disrupt the open reading frame. It is tempting to speculate that alternative splicing of exon 3 could generate two types of isoforms, with or without N-terminal HS chains, analogous to the isoforms we described in *Drosophila*.

In any case, the existence in *Drosophila* of a Pcan containing the domains I to V makes this organism a good model system to study the function of this protein.

The sources of the Pcan deposited in the wing imaginal disc BM

It has been previously reported that the Pcan deposited in the wing disc BM is entirely non-autonomously provided by the fat body and/or the haemocytes (Dai et al., 2018; Zang et al., 2015). Here, we show that the Pcan of the wing disc BM emanates from at least two different sources: (1) the wing disc itself, (2) the fat body and/or the gut or a still unidentified tissue. This discrepancy relies on the tools used to visualize the protein distribution. The afore mentioned authors used a protein trap line with a *YFP* exon inserted in the domain II, a domain predicted to be subjected to a lot of splicing events. Therefore, it is likely that the YFP tag is not present in all isoforms such as the ones present in the quadrants. This issue could actually be the same for the other components of the wing disc BM. Indeed, the question of the sources of the Laminin, the Collagen IV and the Nidogen for this tissue was also addressed by using fluorescent protein trap lines (Dai et al., 2018; Pastor-Pareja and Xu, 2011). A re-examination using a direct immunodetection of the endogenous non-tagged proteins with an antibody recognizing all the isoforms or RNA *in situ* hybridization would be useful to clarify the situation. Another difference between our study and the previous ones also resides in the depletion system. Indeed, the authors silenced the expression of the wing imaginal disc BM component with an RNAi construct against the *YFP* or the *GFP* exon, a method referred to as the *in vivo* GFP/YFP interference (iGFPi or iYFPi) (Pastor-Pareja and Xu, 2011; Zang et al., 2015). In the case of Pcan, the *YFP* being unlikely to be present in all RNA isoforms, the *iYFPi* did probably not target all the isoforms. Again, the same problem could arise for other BM components that have isoforms, such as Laminin. Moreover, the Gal4 lines employed to express the RNAi constructs in a tissue-specific manner could further account for the variations in our results. Dai, Zang and colleagues used two different lines which drive expression in the fat body cells and the haemocytes. Using the same Gal4 lines, we expressed an RNAi targeting an endogenous sequence common to all *pcan* mRNA isoforms. This failed to remove Pcan from the wing disc BM. These results mean that, even if the fat body and the haemocytes constitute a non-autonomous sources for the Pcan deposited in the wing disc BM, they are clearly not the only ones. In fact, only the use of the *ppl-Gal4* line succeeded in depleting Pcan from the wing disc BM. Although this line was supposed to be specific for the fat body (Colombani et al., 2003), we discovered that it also drives expression in the center of the wing disc pouch and in the gut (our unpublished data). We obtained

preliminary results that seem to indicate that the latter constitutes a non-autonomous source for Pcan in the wing disc BM. If this is fully confirmed, we would be the first to report the role of the gut as a BM component provider, and in the future, the contribution of this tissue to the deposition of the other BM components such as Collagen IV or Nidogen would have to be assessed. To conclude, since the gut and the fat body are nutrient sensors which seem to form an axis to control larval growth (Colombani et al., 2003; Rodenfels et al., 2014), it is appealing to hypothesize that this control occurs also through the regulation of the BM deposition.

The function of Pcan in the wing imaginal disc BM

Squamous epithelium BM biogenesis

Previous reports demonstrate that Collagen IV is necessary for the incorporation of Pcan in the wing disc and fat body BMs (Dai et al., 2018; Pastor-Pareja and Xu, 2011). Although Pcan is shown not to be required for the deposition of the other components in the fat body BM (Dai et al., 2018), we show here that Pcan is needed for the proper assembly and/or maintenance of the Collagen IV network in the BM outlining the wing disc SE. To date, it is the first time that Pcan is demonstrated (1) to have a direct role in the formation of the BM and (2) to achieve this function by acting on the Collagen IV. The effect of Pcan on the Collagen IV network in the BM is reminiscent of its role on the fibrillary Collagen network in the cartilage matrix (Gustafsson et al., 2003; Kvist et al., 2006). Indeed, in this specialized matrix, loss of Pcan causes an abnormal organisation of the fibrillary network, due to a drastic decrease in the density of the Collagen II fibrils. This indicates that Pcan have a function in the assembly and/or maintenance of this fibrillary network. Surprisingly, however, in the SE' BM of the wing disc, loss of Pcan induced the formation of polarized fibril-like structure of Collagen IV. Yet, *Drosophila* does not produce fibril-forming Collagens, the only Collagen produced being Collagen IV which normally forms a network. Nevertheless, polarized fibril-like structures have been described during the elongation of the egg chamber in this organism (Haigo and Bilder, 2011; Isabella and Horne-Badovinac, 2016), which arise from an autonomous deposition of Collagen IV, Laminin and Pcan in the pericellular space, along with a migratory rotation of the source cells. In our case, since the fiber-like structures we observed are only composed of Collagen IV which is non-autonomously provided, they cannot be formed by a similar mechanism. In addition, the SE cells do not undergo any migration process. Thus, we rather hypothesize that the fiber-like organisation of the Collagen IV in absence of Pcan is the result of a reorganisation of the network. This network is normally assembled through both NC1-NC1 dimerisation and 7S-7S tetramerisation of the Collagen IV protomer, which gives a spread-out scaffold (Brown et al., 2017). But it has also been shown that lateral interactions between the triple helix of the protomers lead to another network, irregular in its aspect with high and low density region alternating (Yurchenco and Ruben, 1987). Thereby, we propose that Pcan acts on the Collagen IV network to restrict this lateral association by directly interacting with the triple helix (Aumailley et al., 1989), and hence form a regular

mesh of Collagen IV. Without Pcan, the lateral associations would increase dramatically, and the network would collapse.

Intriguingly, in the absence of Pcan, the fiber-like structures of Collagen IV only appeared in the SE' BM but not in the CuE' and CoE' BMs. This suggests that these three BMs should be somehow different, which is supported by our TEM analysis, meaning that their composition should differ. Indeed, while Pcan is the only PGSH deposited in the SE' BM, Collagen XVIII is also present in the CoE' BM (our unpublished data). Thus, this Collagen XVIII could also be implicated in the organisation of the Collagen IV mesh in the CoE' BM as it interacts with the NC1 domain of Collagen IV (Heljasvaara et al., 2017), masking a function for Pcan in this BM. Moreover, the formation of the fiber-like structures specifically in the SE' BM could also rely on the biochemical nature of the Collagen IV itself. As a matter of fact, Collagen IV protein can be highly modified before and after its secretion. Notably, the NC1 domain can be cleaved extracellularly, changing the association with the other components of the BM (Okada et al., 2017). Interestingly, a staining for this NC1 domain in the *pcan* mutant wing disc BMs showed a uniform and homogenous layer of NC1 with no accumulation in the fiber-like structures of the SE' BM (our unpublished data), whereas Vkg-GFP does accumulate in these structures. Thus, the fiber-like structures contain an accumulation of Vkg-GFP devoid of NC1, which could have been cleaved. It is tempting to think that this cleavage could impair the polymerisation of the Collagen IV protomers and promote their lateral association, hence altering the formation of a proper and homogenous network. Thus, Pcan could have a function in limiting or preventing the NC1 cleavage.

Last, another striking feature is that these fibers are polarized, perpendicular to the D/V axis. Such a polarization might be the consequence of the SE' BM tension in the wing imaginal disc of the *pcan* mutant. Atomic force microscopy (AFM) could provide a direct measurement of this tension. The use of the AFM on the wing disc BM should be doable, since it has already been applied to the BM of the egg chamber (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017). However, since the decrease of Collagen IV amount restores a normal morphology, it is likely that the fibers of the SE' BM are rather a cause of the tension than a consequence. In any case, for the moment, we do not have any explanation for the polarization of the fiber-like structures.

With such an alteration of the Collagen network upon Pcan loss, we were surprised to observe an absence of BM breakage by electron microscopy. So far, it has been described that the highly stressed BMs are disrupted when devoid of Pcan, making the latter the guarantor for BM integrity (Costell et al., 1999). Thus, it appears that Pcan do not fulfil this function in the wing disc BM. A BM disruption starts to occur upon stronger conditions for Pcan loss-of-function, suggesting that its role in BM integrity is indirect. However, the different BMs outlining the three different epithelia of the wing disc are structurally altered, presenting a decreased thickness in some of their regions. This phenotype is particularly clear and homogenous for the SE' BM. The role of Pcan in the thickness of the BM could

be accounted for by three mechanisms. First, the tethering role of Pcan between the Collagen IV and Laminin networks (Behrens et al., 2012) may physically increase the gap between these two meshes. Second, similar to the HS chains of the proteoglycans in the retina BM of the chick embryo (Balasubramani et al., 2010), the HS chains of the Pcan could promote the hydration of the SE' BM, and as a consequence, increase its thickness. Third, since it has been proposed that Pcan counteracts the BM rigidity imposed by Collagen IV, it could release the tension of the BM (see next section). In contrast, the thickness decrease of the CuE' and CoE' BMs without Pcan are variable. This suggests that the absence of Pcan could be partially rescued in these BMs. Again, the presence of the Collagen XVIII in the CoE' BM could provide an explanation. The Collagen XVIII could be functionally redundant at least in the CoE' BM by acting as a spacer between Laminin and Collagen meshes, or by providing hydration through its HS chains. The simultaneous depletion of Pcan and Collagen XVIII in the wing disc BMs should bring the proof of their redundancy. Moreover, the specific removal of their HS chains attachment sites *in vivo* would allow to determine if they are implicated in BM thickness regulation.

Squamous epithelium morphogenesis

In this study, we demonstrated that the defect in the SE' BM alters the morphogenesis of the SE' cells. In agreement with what was found in the *Drosophila* egg chamber and wing disc (Chlasta et al., 2017; Crest et al., 2017; Pastor-Pareja and Xu, 2011), we provide evidence that Collagen IV and Pcan act antagonistically in the BM to regulate tissue tension. The Collagen IV provides tissue constriction, while Pcan gives elasticity by regulating the Collagen network organisation. We directly assessed the increased tension of the SE provoked by the fiber-like structures of Collagen IV by cutting together the tissue and the fiber-like structures with a laser. This compression reduces the SE' surface area. This reduction in the tissue area is caused neither by a proliferation problem, nor an increased apoptosis. Thus, even if local compression has been shown to drive apoptosis (Levayer et al., 2016), our results suggest that it is not the case for a global compression. In fact, the reduction of the surface spanned by the SE is the consequence of a reduction in planar cell size which is likely caused by a modification of the cell shape. These processes could be linked to the increased compression. Indeed, it was recently shown that mechanical strain controls Hippo signalling in the wing disc (Fletcher et al., 2018). This pathway is known to regulate growth and differentiation by regulating the nuclear location of the transcriptional co-activator Yorkie (Yki) (Misra and Irvine, 2018). Upon high mechanical pressure, Hippo signalling is on and prevents Yki translocation to the nucleus. Upon low mechanical pressure, the pathway is off and Yki becomes nuclear. Fletcher and colleagues show that the nuclear localisation of Yki is needed to acquire a squamous cell shape. Thus, the increased tension induced by the loss of Pcan in the SE' BM could lead to an activation of the Hippo signalling pathway and, thereby, a retention of Yki in the cytoplasm. This would force the cells to change their shape and become cuboidal, resulting in a reduction in their planar size, and ultimately in a decrease of the tissue area. However, the Hippo

pathway is shown to respond to apical tension. Here, we describe a basal compression. This implies a transmission of this basal tension toward the apical side of the cells. One possibility is that the cytoskeleton supplies this link. Indeed, cytoskeletal tension has been demonstrated to regulate Hippo signalling activity (Rauskolb et al., 2014). Remarkably, the BM is directly coupled to the cytoskeleton through integrin and dystroglycan receptors (Lowell and Mayadas, 2012; Yurchenco, 2015). This coupling allows the cells to sense the mechanical change in their environment. Although we did not find evidence that integrins participate to this process, a modification in the basal tension could be transmitted by these cell receptors to the apical pole through the cytoskeleton, and hence control Hippo signalling. Confirming the implication of the cytoskeleton, the microtubules display a different distribution in the SE in absence of Pcan. The microtubule cytoskeleton has been previously linked to the shape of the cells of the wing disc (Gibson and Perrimon, 2005; Tang et al., 2016). Alternatively, the cell shape changes could be due to the modification in the expression profiles of the two proteins Lines and Bowls. These nuclear proteins specify the shape of the cells in the wing disc, Lines promoting the columnar shape acquisition whereas Bowls favours of the squamous shape (Nusinow et al., 2008). In conclusion, the Hippo pathway activity as well as the pattern of the proteins Lines and Bowls need to be assessed in the wing disc upon Pcan loss-of-function conditions.

Wing disc morphogenesis

So far, the function of the wing imaginal disc SE was thought to be mainly restricted to the eversion of the tissue, a process that allows the evagination of the CoE and CuE, which are the precursors of the adult wing and thorax (Milner et al., 1984). Nevertheless, some findings tend to indicate that the role of the SE is not confined to this eversion process. In particular, it has been shown that wing disc SE cells contribute to the growth and the patterning of the CoE cells by sending signals to the latter (Gibson and Schubiger, 2000). We demonstrate here that the SE is a mechano-regulator of the wing disc development. Indeed, an impeded SE morphogenesis affects the morphogenesis of the whole tissue. In particular, the CuE and the CoE present abnormal and ectopic apical foldings (our unpublished results for the CoE). The formation of an apical fold could be due to different force-dependent mechanisms. In the leg and wing discs, Monier and colleagues have provided evidence that apoptotic cells create an apico-basal tension transmitted by myosin-II cables which cause the folding of the tissue (Monier et al., 2015). Since the loss of Pcan has been shown to drive cell death (Sher et al., 2006), we analysed the occurrence of this process in our conditions and observed no abnormal apoptosis neither in the CuE nor in the CoE (our data not shown). Therefore, the formation of the ectopic folds is not linked to this mechanism. Another explanation could be provided by a decrease in the basal tension. Such a relaxation has been described in the formation of the wing disc hinge/hinge fold (Sui et al., 2018). The authors reported a local decrease in the deposition of the Collagen IV which causes a decrease in the tension and, as a consequence, drives the fold formation. Here, even if we did not measure directly the tension

of the CoE and CuE tissues, Collagen IV level is not reduced in the CoE' BM and the CuE' BM. Thus, the basal tension of the CoE and the CuE is likely not decreased. In fact, even if this phenotype is not penetrant, we observed that cells detach from the BM, rather suggesting an increased tension (our data not shown). A third explanation could be based on an increase in the lateral tension. Such a mechanism has been demonstrated in the formation of the wing disc hinge/pouch fold and relies on an increase in the lateral level of actin and a cell shortening (Sui et al., 2018). Although we did not quantify F-actin level in the cells located in the folding regions, we do observe a diminution in the cell height (see for instance Fig 4E). Thus, it is tempting to speculate that the overall compression we observed in the absence of Pcan generates an increase in the lateral tension of the cells, provoking ectopic fold formation.

To conclude, we have to mention that Pcan is required in other tissues. Indeed, in our hypomorphic condition as well as in a more severe transheterozygous combinations of mutant alleles, we observed highly penetrant defects in the eye, in the male gonads, and a complete sterility of females. The halteres and the leg also display less penetrant deficiencies. Finally, we noted a dramatic muscle detachment in all the individuals analysed from a strong hypomorphic backgrounds. This suggests that Pcan is particularly needed in the tissues subjected to important mechanical constrain. In the future, the characterization of the effects of a Pcan' loss in all these tissues should provide valuable insights into the mechanical role of this protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Drosophila strains and genetics

Flies were raised on standard cornmeal-agar medium and crosses were performed at 25°C unless otherwise indicated in the figure legends. Mutant alleles were *Vkg*⁰¹²⁰⁹, *trol*^{J0271#49} characterized here, *trol*^{G0271} and *trol*^{null} recombined onto the *wFRT18A* chromosome (Voigt et al., 2002). Large mitotic clones for the *trol*^{null} allele were generated with the *hsFLP/FRT* system (Xu and Rubin, 1993) using *hsFLP* and the *wUbi-GFP M FRT18A* lines. Since *pcan* is on the X chromosome and both *trol*^{null} and *M* hemizygous males are not viable, we rescued *trol*^{null} male lethality with the *Dp(1;2;Y)w⁺* line. Heat-shock was conducted for 1h at 38°C at the mid first instar larval stage.

The following *UAS-RNAi* lines were used: *UAS-trol.RNAi*^{JF03376} and *UAS-trol.RNAi*^{HMS01759} from the TRiP collection. Other *UAS* lines were *UAS-Mmp2*, *UAS-p35*, *UAS-GFP* and *UAS-Dcr-2*. *GAL4* lines were: *Act-GAL4*, *ppl-GAL4*, *nub-GAL4*, *AGiR-GAL4*, *C-765-GAL4*, *coro-GAL4* and *Ubx-GAL4* (both from (Pallavi and Shashidhara, 2003)), *Lpp-GAL4* (Brankatschk and Eaton, 2010) and *Cg-GAL4* (Asha et al., 2003). To modulate GAL-mediated expression of *UAS* transgenes, we used *tub-GAL80^{ts}*. Additional lines were *His2Av-EGFP* and GFP protein trap lines *pcan-GFP*^{64.07} (Besse et al., 2007) and *vkg-GFP* (Morin et al., 2001). *w¹¹¹⁸* served as a wild-type control. Non-referenced lines were obtained from the BDRC.

Identification of Pcan domain I

The first seven annotated coding exons of the *pcan* locus (exons 3 to 9 according to FlyBase numbering) were translated *in silico* with the ApE software. Domain homologies within this peptide were searched for with SMART. Putative GAG attachment sites were identified according to (Esko and Zhangt, 1996).

Molecular characterization of the *trol*^{J0271#49} allele

trol^{J0271#49} allele was characterized by isolating genomic DNA (as described in (Pirrota, 1986) from adult hemizygous mutant male escapers and mapping of the deletion by PCR. Genomic DNA extracted from *w* and heterozygous *trol*^{G0271} adult female flies served as positive controls for PCR amplification. The *trol*^{J0271#49} deletion breakpoints were verified in two independent PCR reactions. Primer sequences are available upon request.

RT-PCR and RT-qPCR

Total RNA from 20 late third instar larvae (*w* or *trol*^{J0271#49} males) was extracted with the TRI Reagent (MRC) and cDNA was synthesized by random-priming with the Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), starting from 2µg of RNA. For RT-PCR, 2 µl of the RT reaction were used to perform PCR with the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega). PCR products were sequenced by Eurofins Genomics and DNA sequences alignment obtained with the ApE software. Results were verified in at least two independent RT-PCR experiments. For RT-qPCR, 8 ng of cDNA were used to perform real time RT-PCR with the PowerSYBRGreen PCR mastermix (Applied Biosystem) and StepOne Plus (Applied Biosystem). Samples were normalized with the house keeping gene Actin. At least three separate samples were collected per experiment and triplicate measurements were run on each sample. PCR conditions, primer sequences and sequences are available upon request.

RNA *in situ* hybridization

Sense and antisens probes for *pcan* mRNA were designed against the largest *pcan* exon as in (Voigt et al., 2002), and synthesized with a DIG RNA Labeling Kit (Roche). Whole-mount RNA *in situ* hybridization on larval tissues was carried out essentially as described in (Lehner and O'Farrell, 1990) except that fixed dissected larvae were dehydrated in methanol, omitting ethanol and xylene steps, samples were treated with proteinase K at a concentration of 12.5 µg/ml for 30s, and hybridization temperature was 55°C. Probes were detected using an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) and the NBT/BCIP or fluorescent Fast Red substrates (both from Roche). Samples were mounted in VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories). Bright field images were taken on a wide-field Axioplan2 Zeiss microscope using a color camera and confocal images were acquired on a Leica TCS SP5 microscope. Pictures were processed with the Adobe Photoshop CS6 software.

Fluorescent immunostaining

Early, mid, late third instar larvae and white pupae were fixed in 4% PFA in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 PBS and blocked in 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100 PBS. Primary antibodies were diluted as follows: rabbit polyclonal anti-Pcan (Friedrich et al., 2000) 1:3500, rabbit polyclonal anti-GFP (Torrey Pines Biolabs, TP401) 1:400, mouse monoclonal anti-GFP (Roche, 11814460001) 1:200, rabbit polyclonal anti-Nidogen (Wolfstetter et al., 2009) 1:1000, rabbit polyclonal anti-Lamininβ1 (Abcam, ab47650) 1:500, mouse monoclonal anti-Multiplexin (Momota et al., 2011) 1:250, rat polyclonal anti-DE-cadherin (Development Studies Hybridoma Bank University of Iowa – DSHB, DCAD2) 1:50, rabbit polyclonal anti-PKCζ (Santa Cruz, sc-216) 1:500, mouse monoclonal anti-Disc large (DSHB, 4F3) 1:100, rabbit polyclonal anti-cleaved Caspase 3 (Cell Signaling, 9661) 1/200, rabbit

polyclonal anti-phospho-Histone H3 (Merckmillipore, 06-570) 1:400, mouse monoclonal anti- β PS (DSHB, CF.6G11) 1:200, rabbit polyclonal anti-Phospho-FAK (Invitrogen, pTyr397 44-624G) 1:500, guinea pig polyclonal anti-Sqh (Kiehart and Feghali, 1986) 1:200, mouse monoclonal anti- α Tubulin (Sigma, DM1A T9026) 1:500, and rabbit polyclonal anti-NC1 from ColIV (McCall et al., 2014) 1:30. Note that for the NC1 immunostaining, an extracellular protocol was used as described (McCall et al., 2014). Fluorescent secondary antibodies were diluted at 1:100 (Cy3- and Cy5-conjugated antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories and Alexa Fluor 488-conjugated antibodies from Life Technologies). TRITC or FITC-conjugated phalloidin (Sigma) or FluoProbes 647H-phalloidin (Interchim) was always included at 1:100 in the staining procedure. Samples were mounted in VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories). To compare specimens of different genotypes, samples were stained in parallel using the same antibody solutions and imaged with identical acquisition settings. Confocal data were acquired on three different upright microscopes: a Leica TCS SP1, a Leica DM TCS SPE and a Leica TCS SP5. xyz and xzy images were all single sections collected at the focal plane indicated in the figures except for the xzy images related to *troI^{mut}* M clones. These were orthogonal views of a z-stack encompassing the entire wing imaginal disc (typically between 120 and 140 steps with a step size of 0.6 μ m, for a z volume around 80 μ m). Pictures were processed with the Adobe Photoshop CS6 software. No less than 20 wing imaginal discs were examined per genotype.

Transmission electron microscopy

Reports of *Drosophila* adult and larval haemolymph osmolarity show highly variable results. Based on the osmolarity of a medium compatible with wing imaginal disc culture (from 285 to 345 mosm, (Robb, 1969), we opted for a fixation buffer with an osmolarity of 300 mosm (1.5% glutaraldehyde in 0.075 M cacodylate buffer). Wing imaginal discs were then embedded in Epon according to standard procedures. 70 nm-thick sections deposited on slot grids (to prevent parts of the tissue section to be hidden by the mesh present on regular grids) were observed at 100 kV with a 120 kV JEOL JEM-1400 electron microscope. Digital acquisitions were made with a numeric MORADA camera (Olympus SIS). Sectioning and microscope observation was performed at the CCMA EM core facility (Université Nice Côte d'Azur).

BM thickness was analyzed on 2 non-consecutive sections from 3 different discs per genotype, using the straight line tool from ImageJ-win64. Unless specified, 5 images per section were taken at the appropriate location and BM was measured at 2 distinct positions on each image, yielding a total number of 60 values per condition. Note that regions where the plasma membrane bi-layer and the darker outer hairy layer of the BM were not clearly defined were not taken into account as they result from a tangential sectioning of the tissue. Non-parametric statistics and plots were obtained with the GraphPad Prism software.

Analysis of the squamous cells area and elongation axis

Cell surface area was measured with Tissue Analyzer (Aigouy et al., 2016) and Epitools Icy programs (Heller et al., 2016). Maximum-Intensity projection of z-stacks encompassing the entire SE of the wing imaginal disc were processed with Tissue Analyzer to produce hand-corrected TIF skeleton images depicting cell outlines. Skeleton images were analyzed with Epitools Icy plugins to obtain surface area data. Anti-Dlg staining allowed for reconstruction of epithelial topology.

Analysis of the squamous epithelium volume and nuclei number

Late third instar *wt* or *trol*^{H0271#49} male larvae expressing a *UAS-GFP* transgene in the wing imaginal disc squamous epithelium with the *AGiR-GAL4* driver were dissected and fluorescently stained for GFP to increase the signal. GFP and DAPI (included in the mounting medium) were imaged by performing a z-stack with mosaic acquisition encompassing the whole domain of GFP expression (between 30 and 40 steps depending on the genotype, with a step size of 0.42 μm , for a z volume on average of 15 μm). 3D quantitation was performed using Imaris software. Briefly, the volume of the squamous epithelium based on the GFP channel was detected and measured using the surface tool. This volume was then used as a mask on the nuclei image (DAPI staining) to extract nuclei included inside this volume. Those were counted using the surface tool on the masked DAPI channel and segmenting it with a semi-automatic seeded region growing method. Non-parametric statistics and plots were obtained with the GraphPad Prism software.

***Ex vivo* laser surgery**

Wing imaginal discs from late third instar larvae were dissected in Schneider's drosophila medium supplemented with 10% FCS and transferred to 10 wells slides coated with teflon (Fisher 11787394, one disc per well, 30 μl of dissection medium per well). Discs were oriented before addition of a coverslip to have the squamous epithelium facing the coverslip. A slit was made in the squamous epithelium using a Zeiss LSM 780 NLO microscope with 40x/1.1W objective. For the ROI-based ablation, the Ti:Sapphire laser was setup at the most efficient wavelength (around 800 nm). Pixel size was setup at 0.2 μm and slit size was 28 μm *0.2 μm . Parameters (Dwell time and Ti:Sapphire power) were established daily on a test disc such that only the squamous epithelium and not the subjacent columnar epithelium was cut (i.e. at the limit of cavitation). Time series of 3 pre- and 20 post-ablation acquisitions were done every 500 ms for His2Av-EGFP and transmission images. Tissue deformation was estimated by tracking intracellular vesicles in the vicinity of the wound on transmission images with ImageJ.

For the quantification, we developed a script in Matlab to align the experiments (based on the ablation ROI extracted from metadata). We projected the deformation on the normalized gradient of wound distance map and then we extracted our deformation data (positive value for dilatation).

BIBLIOGRAPHY

- Abbott, L.A., and Natzle, J.E. (1992). Epithelial polarity and cell separation in the neoplastic l(1)dlg-1 mutant of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 37, 43–56.
- Aigouy, B., Umetsu, D., and Eaton, S. (2016). Segmentation and quantitative analysis of epithelial tissues. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 227–239.
- Aldaz, S., Escudero, L.M., and Freeman, M. (2013). Dual role of myosin II during *Drosophila* imaginal disc metamorphosis. *Nat. Commun.* 4, 1761.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 23, 354–358.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C.R. (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163, 203–215.
- Aumailley, M., Wiedmann, H., Mann, K., and Timpl, R. (1989). Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* 184, 241–248.
- Baena-López, L.A., Pastor-Pareja, J.C., and Resino, J. (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* 130, 6497–6506.
- Balasubramani, M., Schreiber, E.M., Candiello, J., Balasubramani, G.K., Kurtz, J., and Halfter, W. (2010). Molecular interactions in the retinal basement membrane system: A proteomic approach. *Matrix Biol.* 29, 471–483.
- Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M., and Timpl, R. (1992). Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur. J. Biochem.* 208, 359–366.
- Behrens, D.T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., and Hansen, U. (2012). The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J. Biol. Chem.* 287, 18700–18709.
- Besse, F., Mertel, S., Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Sigrist, S.J., and Ephrussi, A. (2007). The Ig cell adhesion molecule Basigin controls compartmentalization and vesicle release at *Drosophila melanogaster* synapses. *J. Cell Biol.* 177, 843–855.
- Brankatschk, M., and Eaton, S. (2010). Lipoprotein Particles Cross the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30, 10441–10447.
- Brown, J.C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997). The C-Terminal Domain V of Perlecan Promotes β 1 Integrin-Mediated Cell Adhesion, Binds Heparin, Nidogen and Fibulin-2 and Can be Modified by Glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* 250, 39–46.
- Brown, K.L., Cummings, C.F., Vanacore, R.M., and Hudson, B.G. (2017). Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells. *Protein Sci.* 26, 2151–2161.

- Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J.L., Arias, L., Lamiré, L.A., Boudaoud, A., and Grammont, M. (2017). Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Dev.* 144, 4350–4362.
- Cho, J.Y., Chak, K., Andreone, B.J., Wooley, J.R., and Kolodkin, A.L. (2012). The extracellular matrix proteoglycan perlecan facilitates transmembrane semaphorin-mediated repulsive guidance. *Genes Dev.* 26, 2222–2235.
- Chu, C.L., Goerges, A.L., and Nugent, M.A. (2005). Identification of common and specific growth factor binding sites in heparan sulfate proteoglycans. *Biochemistry* 44, 12203–12213.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Léopold, P. (2003). A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell* 114, 739–749.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fässler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.* 147, 1109–1122.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D.Y., Fletcher, D.A., and Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife* 6, 1–16.
- Dai, J., Estrada, B., Jacobs, S., Sánchez-Sánchez, B.J., Tang, J., Ma, M., Magadán-Corpas, P., Pastor-Pareja, J.C., and Martín-Bermudo, M.D. (2018). Dissection of Nidogen function in *Drosophila* reveals tissue-specific mechanisms of basement membrane assembly.
- Datta, S. (1995). Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development* 121, 1173–1182.
- DeCarlo, A.A., Belousova, M., Ellis, A.L., Petersen, D., Grenett, H., Hardigan, P., O’Grady, R., Lord, M., Whitelock, J.M., O’Grady, R., et al. (2012). Perlecan domain 1 recombinant proteoglycan augments BMP-2 activity and osteogenesis. *BMC Biotechnol.* 12, 60.
- Dominguez-Gimenez, P., Brown, N.H., and Martin-Bermudo, M.D. (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *J. Cell Sci.* 120, 1061–1071.
- Esko, J.D., and Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 663–670.
- Ettner, N., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K., and Timpl, R. (1998). The N-terminal globular domain of the laminin $\alpha 1$ chain binds to $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett.* 430, 217–221.
- Farach-Carson, M.C., Warren, C.R., Harrington, D.A., and Carson, D.D. (2014). Border patrol: Insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biol.* 34, 64–79.
- Fletcher, G.C., Diaz-de-la-Loza, M. del C., Borreguero-Muñoz, N., Holder, M., Aguilar-Aragon, M., and Thompson, B.J. (2018). Mechanical strain regulates the Hippo pathway in *Drosophila*. *Dev.* 145.

- Friedrich, M. V., Schneider, M., Timpl, R., and Baumgartner, S. (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *Eur. J. Biochem.* 267, 3149–3159.
- Friedrich, M.V.K., Göhring, W., Mörgelin, M., Brancaccio, A., David, G., and Timpl, R. (1999). Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J. Mol. Biol.* 294, 259–270.
- Gibson, M.C., and Perrimon, N. (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* (80-.). 307, 1785–1789.
- Gibson, M.C., and Schubiger, G. (2000). Peripodial Cells Regulate Proliferation and Patterning of *Drosophila* Imaginal Discs. *Cell* 103, 343–350.
- Gustafsson, E., Aszódi, A., Ortega, N., Hunziker, E., Denker, H.-W., Werb, Z., and Fässler, R. (2003). Role of Collagen Type II and Perlecan in Skeletal Development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 140–150.
- Haigo, S.L., and Bilder, D. (2011). Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science* (80-.). 1071–1074.
- Heljasvaara, R., Aikio, M., Ruotsalainen, H., and Pihlajaniemi, T. (2017). Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation — Lessons learned from model organisms and human patients. *Matrix Biol.* 57–58, 55–75.
- Heller, D., Hoppe, A., Restrepo, S., Gatti, L., Tournier, A.L., Tapon, N., Basler, K., and Mao, Y. (2016). EpiTools: An Open-Source Image Analysis Toolkit for Quantifying Epithelial Growth Dynamics. *Dev. Cell* 36, 103–116.
- Herranz, H., Weng, R., and Cohen, S.M.M. (2014). Crosstalk between Epithelial and Mesenchymal Tissues in Tumorigenesis and Imaginal Disc Development. *Curr. Biol.* 24, 1476–1484.
- Hummel, S., Osanger, A., Bajari, T.M., Balasubramani, M., Halfter, W., Nimpf, J., and Schneider, W.J. (2004). Extracellular matrices of the avian ovarian follicle: Molecular characterization of chicken perlecan. *J. Biol. Chem.* 279, 23486–23494.
- Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S. (2016). Rab10-Mediated Secretion Synergizes with Tissue Movement to Build a Polarized Basement Membrane Architecture for Organ Morphogenesis. *Dev. Cell* 38, 47–60.
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 457–473.
- Kiehart, D.P., and Feghali, R. (1986). Cytoplasmic myosin from *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 103, 1517–1525.
- Knox, S., Merry, C., Stringer, S., Melrose, J., and Whitelock, J. (2002). Not all perlecans are created equal. Interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 14657–14665.
- Kvist, A.J., Johnson, A.E., Mörgelin, M., Gustafsson, E., Bengtsson, E., Lindblom, K., Aszódi, A., Fässler, R., Sasaki, T., Timpl, R., et al. (2006). Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation: Implications for perlecan chondrodysplasias. *J. Biol. Chem.* 281, 33127–33139.

- Lehner, C.F., and O'Farrell, P.H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell*.
- Levayer, R., Dupont, C., and Moreno, E. (2016). Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Curr. Biol.* 26, 670–677.
- Lowell, C.A., and Mayadas, T.N. (2012). Overview-studying integrins in vivo. *Methods Mol. Biol.* 757, 369–397.
- Ma, M., Cao, X., Dai, J., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Basement Membrane Manipulation in *Drosophila* Wing Discs Affects Dpp Retention but Not Growth Mechanoregulation. *Dev. Cell* 42, 97–106.e4.
- McCall, A.S., Cummings, C.F., Bhave, G., Vanacore, R., Page-Mccaw, A., and Hudson, B.G. (2014). Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* 157, 1380–1392.
- McClure, K.D., and Schubiger, G. (2005). Developmental analysis and squamous morphogenesis of the peripodial epithelium in *Drosophila* imaginal discs. *Development* 132, 5033–5042.
- Medioni, C., and Noselli, S. (2005). Dynamics of the basement membrane in invasive epithelial clusters in *Drosophila*. *Development* 132, 3069–3077.
- Melrose, J., Roughley, P., Knox, S., Smith, S., Lord, M., and Whitelock, J. (2006). The structure, location, and function of perlecan, a prominent pericellular proteoglycan of fetal, postnatal, and mature hyaline cartilages. *J. Biol. Chem.* 281, 36905–36914.
- Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5691–5696.
- Milner, M.J., Bleasby, A.J., and Kelly, S.L. (1984). The role of the peripodial membrane of leg and wing imaginal discs of *Drosophila melanogaster* during evagination and differentiation in vitro. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 180–186.
- Misra, J.R., and Irvine, K.D. (2018). The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu. Rev. Genet.* 52, 65–87.
- Momota, R., Naito, I., Ninomiya, Y., and Ohtsuka, A. (2011). *Drosophila* type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol.* 30, 258–266.
- 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.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., and Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15050–15055.
- Morita, H., Yoshimura, A., Inui, K., Ideura, T., Watanabe, H., Wang, L., Soininen, R., and Tryggvason, K. (2005). Heparan Sulfate of Perlecan Is Involved in Glomerular Filtration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 1703–1710.

- Nusinow, D., Greenberg, L., and Hatini, V. (2008). Reciprocal roles for bowl and lines in specifying the peripodial epithelium and the disc proper of the *Drosophila* wing primordium. *Development* 135, 3031–3041.
- Okada, M., Imoto, K., Sugiyama, A., Yasuda, J., and Yamawaki, H. (2017). New insights into the role of basement membrane-derived matricryptins in the heart. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 2050–2060.
- Pallavi, S.K., and Shashidhara, L.S. (2003). Egfr/Ras pathway mediates interactions between peripodial and disc proper cells in *Drosophila* wing discs. *Development* 130, 4931–4941.
- Pandya, P., Orgaz, J.L., and Sanz-Moreno, V. (2017). Actomyosin contractility and collective migration: may the force be with you. *Curr. Opin. Cell Biol.* 48, 87–96.
- Pastor-Pareja, J.C., and Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Dev. Cell* 21, 245–256.
- Pirrotta, V. (1986). Cloning *Drosophila* genes.
- Rauskolb, C., Sun, S., Sun, G., Pan, Y., and Irvine, K.D. (2014). Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell* 158, 143–156.
- Robb, J.A. (1969). Maintenance of imaginal discs of *Drosophila melanogaster* in chemically defined media. *J. Cell Biol.* 41, 876–885.
- Rodenfels, J., Lavrynenko, O., Ayciriex, S., Sampaio, J.L., Carvalho, M., Shevchenko, A., and Eaton, S. (2014). Production of systemically circulating Hedgehog by the intestine couples nutrition to growth and development. *Genes Dev.* 28, 2636–2651.
- Rossi, M., Morita, H., Sormunen, R., Airene, S., Kreivi, M., Wang, L., Fukai, N., Olsen, B.R., Tryggvason, K., Soininen, R., et al. (2003). Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. *EMBO J.* 22, 236–245.
- Schneider, M., Khalil, A.A., Poulton, J., Castillejo-Lopez, C., Egger-Adam, D., Wodarz, A., Deng, W.-M., and Baumgartner, S. (2006). Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the *Drosophila* follicular epithelium to maintain epithelial organization. *Development* 133, 3805–3815.
- Sedlak, B.J., Manzo, R., and Stevens, M. (1984). Localized cell death in *Drosophila* imaginal wing disc epithelium caused by the mutation apterous-blot. *Dev. Biol.* 104, 489–496.
- Sher, I., Zisman-Rozen, S., Eliahu, L., Whitelock, J.M., Maas-Szabowski, N., Yamada, Y., Breitkreutz, D., Fusenig, N.E., Arikawa-Hirasawa, E., Iozzo, R. V., et al. (2006). Targeting Perlecan in Human Keratinocytes Reveals Novel Roles for Perlecan in Epidermal Formation. *J. Biol. Chem.* 281, 5178–5187.
- Sui, L., Alt, S., Weigert, M., Dye, N., Eaton, S., Jug, F., Myers, E.W., Jülicher, F., Salbreux, G., and Dahmann, C. (2018). Differential lateral and basal tension drive folding of *Drosophila* wing discs through two distinct mechanisms. *Nat. Commun.* 9, 4620.
- Talts, J.F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R. (1999). Binding of the G domains of laminin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains and perlecan to heparin, sulfatides, α -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* 18, 863–870.

- Tang, W., Wang, D., and Shen, J. (2016). Asymmetric distribution of Spalt in *Drosophila* wing squamous and columnar epithelia ensures correct cell morphogenesis. *Sci. Rep.* 6, 1–9.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U., and Jäckle, H. (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Dyn.* 224, 403–412.
- Wang, X., Harris, R.E., Bayston, L.J., and Ashe, H.L. (2008). Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* 455, 72–77.
- Warren, C.R., Kassir, E., Spurlin, J., Martinez, J., Putnam, N.H., and Farach-Carson, M.C. (2015). Evolution of the Perlecan/HSPG2 gene and its activation in regenerating *Nematostella vectensis*. *PLoS One* 10, 1–14.
- Wolfstetter, G., Shirinian, M., Stute, C., Grabbe, C., Hummel, T., Baumgartner, S., Palmer, R.H., and Holz, A. (2009). Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm. *Mech. Dev.* 126, 721–736.
- Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223–1237.
- You, J., Zhang, Y., Li, Z., Lou, Z., Jin, L., and Lin, X. (2014). *Drosophila* Perlecan Regulates Intestinal Stem Cell Activity via Cell-Matrix Attachment. *Stem Cell Reports* 2, 761–769.
- Yurchenco, P.D. (2015). Integrating Activities of Laminins that Drive Basement Membrane Assembly and Function. *Curr. Top. Membr.* 76, 1–30.
- Yurchenco, P.D., and Ruben, G.C. (1987). Basement membrane structure in situ: Evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J. Cell Biol.* 105, 2559–2568.
- Zang, Y., Wan, M., Liu, M., Ke, H., Ma, S., Liu, L.P., Ni, J.Q., and Pastor-Pareja, J.C. (2015). Plasma membrane overgrowth causes fibrotic collagen accumulation and immune activation in *Drosophila* adipocytes. *Elife* 4, 1–23.

II. Article n°2 :

Préambule

Alors que le premier article s'attardait sur le rôle mécanique du Pcan et de la MB dans la morphogénèse de l'ES du disque imaginal d'aile, le deuxième article nous emmène de l'autre côté de la lumière, dans l'ECol de la poche... Mais pour quelles raisons, me demanderez-vous !

D'une part, il a été démontré biochimiquement que Pcan interagissait avec de nombreux morphogènes *in vitro* soit via ses chaînes SH soit via son cœur protéique (Datta et al., 2006a; DeCarlo et al., 2012; Farach-Carson et al., 2014). D'autre part, des investigations *in vivo* menées sur des organismes modèles invertébrés ont mis en évidence des interactions génétiques entre Pcan et ces mêmes morphogènes. En particulier, au cours du développement de *Drosophila melanogaster*, Pcan affecte les voies de signalisation liées à Hh (Lindner et al., 2007; Park et al., 2003), Wg (Kamimura et al., 2013) et Dpp (Herranz et al., 2014) dans différents contextes tissulaires. Il semblerait qu'il agisse sur la distribution extracellulaire des morphogènes, si l'on en croit les travaux publiés sur Wg dans la jonction neuromusculaire (Kamimura et al., 2013). Cependant, le mécanisme par lequel Pcan régule l'activité de ces voies est loin d'être élucidé. Ce mécanisme est susceptible de différer selon le morphogène considéré, l'interaction avec Pcan pouvant dépendre soit des chaînes SH soit du cœur protéique. En outre, différentes isoformes ont été prédites pour Pcan chez de nombreux organismes, ce qui rajoute un degré de complexité. Le rôle de ces isoformes dans l'interaction entre Pcan et les morphogènes est totalement inconnu. Chez *D.melanogaster*, il existe des formes dont la synthèse repose sur l'utilisation de deux promoteurs alternatifs (Bonche, Chessel et al., en préparation). La régulation de ces promoteurs reste à découvrir. Chez l'humain, le promoteur de *pcan* est directement contrôlé par la voie TGF- β (Iozzo et al., 1997). De plus, il a été prouvé chez le poisson-zèbre que la voie liée au morphogène Hh était capable de contrôler *in vivo* la transcription de certains composants des MBs durant le développement (Guillon et al., 2016; Pickering et al., 2017). Par conséquent, en utilisant le disque imaginal d'aile, tube à essai *in vivo* reconnu à la fois dans l'étude des morphogènes ET des MBs, nous avons voulu (1) caractériser les isoformes du Pcan (2) initier le déchiffrement du mécanisme par lequel ces isoformes régulent l'activité des morphogènes et (3) voir si les morphogènes contrôlaient la production des isoformes du Pcan. En résumé, nous voulions établir l'existence d'une boucle de régulation entre la MB et les morphogènes.

NB : Dans le premier article, nous avons établi que le Pcan déposé dans la MB du disque imaginal d'aile avait deux sources distinctes : le disque lui-même et le corps gras. Cependant, nous avons très récemment démontré qu'il existe une troisième source : l'intestin moyen. Ce résultat est arrivé très tardivement et de manière « inopinée » pendant que je rédigeais ce manuscrit. Ainsi, le deuxième article,

qui adresse la question de l'interaction Pcan/morphogènes *in vivo*, partait du postulat initial de deux sources : le disque lui-même et le corps gras... Il va sans dire que je ne pouvais pas repasser par la case « expérimentation » pour mettre à jour les résultats concernant cette deuxième partie ! Aussi, il a été décidé de conserver le postulat initial des deux sources afin de simplifier la logique de la démonstration. Je vous rassure : à la minute (ou presque !) ou je quitterai mon clavier, je me ruerai à la paillasse pour « corriger le tir ». La version finale contiendra donc les trois sources ! Pour finir, même si les résultats sont présentés sous forme d'un manuscrit, la discussion de ce second article n'est pas une version finale destinée à la publication. Il s'agit plutôt d'une version orientée pour vous, membres de mon jury de thèse.

Perlecan and Dpp interact in a feedback loop in the *Drosophila* wing imaginal disc

Raphaël Bonche¹, Prune Smolen¹, Laurence Staccini-Lavenant¹, Aline Chessel¹, Sandrine Pizette^{1,3}
and Pascal Théron^{1,3}

¹Institute of Biology Valrose - iBV, CNRS UMR7277, Inserm U1091, Université Côte d'Azur,
Centre de Biochimie, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

³Corresponding author (email: pizette@unice.fr)

Key words: basement membrane, Perlecan, Dpp, feedback loop, *Drosophila*

RESULTS

1) Characterization of Perlecan's isoforms

We have shown the existence of Pcan's isoforms whose production rely on the use of two alternative Transcription Start Site ("TSS", Fig 1A, (Bonche, Chessel et al., in preparation)). The use of the upstream-most TSS gives rise to transcripts possessing exons 1 to 9 linked to exon 13 and then the remainder of the *pcan*'s exons (Fig 1A', left side). The exons 3 to 9 encode a signal peptide followed by a *bona fide* Domain I ("DI") (Bonche, Chessel et al., in preparation). The resulting protein therefore has five domains and carries three binding sites for Heparan Sulfate (HS) chains on DI (Fig 1A', right side). This isoform will be subsequently referred to as Pcan^{DI}. The use of the second TSS leads to the production of transcripts possessing exons 10 and 11 linked to exon 13 and the remainder of *pcan*'s exons (Fig 1A'', left side) (Bonche, Chessel et al., in preparation). As exon 11 encodes a signal peptide, the resulting protein exhibits four domains (two to five) and lacks the HS chains linked to DI (Fig 1A'', right side). This isoform is referred to as Pcan^{NoDI}.

To assess the abundance of each of these isoforms in the tissues that produce the Pcan present in the wing imaginal disc (Bonche, Chessel et al., in preparation) (Zang et al., 2015), we extracted RNA from wandering third instar isolated wing imaginal discs or fat bodies. RT-qPCR was then performed on these samples using isoform-specific sets of primers and a set of primer allowing amplification of exon 36, an exon common to both isoforms (Fig S1A). We found that the *pcan* RNA level, all isoforms included, was about 5 fold higher in the fat body compared to the wing disc (Fig 1B, *Domain III*). *pcan*^{DI} RNA level was also 5 fold higher in the fat body compared to the wing disc (Fig 1B, *Domain I*), whereas *pcan*^{NoDI} RNA level was 2 to 3.5 fold higher in the wing disc compared to the fat body (Fig 1B, *No Domain I*). We also analysed this data in order to get the proportion of each isoform in this two tissues as described in (Vidal-Petiot et al., 2012). We found that *pcan*^{DI} isoforms are highly predominant in both tissues (98.5% in fat body and 86% in wing disc, fig 1B'), even though *pcan*^{NoDI} isoforms are substantially enriched in the wing disc. Taken together, these data uncover a tissue-specific regulation of *pcan* isoforms at the transcriptional level and/or mRNA stability.

We next addressed the spatial distribution of each class of isoforms in the wing imaginal disc pouch and the fat body. We thereby generated isoform-specific riboprobes and performed RNA *in situ* hybridization on *wt* tissues. Two riboprobes were synthesized, one detecting all *pcan* RNA isoforms (*pcan*^{DIII} probe) (Friedrich et al., 2000) and the second detecting only *pcan*^{DI} RNAs (Fig. S1A). It was not possible to detect *pcan*^{NoDI} RNA isoforms as the length of the *pcan*^{NoDI} specific sequence (200bp) did not allow us to synthesize a conventional probe. In addition, other methods such as Locked Nucleic Acid (Darnell et al., 2010), normally used to detect small RNAs, failed. Consequently, we compared the

pattern of the transcripts obtained with the *pcan^{DI}* and *pcan^{DIII}* probes and used these data to deduce the pattern of *pcan^{NoDI}* isoform by subtracting *pcan^{DI}* expression domain from *pcan^{DIII}* pattern.

With the *pcan^{DIII}* probe, *pcan* RNA was detected in five areas of the wing disc pouch: the prospective wing costa (referred to as “costa”, arrowhead in Fig 1C) and four areas referred to as *pcan* expression quadrants (Bonche, Chessel et al., in preparation) (arrows in Fig 1C). Surprisingly, the *pcan^{DI}* RNA probe revealed that *pcan^{DI}* RNA is only expressed in the costa (Fig 1C, arrowhead), therefore implying that *pcan* expression in the quadrants solely corresponds to *pcan^{NoDI}* RNA. However, the lack of a specific *pcan^{NoDI}* probe prevented us from knowing whether *pcan^{NoDI}* is as well expressed in the costa. In the fat body, both *pcan^{DI}* and *pcan^{DIII}* probes showed a ubiquitous expression (Fig 1C’), such that we could not conclude about *pcan^{NoDI}* RNA expression pattern in this tissue. Nevertheless, since very low level of *pcan^{NoDI}* RNA was detected by RT-qPCR, this isoform seems to be most likely absent from fat body.

Overall, these results indicate that *pcan* RNA expression is regulated in an isoform-specific manner, not only quantitatively (Fig 1B) but also qualitatively (Fig 1C). Indeed, there is a spatial regulation in the wing disc pouch since, at least in the centre of this tissue, the expression of *pcan^{DI}* and *pcan^{NoDI}* is mutually exclusive. This specific regulation thus suggests that the two classes of isoforms fulfil different functions in wing disc.

To complete the study of the Pcan’s isoforms expression pattern, we analysed Pcan protein distribution in the wing imaginal disc pouch and the fat body. To recognize both Pcan^{DI} and Pcan^{NoDI} isoforms, we used an antibody raised against Domain V (Friedrich et al., 2000) (Fig S1A). It should be noted that *pcan* isoforms devoid of domain V are predicted in Flybase. Nonetheless, because in the disc anti-Domain V antibody faithfully reproduces pattern of *Domain III* RNA *in situ* hybridization (see below), we are confident that this antibody reveals isoforms with and without Domain I in this tissue. In order to specifically detect Pcan^{DI} protein, we generated an antibody that recognizes Domain I (Fig S1A and S1B). An antibody recognizing Pcan^{NoDI} protein could not be produced as the only coding exon specific to this isoform, exon 11, codes for a signal peptide.

Therefore, we compared proteins patterns obtained with antibodies against Pcan^{DI} and Pcan^{DV}. Staining of Pcan^{DI} and Pcan^{DV} showed that Pcan proteins pattern in the wing disc pouch follows pattern of *pcan* RNA expression. The wing costa is labelled by both antibodies while the four quadrants are highlighted with the antibody against Pcan^{DV} but not by anti-Pcan^{DI} (Fig 1D, arrowhead and arrows). This confirms that the quadrant pattern is specific to the Pcan^{NoDI} isoform. Hence, we propose that subsequent to mRNA translation, Pcan^{DI} and Pcan^{NoDI} are secreted and directly incorporated into the portion of the BM directly underlying their respective sources, the costa and quadrants.

The continuous layer surrounding the wing imaginal disc, which was demonstrated to have a non-autonomous origin (Bonche, Chessel et al., in preparation), is stained by both antibodies (Fig 1D). This result shows that part of the Pcan secreted by the fat body and deposited in the BM of the wing imaginal disc is the Pcan^{DI} isoform. Again, given that more than 98% of the Pcan produced by the fat body correspond to *pcan*^{DI} (Fig 1B'), it is highly likely that this layer of Pcan is mostly composed of the Pcan^{DI} isoform.

In the fat body, where *pcan* expression is ubiquitous, the Pcan^{DV} antibody strongly labels the BM and also intercellular junctions called CIVIC (Dai et al., 2017) (Fig 1D'). Intriguingly, Pcan^{DI} antibody labels the CIVICs to a higher extent than the Pcan^{DV} antibody but barely stains the BM and rather, seems to accumulate intracellularly in close proximity to the BM (Fig 1D'). It thus appears that the BM of the fat body predominantly contains Pcan^{NoDI} isoforms, whereas CIVIC have at least Pcan^{DI} isoforms.

To summarize, these results demonstrate that the expression pattern of *pcan* isoforms is tightly regulated in the wing disc pouch. We next sought to identify the factor(s) which regulate these patterns in this tissue.

2) Dpp regulates the RNA level of Perlecan's isoforms

In the wing imaginal disc, several signalling pathways are known to be involved in transcriptional regulation. Actions of morphogens such as Wingless (Wg), Hedgehog (Hh) and Decapentaplegic (Dpp) have been extensively described in the wing disc pouch (Baena-Lopez et al., 2012; Hartl and Scott, 2014; Restrepo et al., 2014). Comparing expression patterns of these morphogens and the range of their signaling to *pcan* expression pattern in this tissue led us to consider that morphogens could regulate *pcan* transcription. In particular, Dpp and Wg production sites seem to be coherent with this regulation (see Fig 2A for Dpp production site). We decided to focus our analysis on the Dpp pathway.

We first performed RT-qPCR using RNA extracted from the whole wing imaginal disc (Fig 2B) or from the wing disc pouch only (Fig 2B'), upon Dpp depletion by interference RNA (RNAi). We then quantified the amount of *pcan*^{DI} RNA and *pcan*^{NoDI} RNA. Whichever the source of the RNA, the reduction in Dpp signalling led to an increase of *pcan*^{DI} RNA level, whereas *pcan*^{NoDI} RNA was decreased. However, these changes were amplified when the quantification was performed on RNA from the wing disc pouch only. Indeed, in this condition, the *pcan* RNA produced by the ad epithelial cells from the notum (see asterisk in Fig 1C) that may not be regulated by Dpp is removed from the analysis. These results show that Dpp, whether directly or indirectly, regulates positively and negatively the transcription or the stability of, respectively, the *pcan*^{NoDI} and the *pcan*^{DI} RNAs.

In a second step, we genetically manipulated the activity of Dpp and that of direct components of its pathway in the wing disc pouch to see how these treatments modified the spatial pattern of *pcan* expression. For this, we systematically analyzed *pcan^{DI}* and *pcan^{DIII}* RNAs by *in situ* hybridization in different genetic backgrounds for Dpp signaling. The efficiency of the RNAi against Dpp and its signalling components was assessed with the analysis of the resulting adult wing phenotypes (except for Dpp overexpression that was lethal, Fig S2A). In addition, Pcan protein localisation was also analysed to confirm the modification of the pattern of *pcan* RNAs (Fig S2C).

First, depletion of Dpp in the wing disc pouch led to an extension or ectopic expression of *pcan^{DI}* RNA expression area from the costa toward the medial part of wing disc pouch in the anterior compartment (Fig 2C', top panel). Second, *pcan^{DIII}* RNA showing the same distribution (Fig 2C', lower panel), we thereby deduce that *pcan^{NoDI}* RNA was no longer present in the posterior compartment. We hypothesize that the two remaining anterior sites of expression were in fact devoid of *pcan^{NoDI}* RNA since in the same conditions this isoform was barely detected by RT-qPCR performed with wing disc pouch RNA.

Therefore, we conclude that *pcan^{DI}* is transcriptionally repressed by the Dpp pathway, or its RNA degraded, at least in the medial part of the anterior compartment, whereas *pcan^{NoDI}* transcription is activated by this pathway, or its RNA stabilized, in the medial part of likely both compartments.

To confirm these results, we overexpressed Dpp throughout the wing disc pouch or depleted the Dpp pathway effector, Mother Against Dpp (Mad). In Dpp overexpression condition, expression of *pcan^{DI}* was totally abolished (Fig 2C'', top panel), whereas *pcan^{NoDI}* RNA and protein are extended throughout the wing disc pouch (Fig 2C'', bottom panel, and Fig. S2). Upon Mad depletion in the wing disc pouch, *pcan^{DI}* and *pcan^{DIII}* RNAs and proteins displayed the same distributions as those observed upon Dpp depletion, ascertaining the involvement of the Dpp pathway in the control of the level of *pcan^{DI}* and *pcan^{NoDI}* RNAs (Fig 2C''' and S2C).

Since Dpp or Mad depletion leads to the inactivation of the pathway and, thereby, to Brinker (Brk) ectopic expression in the medial part of the wing disc pouch (Barrio and Milán, 2017; Martin, 2004; Minami et al., 1999), we wondered if this factor is involved in *pcan* expression regulation. Indeed, Brinker being a transcriptional repressor, we asked whether it could repress *pcan^{NoDI}* expression in the lateral regions of the wing disc pouch and *pcan^{DI}* expression in the lateral part of the anterior compartment. It turned out that Brk depletion throughout the wing pouch led to normal RNA and protein distributions for both isoforms (Fig S2B and S2C). Therefore, Dpp-dependent regulation of *pcan* expression is not acting through Brk.

Altogether, these data show that the Dpp pathway directly or indirectly differentially regulates the RNA levels of *pcan* isoforms in the wing disc pouch, positively for *pcan^{NoDI}* and negatively for *pcan^{DI}*. Although we cannot at the moment distinguish between transcription versus RNA stability, we however favour control of transcription rather than control of mRNA stability (see discussion).

3) **Perlecan is an inhibitor of the Dpp pathway**

Vertebrate Pcan has been shown *in vitro* to bind to a number of morphogens including Dpp (DeCarlo et al., 2012) and *in vivo* regulation of a Dpp ortholog by Pcan has been reported in *C.elegans* (Merz et al., 2003). In *drosophila*, genetic interactions in the wing imaginal disc indicate that Pcan potentiates Dpp signalling in notum muscle precursors in a model of EGFR-driven tumour (Herranz et al., 2014). In addition, the BM of the wing imaginal disc pouch has been recently implicated in Dpp retention (Ma et al., 2017). These data suggest that Pcan could bind Dpp and control its activity in the pouch leading potentially to the establishment of a feedback loop between Pcan and Dpp in this tissue.

To test whether Pcan regulates the Dpp pathway in the wing disc pouch, we used a hypomorphic allele of *pcan*, *J0271#49* which affects the production of both Pcan^{DI} and Pcan^{NoDI} isoforms (Bonche, Chessel et al., in preparation). However, because the *J0271#49* wing disc pouch displays a reduced surface area (Fig S3A), we first analysed apical and basal cell areas in order to know whether we could directly compare the staining intensity profiles of the Dpp pathway components in wild type versus mutant genotypes. Upon analysis of the cell size within the Dpp signalling domain we surprisingly found that, despite a reduced general size of the *J0271#49* tissue, apical and basal cell areas remained very comparable to wt (Fig 3A-A'' and Fig S3B). Indeed, although significant, differences between *wt* and *J0271#49* conditions were minor. These small variations could reflect Pcan function in tissue mechanics, as proposed in (Pastor-Pareja and Xu, 2011). We then concluded that fluorescence intensity profiles of Dpp signalling components could be examined without tissue scaling in the medial region of wing disc pouch. In contrast, we decided to normalize the tissue size for fluorescence intensity plotting in the lateral region of the pouch, since in this area ectopic folding changed the overall tissue size in *J0271#49*, which made cell surface analysis complicated (Bonche, Chessel et al., in preparation).

We then assessed the level of Dpp pathway activation in *J0271#49* Pcan mutant. We first stained discs for phosphorylated Mad (pMad), the activated form of the Dpp pathway effector (Fig 3B). The pMad gradient fluorescence intensity was strongly increased in the mutant condition by 3 to 4 fold. The anterior and posterior slopes of the gradient of pMad intensity were steeper toward the lateral regions. Accordingly, the staining for Spalt (Sal), which is activated by Dpp signalling, was also increased (Fig 3B'). Moreover, the staining for Brk, which is repressed by Dpp signalling, was decreased (Fig 3B'').

The increase of pMad and Sal levels and the decrease of Brk level brought us to the conclusion that Pcan, in *wt* condition, represses Dpp signalling.

We next asked whether Pcan was affecting Dpp signalling by increasing the production of Dpp in the wing disc. To this end, we measured the expression of *dpp* using a *dpp-lacZ* reporter that monitors *dpp* transcription. Not only *dpp* expression was not increased in the *J0271#49* condition, but it was slightly decreased (Fig S3C). Therefore, the increase of pMad observed in *J0271#49* cannot be explained by an increase in *dpp* expression.

Pcan being a secreted HSPG, we explored the possibility that it could alter the extracellular Dpp distribution. As there is no available antibody specific to the mature secreted form of Dpp, we decided to use an endogenously HA-tagged version of Dpp, DppHA (Bosch et al., 2017), and stained for HA epitopes. In agreement with the decrease in *dpp* transcription that we observed above, a conventional staining revealed that DppHA level was reduced in the *J0271#49* condition (Fig S3D). DppHA was distributed in a shallow gradient along the apico-basal axis of the pouch cells with an accumulation toward the apical tip of the cells in both *wt* and *J0271#49* mutant (Fig S3D'). Since these results cannot explain the increase in Dpp signalling in the *pcan* mutant condition, we turned to a protocol allowing the specific detection of extracellular epitopes (Strigini and Cohen, 2000). We found in the *wt* that extracellular DppHA was mostly present within the lumen of the wing disc (Fig 3C) in agreement with (Gibson et al., 2002). Strikingly, in *J0271#49* mutant discs, we found an increased accumulation of the DppHA in the lumen (Fig 3C). In addition, the extracellular DppHA was also distributed in an apico-basal gradient in the *wt* wing pouch cells, with a bias toward the apical side. Unfortunately, due to an alteration of the disc topology likely due to the extracellular staining protocol, we could not properly quantify the extracellular DppHA gradient along the apico-basal axis of cells in the *J0271#49* mutant discs (Fig S3E). To summarize, our data demonstrate that Pcan is a negative regulator of the Dpp pathway and that it controls the level of extracellular Dpp in the extracellular luminal space.

4) Perlecan's isoforms have different effects on the Dpp pathway

Since we established that Pcan is an antagonist of the Dpp pathway in the wing disc and that both Pcan^{DI} and Pcan^{NoDI} are present in this tissue, we sought to identify the isoform responsible for this regulation. To tackle this, we first depleted Pcan in a non-isoform specific manner within the two tissues that are the source for the wing imaginal disc Pcan (i.e wing imaginal disc itself and fat body). To do so, we expressed *RNAi* against *pcan*'s exon 36 (Fig S1A) in these tissues and checked for Dpp activity with a pMad staining. We found that depletion of Pcan from the fat body (the non-autonomous source of Pcan deposited at the wing disc BM), strongly increased the Dpp pathway activity in the wing disc

pouch (Fig 4A). We also found that depletion of the autonomous Pcan source in the wing disc increased the Dpp signalling in a much milder but statistically significant way (Fig 4A). Thus, both sources are involved in the control of Dpp signalling, but the non-autonomous sources provide a stronger input to this regulation.

Because most of the Pcan which originates from the fat body is the Pcan^{DI} isoforms, these data suggest that Pcan^{DI}, deposited throughout the wing disc BM is accountable for most of the repression on the Dpp pathway observed in the wing disc. In the wing disc pouch, however, both Pcan^{DI} and Pcan^{NoDI} being produced (see Fig 1), it is unclear which isoform is responsible for the weak autonomous repression observed. We therefore decided to identify the isoform involved in this process. We reasoned that this effect should rely on Pcan^{DI}, owing to the results obtained by depleting Pcan from the fat body. Strikingly, when we removed Pcan^{DI} only from the pouch with an isoform-specific RNAi generated in this study (Fig S1A and S4A), Dpp pathway activity was not increased, but on the opposite, slightly but significantly reduced (Fig 4B). This result means that the Pcan^{DI} produced by the costa does not repress Dpp but, on the contrary, is a weak activator of the pathway. Moreover, this implies that the Pcan^{NoDI} isoform is the one inhibiting the Dpp pathway within the wing pouch. To confirm this, we aimed at removing the expression of Pcan^{NoDI} in the quadrants. The RNAi that we engineered against this isoform being inefficient (data not shown), we used isoform-specific somatic genome engineering mediated by CRISPR/Cas9 as described in (Port and Bullock, 2016; Port et al., 2014) (Fig S1A). This resulted in a strong down-regulation of the Pcan quadrants expression (Fig S4B), and in an increase in Dpp signalling (Fig 4C). Conversely, overexpression of Pcan^{NoDI} within the wing pouch (Fig S4C) led to a slight but significant decrease in Dpp activity (Fig 4C'). Altogether, these data suggest that Pcan^{DI} from the fat body is a Dpp inhibitor, and demonstrate that Pcan^{NoDI} from the pouch contributes also to this inhibition. In contrast, Pcan^{DI} from the pouch seems to act as a Dpp pathway activator. This supports the existence of two feedback loops in the wing disc pouch between the Pcan produced autonomously in the pouch and Dpp: one in which Dpp negatively regulates *pcan^{DI}* RNA level while this isoform activates Dpp signalling, and one in which Dpp positively regulates *pcan^{NoDI}* RNA level while this isoform inhibits Dpp signalling.

5) Could Perlecan interact with Dpp to regulate the cell proliferation rate and the apico-basal elongation process

Since Dpp and Pcan interact in a feedback loop in the wing disc pouch, we wanted to unravel the function of this Dpp/Pcan loop in this tissue. As Dpp signalling is increased in the absence of Pcan, we wondered if we could observe phenotypes characteristic of a Dpp gain of function in the *J0271#49* mutant. Dpp being necessary for the wing disc growth (Barrio and Milán, 2017; Bosch et al., 2017;

Harmansa et al., 2015; Matsuda and Affolter, 2017), we checked for cell proliferation in the wing pouch of the mutant for *pcan* by counting cells and mitosis events. First, we reconstructed the wing disc pouch in 3D in *wt* and *J0271#49* conditions by labelling all its cells with GFP (Fig 5A). The pouch was then segmented according to DAPI and phospho-histone 3 staining (Fig 5A' and A''). Although the nuclei number was similar (Fig 5B), we found that the mitotic cells were uniformly distributed in both conditions but their amount was significantly lower in the *J0271#49* pouch (Fig 5B' and B''). Because of the conservation of a uniform proliferation, we concluded that Pcan is not involved in pouch Dpp mediated growth. Since we found that *pcan* mutant displays a developmental delay, we interpreted the reduction of the proliferation in this mutant as a consequence of this delay. Indeed, given that discs were analysed at the same stage but not exactly at the same timing, it is possible that the animal spends more time developing with a reduced proliferation rate in order to obtain the same number of cells in the end of the larval stages.

In addition to wing disc growth, Dpp is also responsible for the apico-basal elongation of the wing pouch cells (Gibson and Perrimon, 2005; Widmann and Dahmann, 2009a). To verify this, we first wanted to reproduce previous results concerning Dpp and pouch cells elongation. The depletion of Dpp in the wing pouch did trigger a significant decreased in pouch thickness, while the overexpression of DppGFP substantially increased pouch thickness (Fig 6A and A'). Both results are consistent with published data. We then investigated the potential participation of Pcan in this process. Interestingly, in the *J0271#49* mutant, the wing disc pouch is as thick as a pouch overexpressing DppGFP (Fig 6A and A'). To go further in this study, we hypothesized that an increase level of Pcan might induce a reverse effect. In order to overexpress Pcan in the wing pouch, we used an allele called *GSV2* (Pastor-Pareja and Xu, 2011), which allows overexpression of both *Pcan^{DI}* and *Pcan^{NoDI}* isoforms (our unpublished data). Conversely to the *pcan* mutant, Pcan overexpression resulted in wing pouches with a reduced thickness. This decrease was as strong as the one observed upon Dpp depletion (Fig 6A and A').

Next, we wanted to address whether this function of Pcan in apico-basal elongation was Dpp-dependent. Since Pcan and Dpp appear to act in opposite way in this process, we manipulated Dpp levels in different Pcan mutant contexts in order to try to restore *wt* pouch thickness. First, we attempted to deplete Dpp within the *J0271#49* pouch, but this genetic background induced early lethality, preventing us from analysing L3 wandering larvae tissues. Second, we performed the opposite experiment, i.e overexpression of Pcan and DppGFP together in the wing pouch. As a control, we overexpressed Pcan together with a cytoplasmic GFP to exclude a *Gal4/UAS* dose effect which would be independent of the DppGFP effect. In Pcan and DppGFP overexpression condition, pouch thickness remained increased to a level similar to that of the DppGFP overexpression alone (Fig 6A and A'). Thus, in our experimental settings, Pcan is not able to repress Dpp activity at a level sufficient to restore the wing pouch thickness.

In conclusion, we so far do not know in which Dpp-dependent process Pcan is implicated in the wing disc pouch.

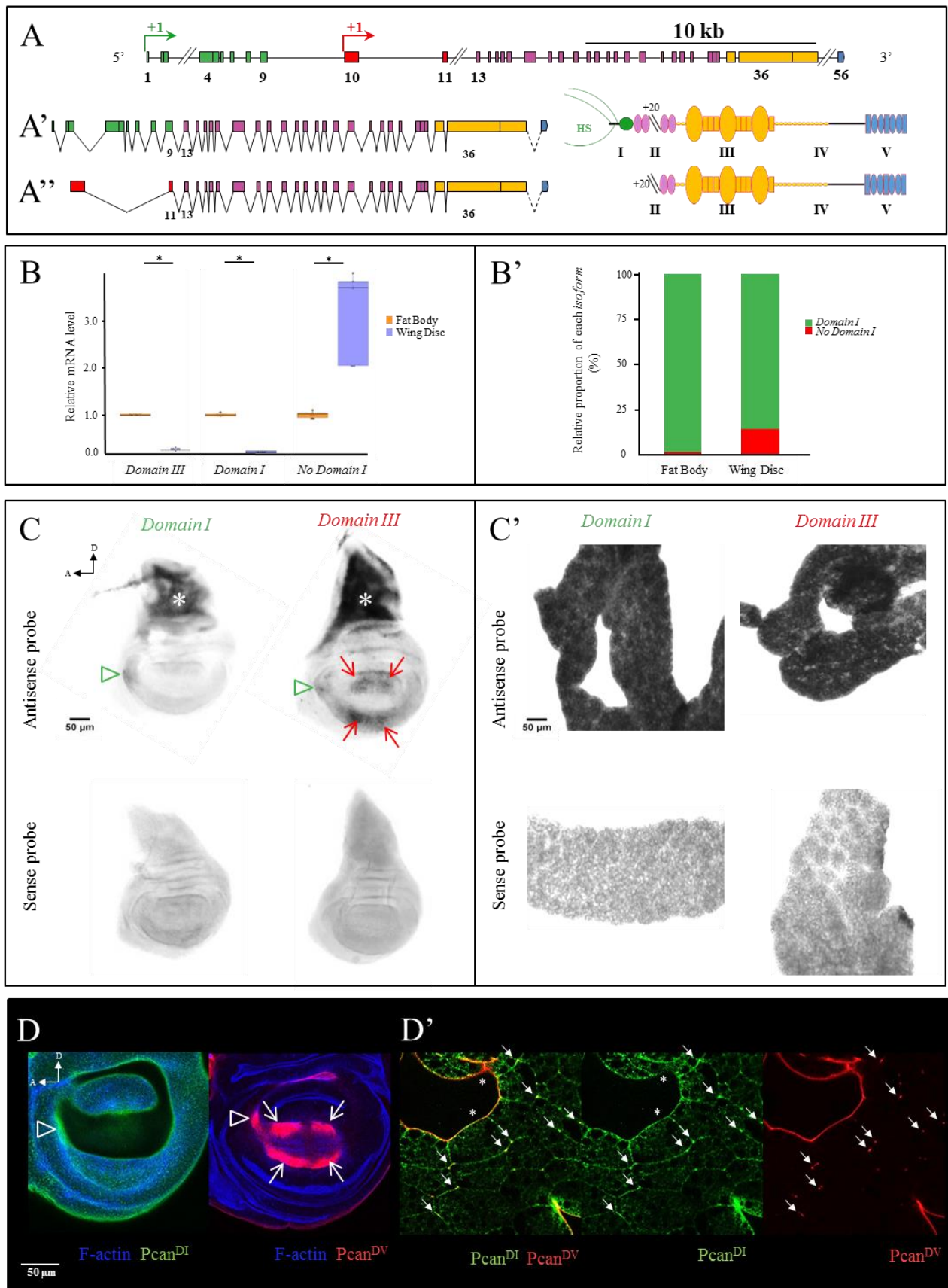


Figure 1: Characterization of Perlec an's isoforms

See next page for the legends

(A) Genomic organization of the *Drosophila pcan* locus. Rectangles represent exons and the ones relevant to this study are numbered according to Flybase (<http://flybase.org/>). The green and red arrows indicate the two alternative Transcription Start Sites (TSS). The first TSS allows the transcription of *pcan* RNA with a domain I (*pcan^{DI}*) (A' left side, *Domain I (DI)* specific exons in green). The corresponding protein (A' right side) possesses a DI carrying attachment sites for three Heparan Sulfate (HS) chains. The second TSS allows the transcription of *pcan* RNA without a domain I (A'' left side, *No Domain I (NoDI)* specific exons in red). The corresponding protein (A'' right side) is devoid of a DI and therefore HS chains attached to this domain. Pcan protein domains are numbered from I to V according to the literature. The color code identifies the different Pcan domains and is conserved between DNA, RNA and proteins. (B) Relative *pcan* mRNAs levels in fat body versus wing imaginal disc. *pcan* RNA all isoforms included (*Domain III*), *pcan^{DI}* RNA (*Domain I*) and *pcan^{NoDI}* RNA (*No Domain I*) were quantified by RT-qPCR using primers either isoform-specific or non-isoform specific (*Domain III*: exon 36, *Domain I*: exons 4 to 6, *No Domain I*: exons 11 to 13). Samples were normalized with *Dp1*. $n(\text{Fat Body}) = 6$, $n(\text{Wing Disc}) = 5$. Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $p < 0.05$: *. (B') Proportion of *pcan^{DI}* and *pcan^{NoDI}* RNA in fat body and wing imaginal disc. Data from B have been reused for this quantification using the protocol described in (Vidal-Petiot et al., 2012). (C, C') RNA *in situ* hybridization for *pcan^{DI}* isoform and all *pcan* isoforms in the wing imaginal disc (C) or the fat body (C'). (C) Green arrowheads point to an anterior transcription site for *pcan^{DI}* RNA, red arrows point to more central transcription sites referred to as « quadrants » that produce *pcan^{NoDI}* RNA. *pcan^{DI}* (*Domain I*) RNA was detected with an antisense probe directed against exons 3 to 5 and all isoforms *pcan* RNA was detected with an antisense probe directed against exon 36 (referred to as *Domain III* (Voigt et al., 2002)). Sense probes used as controls are also shown. (D) Protein patterns of Pcan^{DI} isoforms and Pcan^{DV} proteins in the wing imaginal disc. Arrowheads point to presumptive costa positive for Pcan^{DI} isoform, arrows point to the quadrants that are positive for Pcan^{NoDI} (see text). (D') Protein patterns of Pcan^{DI} isoforms and Pcan^{DV} proteins in the fat body. Solid arrows point to Pcan interstitial deposition of protein referred as CIVIC and asterisk indicate discontinuous basement membrane labelling for Pcan^{DI}. (D and D') Pcan^{DI} isoform was stained with anti-Domain I (this work) and Pcan^{DV} protein was stained with anti-Domain V (Friedrich et al., 2000). Pcan^{NoDI}: pattern deduced in D and D' by subtraction between Pcan^{DI} staining and Pcan^{DV} staining.

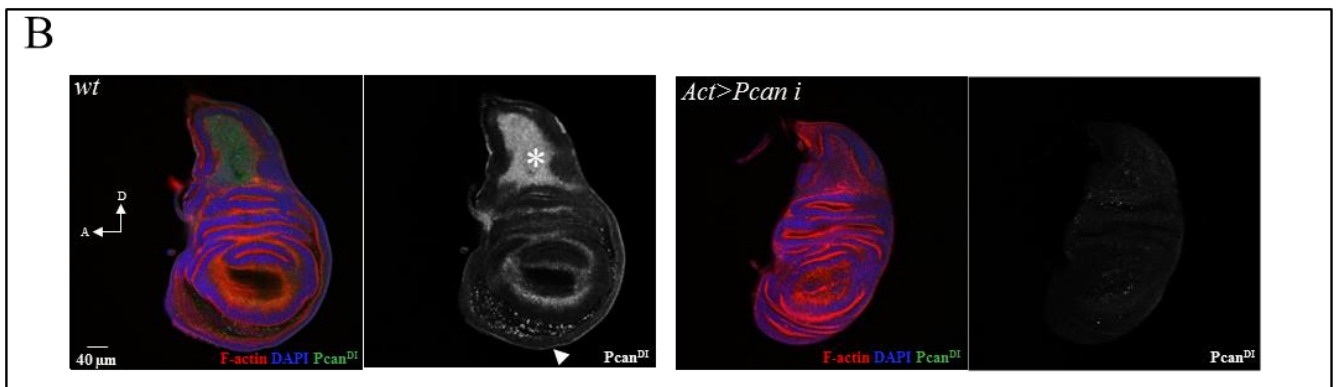
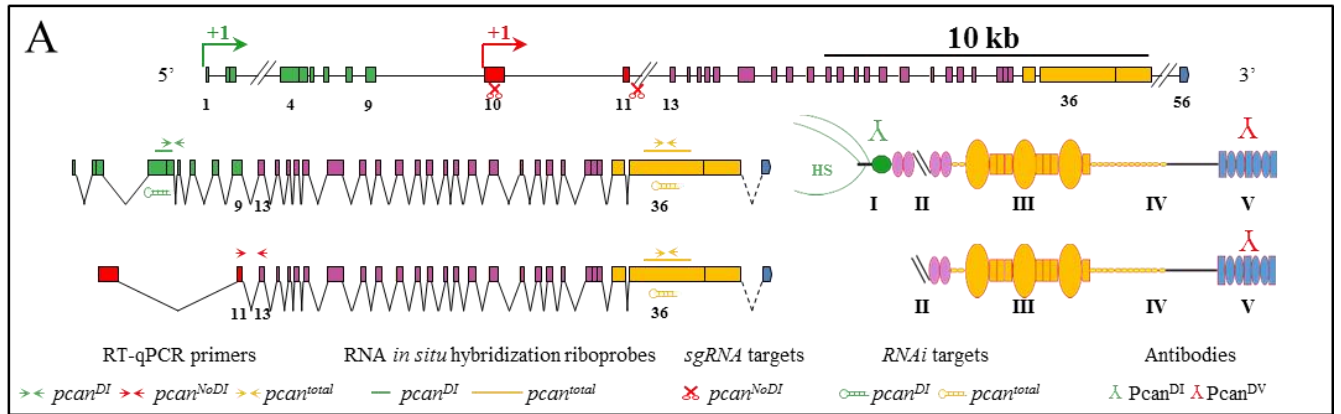


Figure S1: Pcan tools

(A) Summary of the isoforms' specific and non-specific tools used in this study. (B) Specificity of the anti-Domain I antibody generated in this study. *wt* disc (left side) and disc expressing RNAi against *pcan* ubiquitously with the *Act-GAL4* driver (right side) were stained with anti-Domain I antibody. Asterisk: adephelial cells staining in the notum region. Solid arrowhead: BM staining. These stainings were lost upon Pcan depletion (right side).

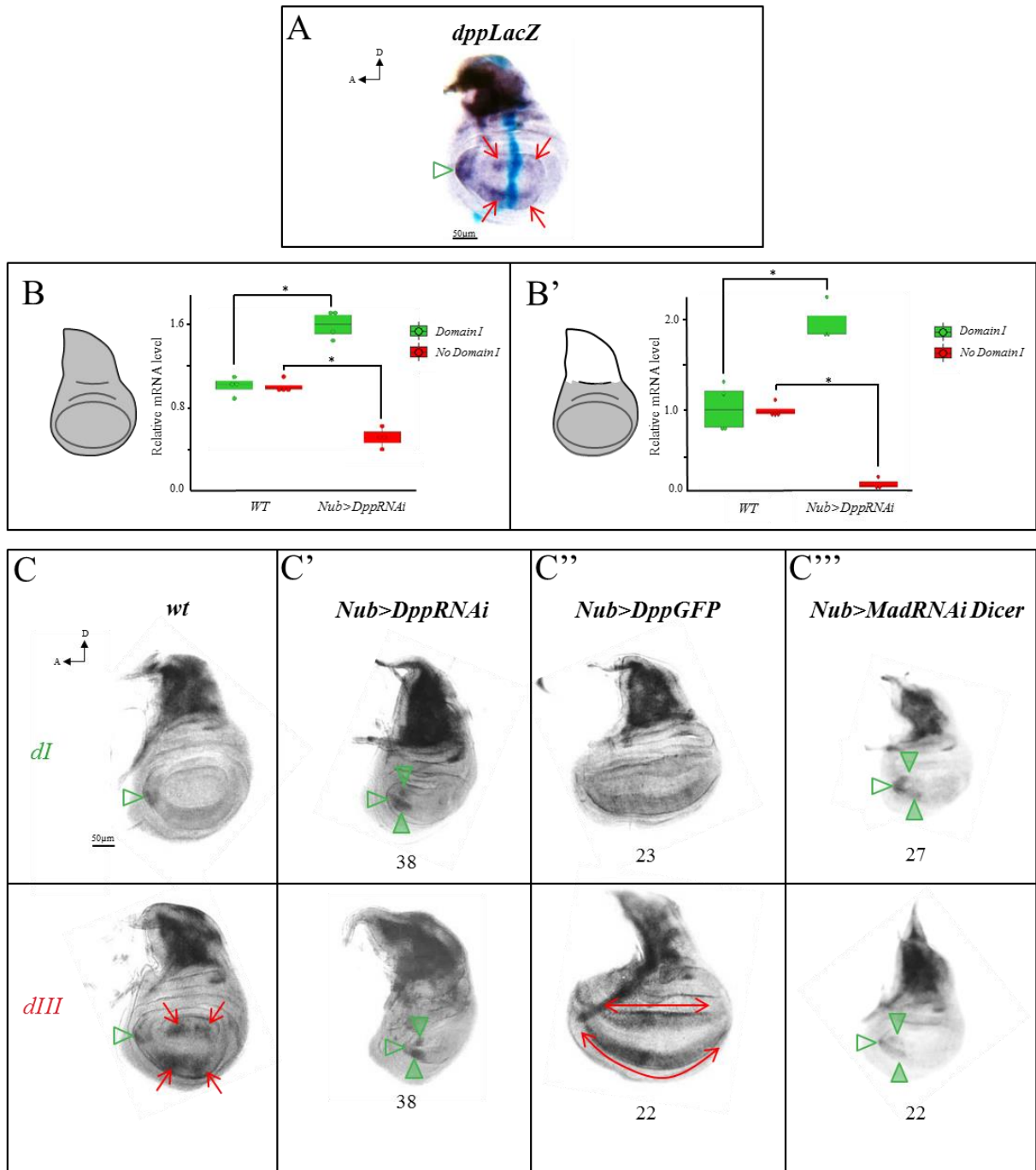


Figure 2: Dpp regulates the RNA level of Perlecan's isoforms

(A) Comparison of Dpp production site (X-Gal staining, blue) and Pcan production site (RNA *in situ* hybridization of *Domain III*, purple) in wing imaginal disc expressing *dppLacZ*. (B, B') RNA was extracted from the regions highlighted in grey on the wing imaginal disc schemes. Relative *pcانNoDI* and *pcانDI* RNA levels were quantified by RT-qPCR on at least 3 biological replicates in wt or Dpp depletion on the wing disc pouch (*Nub>DppRNAi*). Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $p < 0.05$: *. (C-C''') *pcان*'s isoforms RNA patterns upon Dpp pathway manipulation in the wing imaginal disc. Probes used for RNA *in situ* hybridization are indicated on the left in C, *dI*: probe directed against *Domain I*, *dIII*: probe directed against *Domain III*. All *RNAi* were expressed in the wing disc pouch using the *Nub-GAL4* driver. The number of samples is indicated below each condition. Note that all phenotypes were 100% penetrant. (A, C-C''') Empty green arrowheads point to *pcانDI* RNA, solid green arrowheads point to ectopic *pcانDI* RNA, red arrows point to *pcانNoDI* RNA, and double red arrows underlines the expansion of *pcانNoDI* RNA.

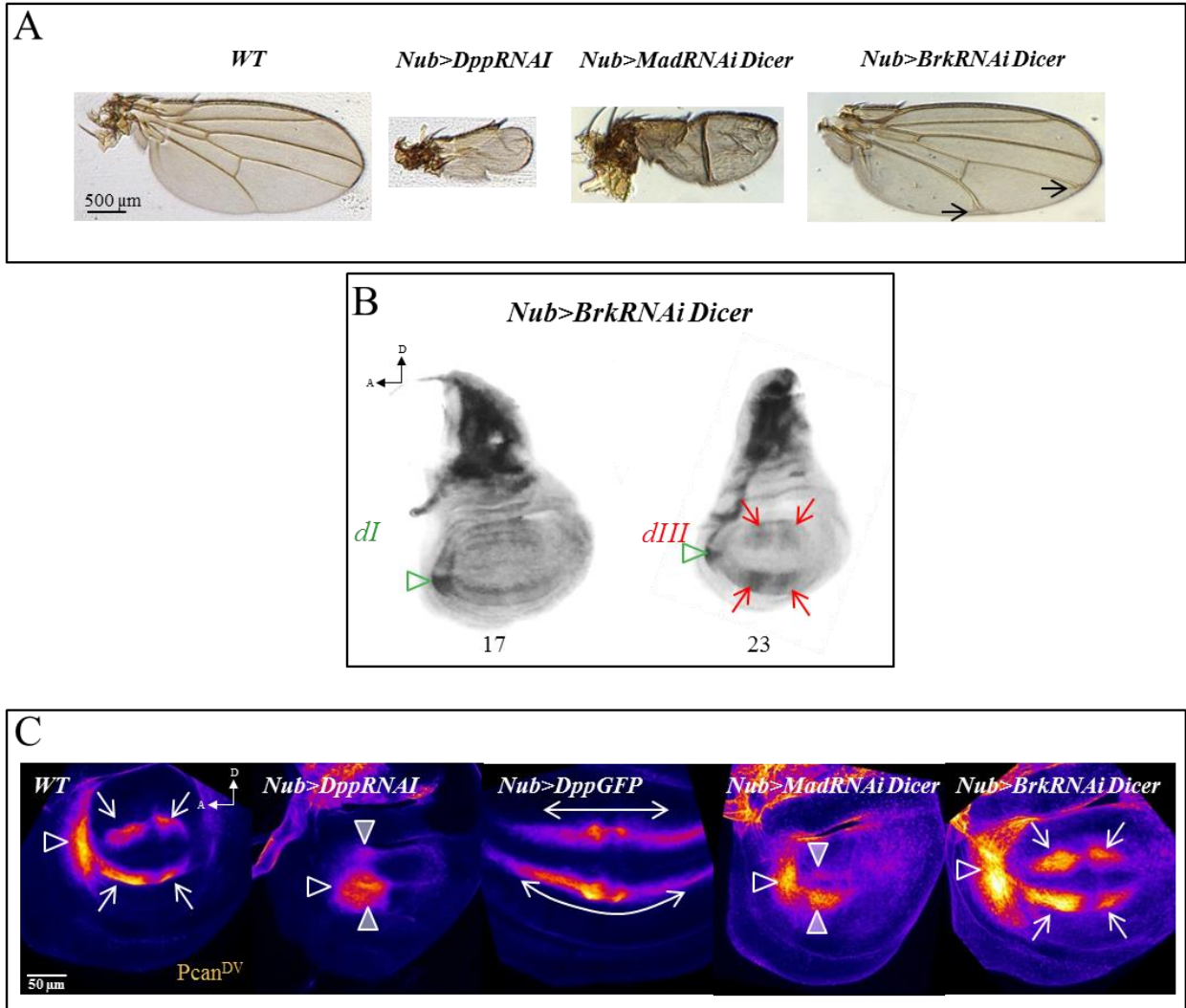


Figure S2

(A) Adult wings resulting from Dpp pathway manipulation in the wing disc pouch with *Nub-GAL4*. Black arrows indicate vein defects. (B) Depletion of *Brk* in the wing disc does not affect *pcan* RNA pattern *in situ* hybridization performed with a probe against *Domain I (dI)* or *Domain III (dIII)*. Green arrowhead points to costa expression, red arrows to quadrants expression. (C) *Pcan^{DV}* protein pattern upon Dpp pathway manipulation in the wing imaginal disc with *Nub-GAL4*. Empty white arrowheads point to *Pcan^{DI}* protein, solid white arrowheads point to ectopic deposition of *Pcan^{DI}* protein, white arrows point to *Pcan^{NoDI}* protein, and double white arrows indicate the expansion of *Pcan^{NoDI}* deposition. Images are max-intensity projections of stacks.

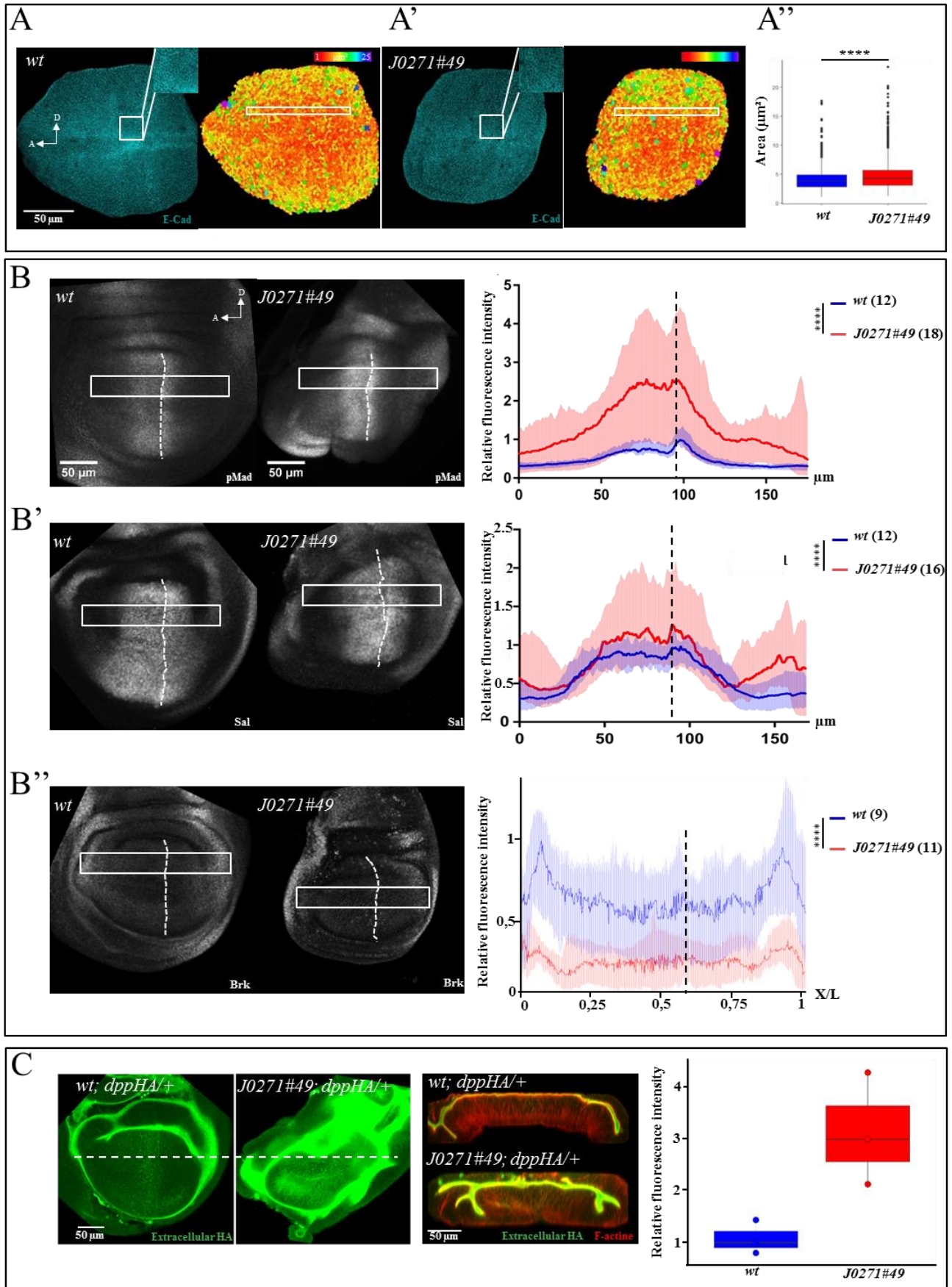


Figure 3: Perlecan is a Dpp pathway inhibitor (See next page for the legends)

(A-A'') Apical cell area measurement using Epitools. White squares indicate the region where the close-up for E-Cadherin staining is shown. White rectangles indicate the region where cell areas were plotted in A''. Images of E-Cadherin staining are max-intensity projections of apical z-stacks. Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $n(wt)=2013$ cells in 13 wing discs, $n(J0271\#49) = 1683$ cells in 16 wing discs. (B-B'') Dpp pathway overactivation in absence of Pcan. Stainings for pMad and the target genes Sal and Brk are shown. White rectangles indicate the region where fluorescence intensities were plotted. Images are sum-intensity projections of the entire wing disc pouch z-stacks. Number of samples are indicated between brackets on the right side of the graphs. Data were subjected to non-parametric paired Mann-Whitney Wilcoxon test. (A-B'') Dashed line represent the antero-posterior boundary in the pictures and the graphs. (C) Extracellular DppHA is increased in the lumen in absence of Pcan. Dashed lines represent the plane of section for the orthogonal views shown at the bottom. HA fluorescence intensity was measured on these orthogonal views. $n(wt)=3, n(J0271\#49) = 3$. (A'', B-B'') $p<0.0001$: ****.

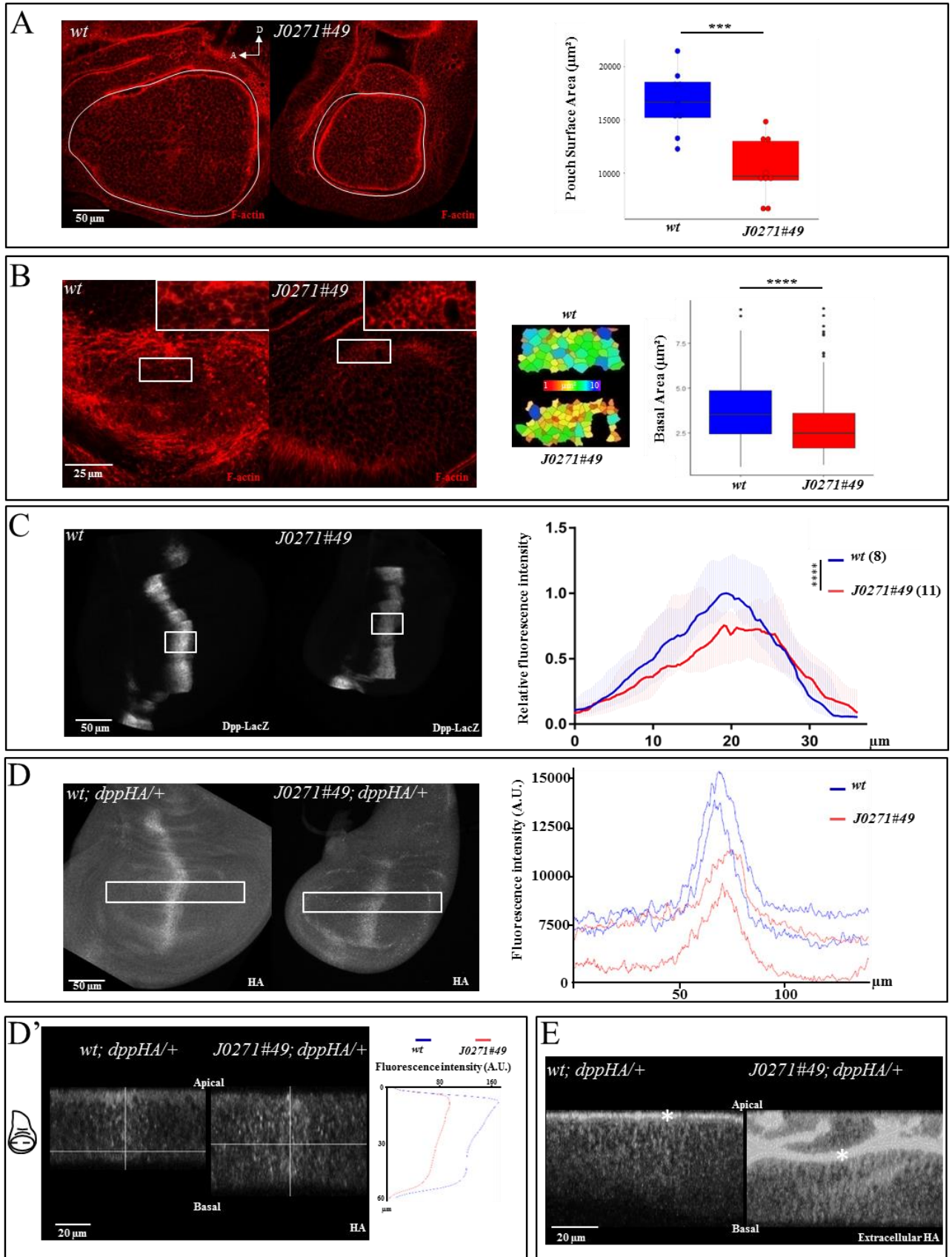


Figure S3 (See next page for the legends)

(A) Wing disc pouch surface area in absence of Pcan. Area was measured on single xyz sections according to the region of interest delimited in white. Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $n(wt) = 9$ and $n(J0271\#49) = 9$. (B) Basal cell area measurement using Epitools. White rectangles indicate the region where the close-up for F-actin staining is shown. Cell segmentation in this region is shown in the middle and the plots for the basal area is shown on the right. Images are max-intensity projections of basal z-stacks. Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $n(wt) = 345$ cells in 6 wing discs, $n(J0271\#49) = 265$ cells in 4 wing discs. (C) Dpp transcription is decreased in absence of Pcan. White rectangles indicate regions where fluorescence intensities were plotted. Images are sum-intensity projections of the entire wing disc pouch z-stacks. Number of samples are indicated between brackets on the right side of the graphs. Data were subjected to non-parametric paired Mann-Whitney Wilcoxon test. (D-D') DppHA distribution by conventional staining. (D) Images are sum-intensity projections of the entire wing disc pouch z-stacks. White rectangles indicate regions where fluorescence intensities were plotted. Each line in the graph represents one sample. There is less DppHA in the *J0271#49* mutant (D') Apico-basal distribution of DppHA. Single xzy orthogonal sections were obtained from wing discs presented in D. Z-intensity profiles were plotted using mean values. Both *wt* and *J0271#49* exhibit an apico-basal gradient with a bias toward the apical side of the cells. (E) Extracellular DppHA accumulates on the apical side. Single xzy orthogonal sections of the entire wing disc pouch z-stacks show accumulation of DppHA in the wing disc lumen but not in the basal side of both *wt* and *J0271#49*. Asterisks indicate the lumen. (A-C) $p < 0.001$: ***, $p < 0.0001$: ****.

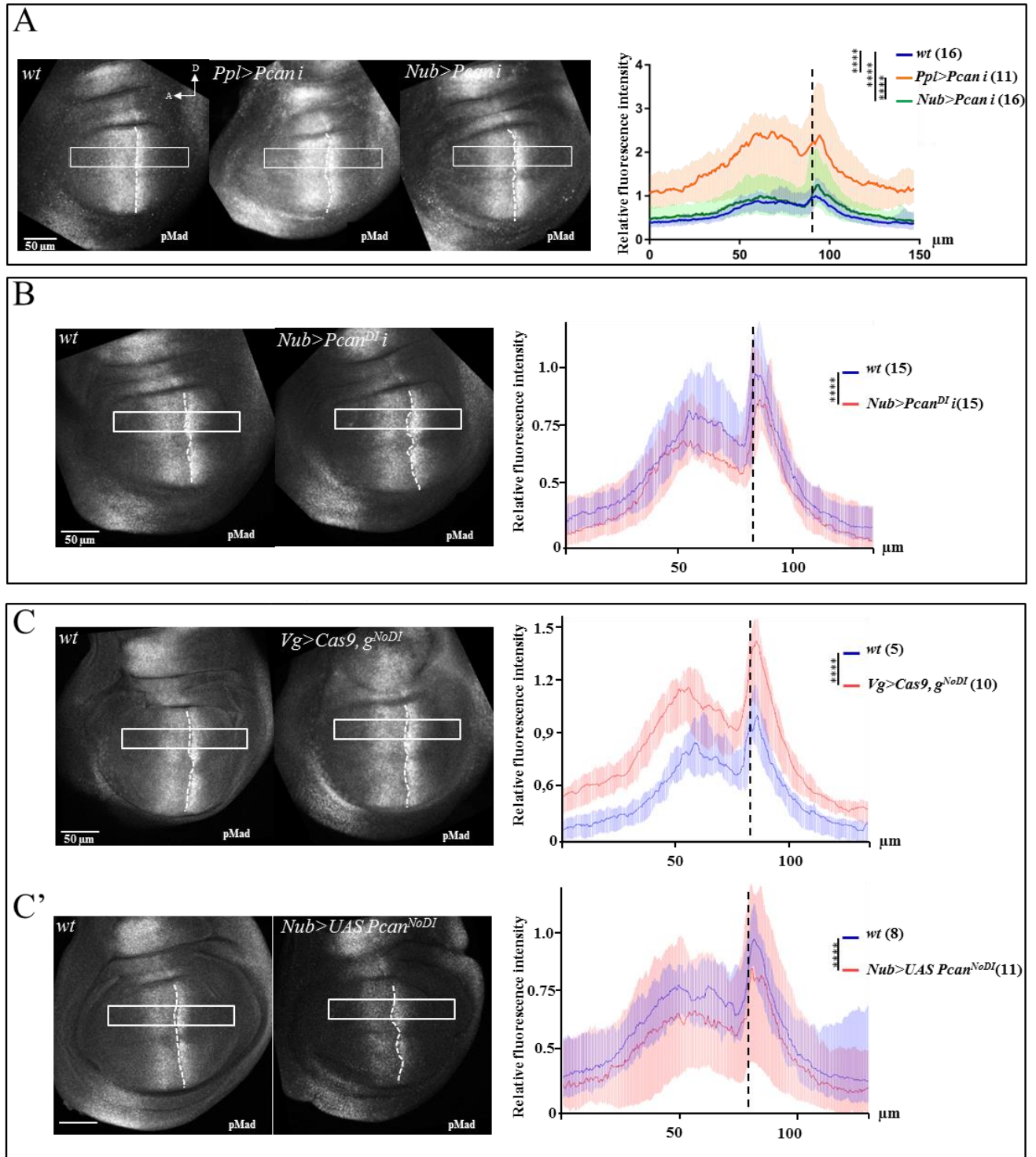


Figure 4: Perlecan's isoforms have different effects on the Dpp pathway

See next page for the legends.

(A) Dpp pathway overactivation upon tissue specific Pcan depletion. pMad staining performed on discs when fat body Pcan was depleted (*Ppl>Pcan i*) and wing disc pouch Pcan was depleted (*Nub>Pcan i*). (B) Wing disc pouch Pcan^{DI} is a weak activator of Dpp pathway. pMad staining performed on discs when costa Pcan^{DI} was depleted (*Nub>Pcan^{DI} i*). (C) Wing Disc Pouch Pcan^{NoDI} is an inhibitor of Dpp pathway. pMad staining performed on discs when Pcan^{NoDI} was depleted (*Vg>Cas9, g^{NoDI}*) and overexpressed (*Nub>UAS Pcan^{NoDI}*) in the wing disc pouch. (A-C') In all images, white rectangles indicate the region where fluorescence intensity was plotted. Images are sum-intensity projections of the entire wing disc pouch z-stacks. Dashed lines represent antero-posterior boundary in both pictures and graphs. Number of samples are indicated between brackets on the right side of the graphs. Data were subjected to non-parametric paired Mann-Whitney Wilcoxon test. (A-C') p<0.0001: ****.

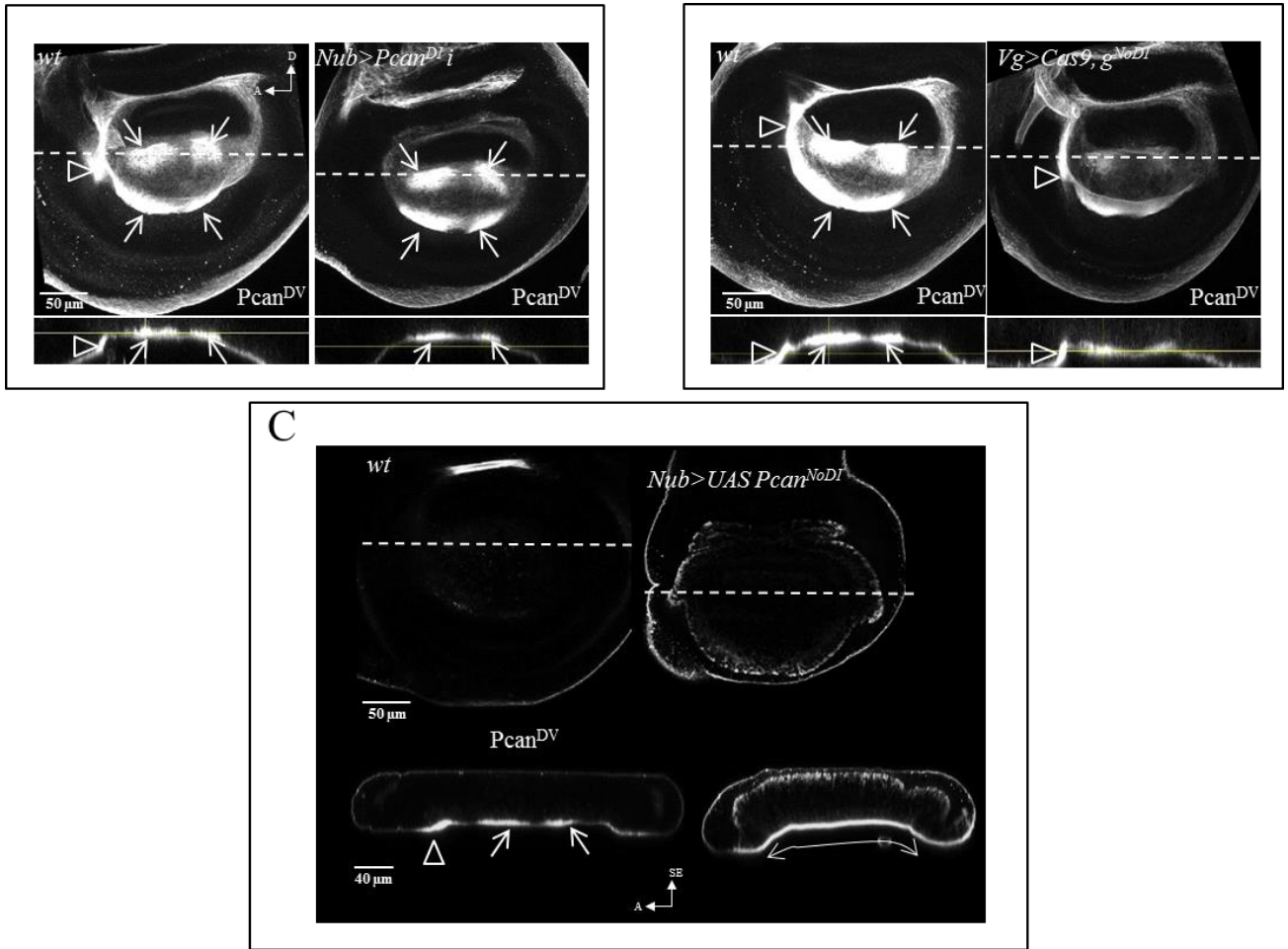


Figure S4

(A) Wing disc pouch Pcan^{DI} depletion. Pcan^{DV} staining performed on discs when costa Pcan^{DI} was depleted (*Nub>Pcan^{DI}i*). « Pcan^{DI} costa » expression (white arrowhead) is removed. « Pcan^{NoDI} quadrants » expression (white arrows) remained.

(B) Wing disc pouch Pcan^{NoDI} depletion. Pcan^{DV} staining performed on discs when Pcan^{NoDI} was depleted in the wing disc pouch (*Vg>Cas9, g^{NoDI}*). « Pcan^{NoDI} quadrants » expression (white arrows) is strongly decreased and « Pcan^{DI} costa » expression (white arrowhead) remains. (A, B) xyz images are max-intensity projections of basal wing disc pouch z-stacks.

(C) Wing disc pouch Pcan^{NoDI} overexpression leads to homogenous Pcan distribution in the pouch BM (white double arrows). Pcan^{DV} staining performed on discs in which Pcan^{NoDI} was overexpressed in the pouch (*Nub>UAS Pcan^{NoDI}*). Normal « Pcan^{DI} costa » and « Pcan^{NoDI} quadrants » expressions (arrowhead and arrows respectively) are no more distinguishable. (A-C) Dashed lines represent the plane of section for the orthogonal views shown below each picture.

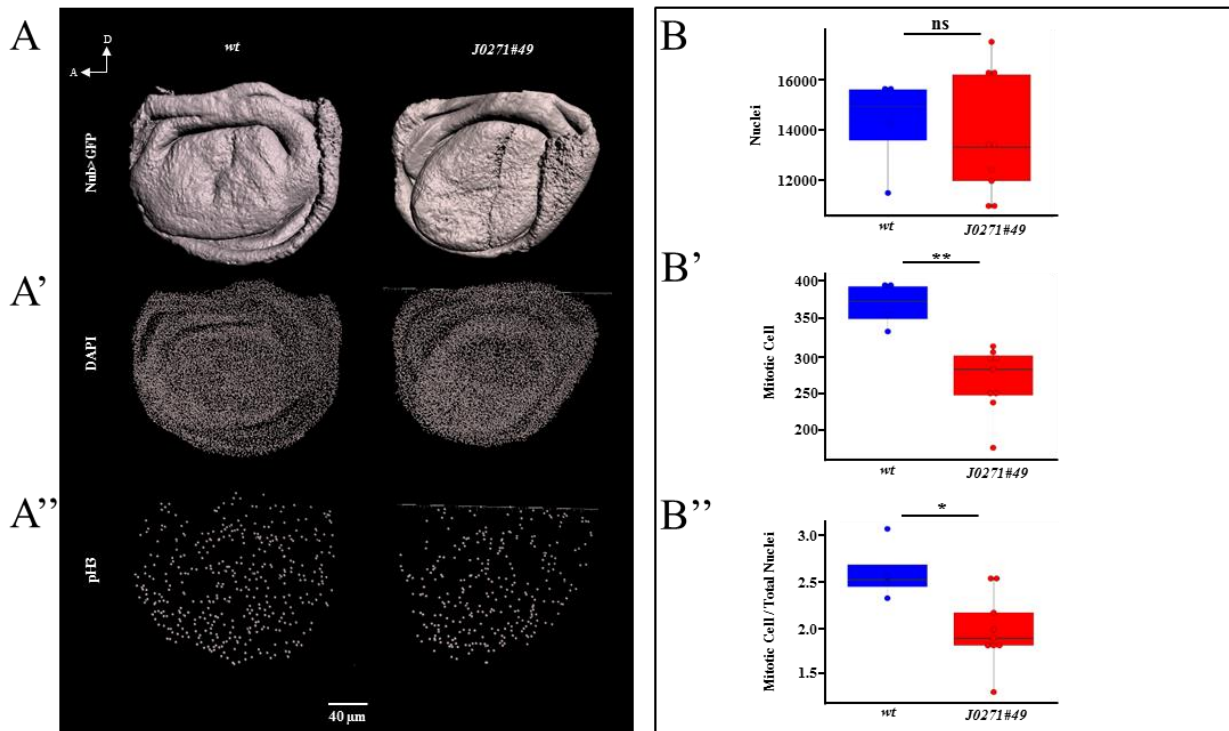


Figure 5: Absence of Perlecan leads to a reduced cell proliferation rate

(A) Imaris 3D reconstitution of the wing disc pouch according to Nub>GFP reporter. This reconstitution is used as a region of interest. Nub>GFP reporter marks columnar epithelium and part of the posterior and ventral cuboidal epithelium. (A') Nuclei spots in NubGal4>GFP ROI according to DAPI staining. (A'') Mitosis spots in NubGal4>GFP ROI according to pH3 staining. (B) Nuclei number. (B') Mitotic cells number. (B'') Mitotic cells number were normalized with respect to total nuclei number for each analyzed disc. (B-B'') Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $n(wt) = 4$ and $n(J0271#49) = 9$. (B-B'') $p > 0.05$: ns, $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **.

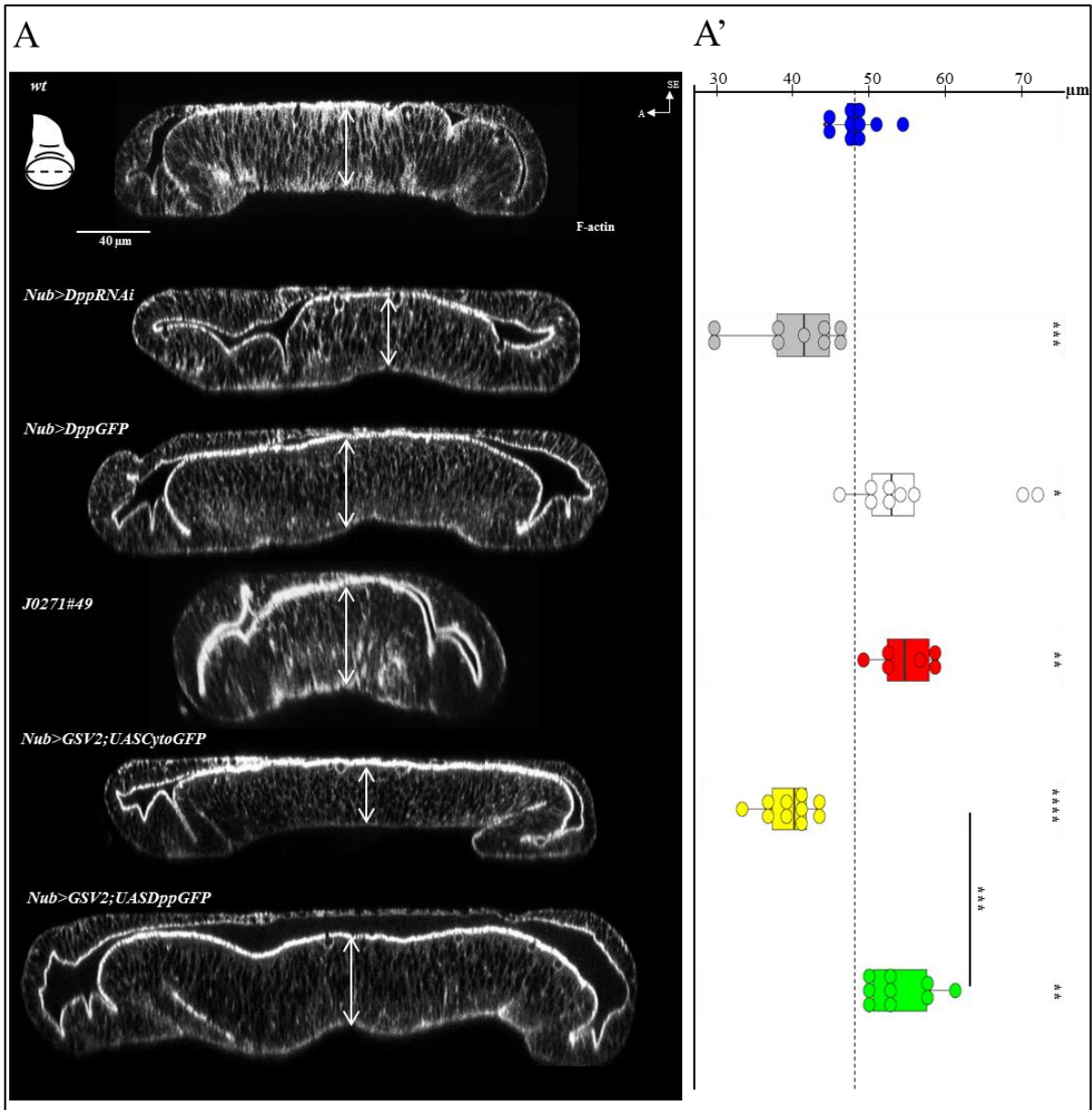


Figure 6: Possible interaction between Dpp and Pcan in apico-basal elongation process

(A) Wing disc pouch volume was measured with Imaris software in the region of interest determined in Fig5A. *wt* and *J0271#49* pouch volume are similar. Data were subjected to non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test. $n(wt) = 4$ and $n(J0271#49) = 9$. (B, B') Wing disc pouch thickness upon manipulation of Dpp and Pcan levels. Dpp level was decreased by expressing a *RNAi* against *dpp* in the wing pouch (*Nub>DppRNAi*) and increased by overexpressing a DppGFP in the wing pouch (*Nub>UASDppGFP*). Pcan level was decreased using the *J0271#49* mutant or increased using the *GSV2* line. Dpp and Pcan genetic interaction were assessed by overexpressing simultaneously both Dpp and Pcan in the wing pouch (*Nub>GSV2;UASDppGFP*). As a control, Pcan was overexpressed simultaneously with a cytoplasmic GFP in the wing pouch (*Nub>GSV2;UASCytoGFP*). (B) Thickness was measured in the columnar epithelium according to the F-actin staining. Images are single optical xzy plane of sections. (B') Plots of thickness values. Data were submitted to pairwise Wilcoxon test. (A') $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: ***, $p < 0.0001$: ****.

DISCUSSION

Control of *pcan* RNA level

We demonstrate here that *pcan* isoforms with and without domain I are synthesized in the wing imaginal disc and that Dpp can regulate the RNA level of both isoforms in an opposite manner. But whether this regulation occurs through RNA synthesis or RNA stability remains unclear. In the case of RNA stability, it has been published that Dally, another HSPG which regulates Dpp, is post-transcriptionally controlled (Tsuda et al., 2001). In particular, its mRNA 3'UTR seems to promote its degradation. A potential « culprit » could be Pumilio, which bind to several mRNA 3'UTR, including *mad* (Malik et al., 2019). This PUF (Pumilio and FBF) family member has been involved in mRNA repression/degradation (Wang et al., 2018), but to our knowledge, Dpp pathway does not regulate its activity. Another candidate could be a miRNA, which are also known for mRNA decay (Ambros, 2003; Fabian et al., 2010). Interestingly, the miRNA *bantam* has been recently shown to be upregulated by the Dpp pathway itself in the wing disc and in turn, repress this pathway (Kane et al., 2018). Moreover, *bantam* distribution in the wing pouch seems to correlate partially with *pcan* RNA distribution. Indeed, *bantam* is apparently absent from the costa and present in the quadrants. But since *bantam* acts as a repressor and *pcan*^{NoDI} RNA is also present in the quadrants, the *bantam*-mediated regulation would be indirect. Therefore, *bantam* would repress either a *pcan*^{NoDI} RNA repressor and/or a *pcan*^{DI} RNA activator in the quadrants. But such a mechanism is compatible with transcriptional regulation.

In the wing disc, Pipsqueak (Psq), a transcription factor associated with the Polycomb group chromatin silencing complex, was predicted to be a target of miRNAs other than *bantam* (Herranz et al., 2014; Huang et al., 2002). Psq was shown to genetically interact with Pcan in an EGFR tumorigenic context, where Psq regulates negatively Pcan production in a quantitative manner (Herranz et al., 2014). This Psq-mediated regulation is supported by the spatial distribution of Psq in the wing pouch which appears as a cross, complementary to Pcan quadrants expression (Weber et al., 1995). Moreover, *Drosophila pcan* RNA has been shown to physically interact with TDP-43 RNA binding protein, which is also associated with the Polycomb group chromatin silencing complex (Swain et al., 2016). Thus, this complex, including Psq, could account for the absence of *pcan* RNA at the AP and DV borders.

A transcriptional regulation, on the other hand, is also supported by (1) the presence of two alternative promoters and (2) the fact that human *pcan* transcription is directly regulated by the TGF β pathway (Iozzo et al., 1997). Since Dpp acts positively on *pcan*^{NoDI} RNA level and negatively on *pcan*^{DI} RNA level, a direct transcriptional regulation would require both pMad/Med and pMad/Med/Shn binding sites near both promoters. Even if the implication of Shn (Shnurri) in the regulation of *pcan* RNA level remains to be experimentally tested, we did a bioinformatic screening on *pcan* promoter regions for

Activating Element (AE) and *Silencing Element (SE)* binding sequences described in (Hamaratoglu et al., 2014). Such sequences were found, but the predictions of the different programs used to identify them did not entirely correspond (data not shown). The best approach for this kind of studies would be a molecular dissection of *pcan* promoters in order to perform Electrophoretic Mobility Shift Assay test. A major issue however, is the huge size of the potential promoter regions. Another hypothesis is the indirect regulation of *pcan* transcription through downstream regulators of the Dpp pathway, such as Sal and Omb. The expression domain of these two transcription factors is coherent with a positive regulation of the *pcan^{NoDI}* transcription. Moreover, the transcription pattern of some of Sal targets is similar to *pcan^{NoDI}* domain of expression (Organista et al., 2015). Therefore, Sal is a good candidate for the transcriptional regulation of *pcan^{NoDI}*. Concerning the *pcan^{DI}* transcriptional regulation, we currently do not have any good candidate that would explain the expression pattern of this isoform.

In addition, others morphogens could intervene in the control of *pcan* RNA levels. Hh seems to regulate these levels (data not shown), but its control relies likely on Dpp since it is one of its target genes. Nevertheless, Hh could be a good candidate by itself for *pcan* inhibition near the A/P boundary, in the same way that Hh regulates negatively *tkv (thickvein)* expression in the *dpp* producing cells. Wg pathway could also repress *pcan* expression at short range at the D/V boundary while activating it at long range, further away from the boundary. This « multiple input » idea is reinforced by the pattern of expression in quadrants of the transcriptional regulator *vestigial (vg)*. This pattern is controlled by several morphogen pathways, including Wg and Dpp (Baena-Lopez et al., 2012), and relies on the use of a « quadrant enhancer ». Therefore, Vg itself could be a good candidate as a regulator of *pcan^{NoDI}* transcription. We actually tested the effect of a Vg loss of function using the *vg^l* allele but found no consequence on *pcan* RNA pattern in the disc pouch. Nonetheless this negative result could be due to the hypomorphic nature of the allele. Therefore, we will repeat this experiment with a null allele of *vg*.

Perlecan is a Dpp pathway inhibitor

Even though the *Pcan^{DI}* produced by the costa seems to be a weak activator of Dpp pathway, the inhibition effect of *Pcan* is the most predominant. This result is in contradiction with a previous work published by Ma and colleagues (Ma et al., 2017) which shows that *Pcan* loss-of-function has no effect on the Dpp pathway. The first difference between our two studies resides in the genetic conditions used to deplete *Pcan*. While we used a mutant which affects both isoforms, they ubiquitously expressed a RNAi which targets only *pcan^{DI}* isoform. Second, they did not quantify the pMad stainings in the wing pouch upon their loss-of-function condition for *Pcan*. In addition, our Sal and Brk stainings also confirm the inhibitory effect that we saw. In any case, we planned to reinforce our data using Omb staining and Sal-lacZ reporter in the *JO271#49* context. The Sal-lacZ reporter will allow us to visualise the transcriptional response of the Dpp pathway. We also want to confirm that the repressive effect mediated

by non-autonomous Pcan relies on Pcan^{DI} isoform. To achieve this, we will use our *pcan^{DI}* RNAi to deplete Pcan^{DI} in the fat body. As a control, we will also perform a Pcan^{NoDI} loss-of-function in this tissue using the CRISPR/Cas9 method. Moreover, we also want to overexpress Pcan^{DI} specifically in the fat body or in the wing disc to see if we get opposite effect to the loss-of-function. Unfortunately, despite multiple attempts, we did not succeed in the construction of an *UAS-pcan^{DI}* transgene. Therefore, we envision to use CRISPR/Cas9 mediated overexpression of this isoform (Jia et al., 2018). Nevertheless, this fat body-mediated repression addresses the question of a regulation of the Dpp pathway by nutrition/metabolism, since the fat body is a major sensor for these processes. In the wing disc, it was previously shown that the nutrition sensing pathways PI3K/PTEN and TSC/TOR can act on Dpp spreading by regulating the expression of HSPG Dally within the disc itself (Ferreira and Milán, 2015). It is tempting to imagine that Dpp spreading could also be directly regulated by the major nutrient-sensing tissue itself, i.e. the fat body, via the HSPG Pcan.

Pcan regulates the extracellular distribution of Dpp

In this study, we used an endogenous HA-tagged version of Dpp (Bosch et al., 2017). To our knowledge, it is the first time that such a tool is utilized to reveal extracellular endogenous Dpp distribution. Indeed, overexpression of a tagged Dpp has been employed in most of the previous studies. Extracellular DppHA was predominantly detected within the lumen of the wing disc, i.e. at the apical side, in agreement with previous reports (Entchev et al., 2000; Gibson et al., 2002). A weak DppHA gradient is also detected at subapical/lateral level of the wing disc pouch, but no staining was observed at the basal side. If this lateral location of DppHA is coherent with what was previously published (Harmansa et al., 2017; Teleman and Cohen, 2000), they differ in terms of quantity. Indeed, Harmansa and his colleagues suggested that most of the Dpp dispersion occurs at the basolateral level. This is not the case here, as our conventional staining showed more DppHA in the apical part of the Dpp-production stripe, suggesting an apical release. Such a bias was already observed using DppGFP overexpression (Ma et al., 2017). Thus, our results suggest that Dpp spreading occurs predominantly through the lumen, even though we do not know if this luminal fraction is the active one.

We also demonstrated that the absence of Pcan increases extracellular DppHA level in the luminal space without increasing its production. To confirm this, we will repeat this experiment and increase samples number. Since DppHA is detected within the lumen, how could it interact with Pcan, which is supposed to be secreted basally? First and surprisingly, Pcan^{DI} and Pcan^{DV} are detected within the lumen, even if it is in a lesser extent than in the BM (our unpublished results, cf Fig29). Second, overexpression of Pcan^{NoDI} provoked an accumulation of Pcan^{DV} staining at the apical tip of the cells in the pouch (Fig S4C), suggesting that Pcan could be potentially secreted apically. In addition, Pcan overexpression using *GSV2* allele also exhibited such an apical accumulation (our unpublished data). Therefore, it appears

that Pcan could potentially interact with DppHA in the lumen. If so, how Pcan could regulate the extracellular Dpp level? The apical accumulation of DppHA in the *J0271#49* mutant that we observed could be due to an increased half-life of the protein or to a slower turnover. In this scenario, Pcan would inhibit Dpp activity by sequestering it and promoting its degradation in *wt* condition. Dpp degradation might happen in the extracellular space, through the action of proteases. Nevertheless, such a mechanism has not been described to our knowledge. However, it has been reported that this degradation occurs through a receptor-mediated endocytosis (Entchev et al., 2000; Teleman and Cohen, 2000). We could hypothesize that Pcan promotes this internalisation, in an opposite manner to Dally which inhibits it (Akiyama et al., 2008). This would mean that Pcan act on Dpp and/or Tkv. To test this hypothesis, we need (1) to check Tkv distribution across the wing pouch upon Pcan depletion, (2) to perform Dpp and/or Tkv internalization assay in the same condition and (3) to test colocalization of Pcan with Dpp and/or Tkv in *wt* background.

What could be the role of the basal Pcan, i.e. the one incorporated in the BM, in Dpp regulation? It was previously reported that the BM as a whole acts as a barrier, preventing massive Dpp leakage from the wing pouch into the haemolymph (Ma et al., 2017). The authors also tested the role of Pcan in this process, and although they did not look at Dpp distribution, they found no alteration in the activity of the Dpp pathway upon Pcan depletion. This suggests that the loss of Pcan does not lead to Dpp leakage. Our study confirms this, since we see an accumulation of Dpp in the wing disc in Pcan loss-of-function condition. Additionally, our previous work concerning the role of Pcan in wing disc morphogenesis demonstrated that the loss of Pcan has no significant impact on the BM underlining the wing pouch (Bonche, Chessel et al., in preparation). Thus, even when devoid of Pcan, the wing pouch's BM seems to still act as a barrier for Dpp. Nevertheless, this barrier is likely permissive for this ligand. In a recent study, Dpp emanating from the wing disc was shown to regulate the onset of metamorphosis by blocking remotely the synthesis of the steroid hormone ecdysone, necessary for this process (Setiawan et al., 2018). In this work, the authors suggest that the wing disc BM barrier may be decisive for retaining Dpp within the disc at late third instar stage, therefore releasing the production of ecdysone. Thus, the BM would switch from a semi-permeable status for Dpp to an impermeable one. Given that Pcan^{NoDI} quadrants appear at the late third instar (Bonche, Chessel et al., in preparation), we hypothesize that this new production is responsible for this switch. In addition to the Dpp efflux that the BM has to deal with, a recent study also suggested an influx of Dpp in the wing disc (Denton et al., 2018). Denton and colleagues reported that a non-autonomous overexpression of Dpp in the midgut leads to the same phenotype as its autonomous overexpression in the wing disc, i.e. a wing disc overgrowth and ectopic pMad expression. This indicates that Dpp provided by another source can circulate in the haemolymph and be captured by the wing disc cells. As the BM is facing the haemolymph, this suggests that the BM is semi-permeable for Dpp. Furthermore, pursuing on the idea that Pcan^{NoDI} quadrants mediate the late BM impermeability, we can speculate that the absence of Pcan could allow "outside" Dpp to enter the

tissue and reach the lumen. To address this, we will test BM permeability and analyse Dpp distribution along the apico-basal axis of the pouch in Pcan loss-of-function condition.

Pcan binding to Dpp

We do not know whether the binding of Dpp on Pcan is direct in our case, but in the vertebrate field, Pcan/BMP 2 interaction has been shown to be mediated by the HS chains of the Pcan's domain I (DeCarlo et al., 2012). Here, we report that an isoform devoid of domain I displays an inhibitory effect on Dpp. Therefore, the potential interaction between Pcan^{NoDI} and Dpp should occur via the protein core of Pcan. It was already shown that Dpp can bind to both protein core or HS chains of Dally (Kirkpatrick et al., 2006). Nevertheless, HS-dependant interaction cannot be ruled out. Indeed, human and mice Pcan are supplemented with HS chains on their domain V (Brown et al., 1997; Friedrich et al., 1999), and we found several HS chain attachment sequences on the domain V of the *Drosophila* Pcan. From this, it is then possible that the isoform Pcan^{NoDI} still interacts with Dpp through HS chains. Concerning Pcan^{DI}, fat body Pcan^{DI} and costa Pcan^{DI} exhibit an opposite effect on the Dpp pathway in the wing pouch. Assuming that the potential interaction occurs through domain I HS chains, a possible explanation for this difference could reside on HS chains structure. A previous study reported that the sulfatation of the HSPGs' HS chains is crucial for the Wg gradient formation in the wing pouch (Kleinschmit et al., 2010). The authors showed that the loss of one of the enzyme responsible for the HS sulfatation leads to increase the level of the extracellular Wg. Interestingly, the SEA (Sperm, Enterokinase and Agrin) module present in Pcan^{DI} is known to promote the HS chains synthesis (Dolan et al., 1997). Comparing RNA sequences of fat body *pcan^{DI}* and costa *pcan^{DI}*, we noticed that the latter lacks an exon within the domain I, bringing the SEA module closer to the upstream-most HS attachment site (our observations). Thus, this suggest a different sulfatation degree between these two Pcan^{DI} forms, which could impact on Dpp binding and on its activity.

Pcan could interact with Dpp to regulate the cell proliferation rate

The growth equalization model places Brk as the central regulator of the wing disc uniform growth (Schwank et al., 2008). In this model, Brk regulates negatively the growth in the lateral regions of the wing pouch, ensuring a uniform proliferation throughout the tissue. In our study, while Pcan depletion decreased the overall levels of Brk, it did not affect the uniformity of the wing pouch proliferation. This is likely due to the conservation of a gradation in *brk* expression, which is apparently sufficient to repress the lateral growth of the wing pouch, hence maintaining the uniform growth. Thus, Pcan has no apparent role in the autonomous Dpp-dependent wing pouch growth. This result is supported by the work of Ma and colleagues (Ma et al., 2017) with only one difference: we do observe a slower proliferation rate in our Pcan loss-of-function condition, even though the number of cells remains similar. Strikingly, we

recently found in our laboratory that the loss of Pcan induces a developmental delay. Therefore, the decrease in the proliferation rate could be due to this delay. The implication of Pcan in the developmental timing may be related to its action on Dpp. Indeed, Dpp was shown to be a a regulator of the metamorphosis onset by travelling to the ring gland, which produces the ecdysone (Setiawan et al., 2018). In particular, Dpp from the midgut was proposed to fulfil this function (Denton et al., 2018). Therefore, Pcan may also regulate Dpp extracellular distribution in other context than the wing pouch, e.g. the midgut and/or the ring gland.

Pcan could interact with Dpp to regulate the apico-basal elongation

Our results suggest that Pcan could participate in the regulation of Dpp-dependent apico-basal elongation of the wing pouch columnar cells. However, we failed to show genetic interaction in this process. In conditions of gain-of-function, the failure to restore a normal height of the cells is likely due to the use of the *GSV2* allele, which allows overexpression of Pcan^{NoDI} and the costa Pcan^{DI} (data not shown). Given that these two isoforms have opposite effects on Dpp pathway, a possibility is that their simultaneous overexpression antagonizes each other, preventing it to down-regulate the Dpp pathway. Another explanation could be the stoichiometry between Pcan and DppGFP. Overexpression of the latter may outreach Pcan proteins, even if Pcan is overexpressed. In conditions of loss-of-function for both Pcan and Dpp, the failure to obtain L3 larva may be due to the strength of the Dpp knock-down such that there is not enough Dpp left to activate normally its pathway. The lethality indicates also an earlier function of Pcan with Dpp. This problem may be avoided by using the *J0271#49 pcan* mutant allele in combination with milder Dpp loss-of-function backgrounds. To do so, we plan to use different transheterozygous combination of *dpp* mutant alleles.

Pcan could interact with Dpp to regulate the patterning

Since Pcan seems to affect the gradient of Dpp, we also planned to analyse in details the vein patterning. Indeed, Dpp pathway has a key role in this process (Blair, 2007). Its target genes *sal*, *omb* and *brk* define the prodomain of the longitudinal veins L2 and L5, respectively (De Celis and Barrio, 2000; Cook et al., 2004; Sturtevant et al., 1997). Unfortunately, the *J0271#49* mutant is lethal at pupal stage preventing the analysis of the adult wing veins. There are however a few escapers and these have vein defects but at very low frequency (our unpublished results). The escapers being the animals with the weakest phenotype, we will check vein patterning at the end of the third instar larval stage and at the pupal stage by staining proveins with anti-dSRF antibody. In addition, we will combine *J0271#49* allele with different transheterozygous combination of *dpp* mutant alleles as above. Indeed, the weak transheterozygous combination of *dpp* alleles gives rise to adults with vein patterning defects. We do have preliminary data suggesting that this vein defects could be rescue by a mutant allele of *pcan*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

***Drosophila* strains and genetics**

Flies were raised on standard cornmeal-agar medium and crosses were performed at 25°C. Mutant allele of *pcan* was *trol*^{JO271#49} characterized in (Bonche et al, 2019). Note that all the experiments with this allele were conducted with males since *trol* is located on the X chromosome.

The following RNAi lines were used: *UAS-mad.RNAi*^{v12635} from the VDRC, *UAS-dpp.RNAi*^{HMS00011}, *UAS-brk.RNAi*^{HMC03345} and *UAS-trol.RNAi*^{HMS01759} from the TRiP collection, and *UAS-trolDI.RNAi*^{Valium20} generated in this study. The CRISPR^{sgRNA} line, generated here, was: *UAS-trolNoDI.KO*^{CFD6}. The *GAL4/Cas9* line was: *Vg-Gal4,UAS-Cas9P2* (Port and Bullock, 2016; Port et al., 2014). Other *UAS* lines were: *UAS-GFP*, *UAS-Dcr-2*, *trol*^{GS7407} referred as *GSV2*, *trol*^{UAS.RG} (Cho et al., 2012) referred as *UAS-pcan*^{NoDI}, and *UAS-DppGFP* (Entchev et al., 2000). *GSV2* allele is the result of a P-element insertion upstream of *pcan*^{DI} TSS. *Gal4* lines were: *Act-GAL4*, *ppl-GAL4*, and *Nub-Gal4*. *w*¹¹¹⁸ served as a wild-type control. Non-referenced lines were obtained from the BDRC. *dpp*^{FRT-CA} line (an endogenously HA-tagged version of *dpp*) was from (Bosch et al., 2017).

Perlecan loss-of-function constructs

UAS-trolDI.RNAi^{Valium20} transgenic line was obtained following DRSC/TRiP *in vivo* RNAi protocols. Briefly, a 21 nucleotides sequence was selected according to (Vert et al., 2006) within the exon 4 of *pcan* (sequence: CTGGACGATGTCGATGAGACA). Based on this sequence, a shRNA construct was generated and cloned into the *pValium20-attb* vector (Ni et al., 2011). *UAS-trolNoDI.KO*^{CFD6} transgenic line was obtained following DRSC/TRiP *in vivo* CRISPR protocols. Briefly, two guide sequences targeting respectively exon 3 (TCCGCGATCGCGACCTCGGTCGG) and intron 6 (GACTTTCTACGACGTAGCTTTGG) were designed on CRISPOR program (tefor.net). The resulting construct was cloned into *pCFD6-attb* vector (Port and Bullock, 2016). To obtain *drosophila* transgenic lines, both purified plasmids were sent to BestGene Inc. for injection and integrated into *attp2* (chromosome III) site via PhiC31 integrase method (Bischof et al., 2007).

Quantitative RT-PCR

Late third instar larval tissues were dissected on ice in PBS. RNA from total larva or fat body was extracted using Tri Reagent (MRC) standard protocol. Wing disc RNA and wing disc pouch RNA were extracted using Qiagen RNeasy lipid tissue minikit according to the manufacturer's protocol. RNA samples (2 µg per reaction for total larva and fat body RNAs, 200 ng for wing disc RNAs) were treated with DNaseI and reverse-transcribed using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The

generated cDNA were used for real time RT-PCR (StepOne Plus, Applied Biosystem) using PowerSYBRGreen PCR mastermix (Applied Biosystem), 8 ng of cDNA template and a primer concentration of 300 nM. Samples were normalized with the house keeping gene Dodeca-satellite-binding protein 1 (Dp1). At least three separate samples were collected per experiment and triplicate measurements were run on each sample. Primers were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche) or the PrimerExpress software (Applied Biosystem). Sequences are available upon request.

Isoforms proportion in fat body and wing imaginal disc were obtained by following the protocol described in (Vidal-Petiot et al., 2012).

***RNA in situ* hybridization and X-Gal staining**

Sense and antisens probes for *pcan* mRNA were designed against *pcan* exon 36 as in (Voigt et al., 2002), or against exon 3 to exon 5 in order to detect, respectively, all *pcan* RNA isoforms or *domain I* RNA isoforms. Probes were synthesized from PCR templates with a DIG RNA Labeling Kit (Roche). Whole-mount RNA *in situ* hybridization was carried out on late third instar larval tissues essentially as described in (Lehner and O'Farrell, 1990), except that fixed dissected larvae were dehydrated in methanol, omitting ethanol and xylene steps. Samples were treated with proteinase K at a concentration of 12.5 µg/ml for 30s, and hybridization temperature was 55°C. Probes were detected using an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) and the NBT/BCIP substrates (both from Roche). Samples were mounted in VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories).

Protocol for Xgal staining followed by *RNA in situ* hybridization was adapted from (“Histological Techniques for the *Drosophila* Eye. Part I: Larva and Pupa.” Chapter 12, by Tanya Wolff, in *Drosophila* Protocols). Briefly, dissected larvae were fixed in 4% PFA in PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 PBS before Xgal staining at 37°C. Then, larval tissues were fixed again with 4% PFA in 0.1% Triton X-100 PBS, washed, and processed for RNA *in situ* hybridization as described above.

Perlecan^{DI} antibody generation

A 492 bp sequence spanning exons 3 and 4 was amplified by PCR and cloned into *pStaby* expression vector (Delphi Genetics). After expression in *SE1 E.coli* bacteria, the 6xHis-tagged peptide was purified with a Ni-NTA column (ThermoFisher) and sent to Eurogentec for rat immunization. The resulting serum was purified to increase Pcan^{DI} antibody titer.

Fluorescent immunostaining

For conventional immunostaining, late third instar larvae were fixed in 4% PFA in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 PBS and blocked in 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100 PBS. Primary and secondary antibodies were incubated in blocking buffer, respectively overnight at 4°C and 1h30 at room temperature. Primary antibodies were diluted as follows: rabbit polyclonal anti-Pcan Domain V (Friedrich et al., 2000) 1:3500, rat polyclonal anti-Pcan Domain I (this study), and rabbit monoclonal anti-phospho-Mad 1/5 (41D10, Cell Signaling 9516S) 1:100, rabbit polyclonal anti-Sal (De Celis et al., 1999) 1:1000, guinea-pig polyclonal anti-Brk (Doumpas et al., 2013) 1:500, rat polyclonal anti-Cad 1:50, rabbit polyclonal anti-βGal 1:5000, mouse anti-Ptc (5E10 DSHB) 1:100, rat monoclonal anti-HA (Roche, 3F10) 1:100, rabbit polyclonal anti-phospho-Histone H3 (Ser10, Merckmillipore 06-570) 1:400. Fluorescent secondary antibodies were diluted at 1:100 (Cy3- and Cy5-conjugated antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories and Alexa Fluor 488, 546 and 647-conjugated antibodies from Life Technologies). TRITC or FITC-conjugated phalloidin (Sigma) was always included at 1:100 in the staining procedure. Samples were mounted in VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories). To compare specimens of different genotypes, samples were stained in parallel using the same antibody solutions when undistinguishable or in the same tube when distinguishable (*e.g.* experiments concerning *troI*^{J0271#49} wing imaginal disc).

Extracellular immunostaining was performed following the protocol of (Strigini and Cohen, 2000). Briefly, *wt* or *troI*^{J0271#49} larvae possessing *dpp*^{FRT-CA} allele were dissected in ice-cold Schneider's medium (Gibco) +10%serum and incubated together with rat anti-HA antibody at 1:20 for 1h30 at 4°C in the same medium. Larvae were rinsed three times with ice-cold PBS and fixed for 20 min in ice-cold PBS containing 4% formaldehyde. Subsequent processing was the same as in the conventional antibody labeling protocol described above.

Imaging and image analysis

Bright field images were taken on a wide-field Axioplan2 Zeiss microscope using a color camera. Pictures were processed with the FIJI software. All fluorescence images were acquired at the same time and with the same settings in order to compare fluorescence intensity. Confocal data were acquired on a Leica DM TCS SPE upright microscope or a Zeiss LSM 780 NLO inverted microscope. *xzy* images were all single sections collected at the focal plane indicated in the figures. *xyz* images were single sections or projections of a *z*-stack encompassing either the entire, or part, of the wing imaginal disc pouch with a step size of 1.0 μm unless otherwise mentioned.

Fluorescence quantification was performed with Fiji software on sum-intensity projection of *z*-stacks encompassing the entire wing imaginal disc pouch. Fluorescent intensities were measured in the regions

of interest indicated in each figure. Regions of interest were identical in terms of size, shape and location within each disc. One profile was recorded per disc. To quantify extracellular HA staining, three independent xzy orthogonal section from a z-stack encompassing the entire wing imaginal disc were analyzed. The region of interest was defined by thresholding the HA channel, and total HA fluorescence intensity was measured in this region. Fluorescence intensities from the three sections were then averaged. To quantify conventional HA staining along the apico-basal axis of the wing pouch cells, a single xzy orthogonal section from a z-stack encompassing the entire wing imaginal disc was analyzed.

Apical and basal cell area were measured with Tissue Analyzer (Aigouy et al., 2016) and Epitools Icy programs (Heller et al., 2016). Max-Intensity projection of z-stacks obtained in the apical or basal region of the wing disc pouch were processed with Tissue Analyzer to produce hand-corrected TIF skeleton images depicting cell outlines. Skeleton images were analysed with Epitools Icy plugins to obtain apical or basal area data. Anti-Cad and phalloidin stainings allowed for reconstruction of epithelial topology.

Area of the entire wing imaginal disc pouch was measured on single xyz section collected at the same location within each disc. Phalloidin staining was used to delimitate the pouch in Fiji software.

Wing imaginal disc pouch volume, nuclei and mitotic nuclei numbers were analyzed using larvae expressing a *UAS-GFP* transgene in the wing imaginal disc columnar epithelium with the *Nub-Gal4* driver. These larvae were fluorescently stained for pH3 to label mitotic nuclei. GFP, pH3 and DAPI were imaged by performing a z-stack with mosaic acquisition encompassing the whole domain of GFP expression, with a step size of 0.42 μm . 3D quantification was performed using Imaris software. Briefly, the volume of the wing imaginal disc pouch epithelium was assessed based on the GFP channel and measured using the surface tool. This volume was then used as a mask on the nuclei image (DAPI staining) and mitotic nuclei image (pH3 staining) to extract nuclei and mitotic nuclei included inside this volume. Those were counted using the spot tool on the masked DAPI or pH3 channel.

Wing imaginal disc pouch thickness measurements were done with Fiji software, on a single xzy optical section taken along the D/V boundary. Three independent measurements were performed at the antero-posterior compartment border, in the anterior compartment and in the posterior compartment, and averaged. Phalloidin staining was used to delimit tissue boundaries.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism or R software. Fluorescence intensity medians profiles of pMad, Sal and Brk were normalized to the peak intensity of their respective control condition. Fluorescence intensities of extracellular HA were normalized to the control condition. Prior to any test, Shapiro-Wilk test was used to determine whether data were normally distributed or not.

Mann-Whitney Wilcoxon tests or pairwise Wilcoxon tests were used to compare fluorescent intensity medians. Mann-Whitney Wilcoxon tests were used to compare relative mRNA level and apical area. Pairwise Wilcoxon tests were used to compare pouch thickness. Significance was classified as follows: $p > 0.05$: ns, $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: ***, $p < 0.0001$: ****.

BIBLIOGRAPHY

- Aigouy, B., Umetsu, D., and Eaton, S. (2016). Segmentation and quantitative analysis of epithelial tissues. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 227–239.
- Akiyama, T., Kamimura, K., Firkus, C., Takeo, S., Shimmi, O., and Nakato, H. (2008). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation by stabilizing Dpp on the cell surface. *Dev. Biol.* 313, 408–419.
- Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 113, 673–676.
- Baena-Lopez, L.A., Nojima, H., and Vincent, J.P. (2012). Integration of morphogen signalling within the growth regulatory network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 166–172.
- Barrio, L., and Milán, M. (2017). Boundary Dpp promotes growth of medial and lateral regions of the *Drosophila* wing. *Elife* 6.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3312–3317.
- Bonche, R., Chessel, A., Boisivon, S., Smolen, P., Voigt, A., Schaub, S., Pizette, S., In preparation.
- Blair, S.S. (2007). Wing Vein Patterning in *Drosophila* and the Analysis of Intercellular Signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 293–319.
- Bosch, P.S., Ziukaite, R., Alexandre, C., Basler, K., and Vincent, J.-P. (2017). Dpp controls growth and patterning in *Drosophila* wing precursor through distinct modes of action. *Elife* 6, 1–16.
- Brown, J.C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997). The C-Terminal Domain V of Perlecan Promotes β 1 Integrin-Mediated Cell Adhesion, Binds Heparin, Nidogen and Fibulin-2 and Can be Modified by Glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* 250, 39–46.
- De Celis, J.F., and Barrio, R. (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech. Dev.* 91, 31–41.
- De Celis, J.F., Barrio, R., and Kafatos, F.C. (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* 126, 2653–2662.
- Cho, J.Y., Chak, K., Andreone, B.J., Wooley, J.R., and Kolodkin, A.L. (2012). The extracellular matrix proteoglycan perlecan facilitates transmembrane semaphorin-mediated repulsive guidance. *Genes Dev.* 26, 2222–2235.
- Cook, O., Biehs, B., and Bier, E. (2004). Brinker and optomotor-blind act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development* 131, 2113–2124.
- Dai, J., Ma, M., Feng, Z., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Inter-adipocyte Adhesion and Signaling by Collagen IV Intercellular Concentrations in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 27, 2729-2740.e4.
- Darnell, D.K., Stanislaw, S., Kaur, S., and Antin, P.B. (2010). Whole mount in situ hybridization detection of mRNAs using short LNA containing DNA oligonucleotide probes. *Rna* 16, 632–637.

- DeCarlo, A.A., Belousova, M., Ellis, A.L., Petersen, D., Grenett, H., Hardigan, P., O'Grady, R., Lord, M., Whitelock, J.M., O'Grady, R., et al. (2012). Perlecan domain 1 recombinant proteoglycan augments BMP-2 activity and osteogenesis. *BMC Biotechnol.* 12, 60.
- Denton, D., Xu, T., Dayan, S., Nicolson, S., and Kumar, S. (2018). Dpp regulates autophagy-dependent midgut removal and signals to block ecdysone production. *Cell Death Differ.* 26, 763–778.
- Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B., and Hassell, J.R. (1997). Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* 272, 4316–4322.
- Doumpas, N., Ruiz-Romero, M., Blanco, E., Edgar, B., Corominas, M., and Teleman, A.A. (2013). Brk regulates wing disc growth in part via repression of Myc expression. *EMBO Rep.* 14, 261–268.
- Entchev, E. V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient Formation of the TGF β Homolog Dpp. *Cell* 103, 981–991.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379.
- Ferreira, A., and Milán, M. (2015). Dally proteoglycan mediates the autonomous and nonautonomous effects on tissue growth caused by activation of the PI3K and TOR pathways. *PLoS Biol.* 13, 1–28.
- Friedrich, M. V., Schneider, M., Timpl, R., and Baumgartner, S. (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *Eur. J. Biochem.* 267, 3149–3159.
- Friedrich, M.V.K., Göhring, W., Mörgelin, M., Brancaccio, A., David, G., and Timpl, R. (1999). Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J. Mol. Biol.* 294, 259–270.
- Gibson, M.C., and Perrimon, N. (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* (80-.). 307, 1785–1789.
- Gibson, M.C., Lehman, D.A., and Schubiger, G. (2002). Luminal Transmission of Decapentaplegic in *Drosophila* Imaginal Discs. *Dev. Cell* 3, 451–460.
- Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Pyrowolakis, G. (2014). Dpp/BMP signaling in flies: From molecules to biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 32, 128–136.
- Harmansa, S., Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Caussinus, E. (2015). Dpp spreading is required for medial but not for lateral wing disc growth. *Nature* 527, 317–322.
- Harmansa, S., Alborelli, I., Bieli, D., Caussinus, E., and Affolter, M. (2017). A nanobody-based toolset to investigate the role of protein localization and dispersal in *Drosophila*. *Elife* 6, 1–22.
- Hartl, T.A., and Scott, M.P. (2014). Wing tips: The wing disc as a platform for studying Hedgehog signaling. *Methods* 68, 199–206.
- Heller, D., Hoppe, A., Restrepo, S., Gatti, L., Tournier, A.L., Tapon, N., Basler, K., and Mao, Y. (2016). EpiTools: An Open-Source Image Analysis Toolkit for Quantifying Epithelial Growth Dynamics. *Dev. Cell* 36, 103–116.

- Herranz, H., Weng, R., and Cohen, S.M.M. (2014). Crosstalk between Epithelial and Mesenchymal Tissues in Tumorigenesis and Imaginal Disc Development. *Curr. Biol.* 24, 1476–1484.
- Huang, D.-H., Chang, Y.-L., Yang, C.-C., Pan, I.-C., and King, B. (2002). pipsqueak Encodes a Factor Essential for Sequence-Specific Targeting of a Polycomb Group Protein Complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6261–6271.
- Iozzo, R. V., Pillarisetti, J., Sharma, B., Murdoch, A.D., Danielson, K.G., Uitto, J., and Mauviel, A. (1997). Structural and Functional Characterization of the Human Perlecan Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 5219–5228.
- Jia, Y., Xu, R.-G., Ren, X., Ewen-Campen, B., Rajakumar, R., Zirin, J., Yang-Zhou, D., Zhu, R., Wang, F., Mao, D., et al. (2018). Next-generation CRISPR/Cas9 transcriptional activation in *Drosophila* using flySAM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4719–4724.
- Kane, N.S., Vora, M., Padgett, R.W., and Li, Y. (2018). bantam microRNA is a negative regulator of the *Drosophila* decapentaplegic pathway. *Fly (Austin)*. 12, 105–117.
- Kirkpatrick, C.A., Knox, S.M., Staatz, W.D., Fox, B., Lercher, D.M., and Selleck, S.B. (2006). The function of a *Drosophila* glypican does not depend entirely on heparan sulfate modification. *Dev. Biol.* 300, 570–582.
- Kleinschmit, A., Koyama, T., Dejima, K., Hayashi, Y., Kamimura, K., and Nakato, H. (2010). *Drosophila* heparan sulfate 6-O endosulfatase regulates Wingless morphogen gradient formation. *Dev. Biol.* 345, 204–214.
- Lehner, C.F., and O’Farrell, P.H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell*.
- Ma, M., Cao, X., Dai, J., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Basement Membrane Manipulation in *Drosophila* Wing Discs Affects Dpp Retention but Not Growth Mechanoregulation. *Dev. Cell* 42, 97–106.e4.
- Malik, S., Jang, W., Park, S.Y., Kim, J.Y., Kwon, K.S., and Kim, C. (2019). The target specificity of the RNA binding protein Pumilio is determined by distinct co-factors. *Biosci. Rep.* 39.
- Martin, F.A. (2004). The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. *Development* 131, 4921–4930.
- Matsuda, S., and Affolter, M. (2017). Dpp from the anterior stripe of cells is crucial for the growth of the *Drosophila* wing disc. *Elife* 6, 1–9.
- Merz, D.C., Alves, G., Kawano, T., Zheng, H., and Culotti, J.G. (2003). UNC-52/Perlecan affects gonadal leader cell migrations in *c. elegans* hermaphrodites through alterations in growth factor signaling. *Dev. Biol.* 256, 174–187.
- Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H., and Tabata, T. (1999). brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* 398, 242–246.
- Ni, J.-Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.-P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.-S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., et al. (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat. Methods* 8, 405–407.

- Organista, M.F., Martín, M., de Celis, J.M., Barrio, R., López-Varea, A., Esteban, N., Casado, M., and de Celis, J.F. (2015). The Spalt Transcription Factors Generate the Transcriptional Landscape of the *Drosophila melanogaster* Wing Pouch Central Region. *PLoS Genet.* 11, 1–27.
- Pastor-Pareja, J.C., and Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Dev. Cell* 21, 245–256.
- Port, F., and Bullock, S.L. (2016). Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nat. Methods* 13, 852–854.
- Port, F., Chen, H.-M., Lee, T., and Bullock, S.L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E2967–E2976.
- Restrepo, S., Zartman, J.J.J., and Basler, K. (2014). Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr. Biol.* 24, R245–R255.
- Schwank, G., Restrepo, S., and Basler, K. (2008). Growth regulation by Dpp: An essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development* 135, 4003–4013.
- Setiawan, L., Pan, X., Woods, A.L., O’Connor, M.B., and Hariharan, I.K. (2018). The BMP2/4 ortholog Dpp can function as an inter-organ signal that regulates developmental timing. *Life Sci. Alliance* 1, e201800216.
- Strigini, M., and Cohen, S.M. (2000). Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr. Biol.*
- Sturtevant, M.A., Biehs, B., Marin, E., and Bier, E. (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 21–32.
- Swain, A., Misulovin, Z., Pherson, M., Gause, M., Mihindikulasuriya, K., Rickels, R.A., Shilatifard, A., and Dorsett, D. (2016). *Drosophila* TDP-43 RNA-Binding Protein Facilitates Association of Sister Chromatid Cohesion Proteins with Genes, Enhancers and Polycomb Response Elements. *PLoS Genet.* 12, 1–32.
- Teleman, A.A., and Cohen, S.M. (2000). Dpp gradient formation in the *drosophila* wing imaginal disc. *Cell* 103, 971–980.
- Tsuda, M., Izumi, S., and Nakato, H. (2001). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the gene for Dally, a *Drosophila* integral membrane proteoglycan. *FEBS Lett.* 494, 241–245.
- Vert, J.P., Foveau, N., Lajaunie, C., and Vandembrouck, Y. (2006). An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* 7, 1–17.
- Vidal-Petiot, E., Cheval, L., Faugeron, J., Malard, T., Doucet, A., Jeunemaitre, X., and Hadchouel, J. (2012). A new methodology for quantification of alternatively spliced exons reveals a highly tissue-specific expression pattern of WNK1 isoforms. *PLoS One* 7, 1–9.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U., and Jäckle, H. (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Dyn.* 224, 403–412.
- Wang, M., Ogé, L., Perez-Garcia, M., Hamama, L., and Sakr, S. (2018). The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets, Biological Functions, and Post Transcriptional Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 410.

Weber, U., Siegel, V., and Mlodzik, M. (1995). pipsqueak encodes a novel nuclear protein required downstream of seven-up for the development of photoreceptors R3 and R4. *EMBO J.* 14, 6247–6257.

Widmann, T.J., and Dahmann, C. (2009). Dpp signaling promotes the cuboidal-to-columnar shape transition of *Drosophila* wing disc epithelia by regulating Rho1. *J. Cell Sci.* 122, 1362–1373.

Zang, Y., Wan, M., Liu, M., Ke, H., Ma, S., Liu, L.P., Ni, J.Q., and Pastor-Pareja, J.C. (2015). Plasma membrane overgrowth causes fibrotic collagen accumulation and immune activation in *Drosophila* adipocytes. *Elife* 4, 1–23.

Discussion

Au travers des deux articles, nous avons démontré que le Pcan était requis pour la morphogénèse du disque imaginal d'aile.

Le premier article met à l'honneur son rôle clé dans la biogénèse de la MB de ce tissu, qui permet à cette dernière de réguler mécaniquement la morphogénèse. Nous avons démontré que le Pcan était nécessaire à l'incorporation du Col IV dans la MB du disque. L'absence de Pcan entraîne la formation d'une MB anormale du côté des cellules squameuses. Ces dernières changent de formes en devenant cuboïdales, et la formation de l'aile est compromise. De manière intéressante, la réduction de la quantité de Col IV permet de restaurer partiellement tous les aspects de ce phénotype. Ce sauvetage partiel est expliqué par l'antagonisme entre le Pcan et le Col IV. En effet, nous avons prouvé qu'en absence de Pcan la compression de l'épithélium augmente. Ainsi, Pcan confère de l'élasticité à la MB, contrebalançant le rôle du Col IV qui rigidifie cette dernière. Cette mécano-régulation de la morphogénèse du disque d'aile serait dépendante des microtubules, relais intracellulaire des variations mécaniques dues aux modifications de la MB. Nos résultats suggèrent donc pour la première fois que l'interaction du Pcan avec le Col IV contrôle l'organisation du réseau de Col IV, permettant ainsi de moduler l'action de ce dernier.

Le deuxième article révèle le rôle de ses isoformes en tant que régulateurs de morphogènes dans le disque d'aile. Nous avons d'abord démontré l'existence de deux familles d'isoformes du Pcan chez la drosophile : une Avec Domaine I, nécessaire à l'addition des chaînes SH, et une autre Sans Domaine I, théoriquement dépourvue de chaînes SH. Nos données suggèrent que le Pcan déposé dans la MB du disque provient de trois sources différentes produisant des isoformes différentes. D'une part, les sources non-autonomes secréteraient des formes Avec Domaine I qui seraient déposées dans la MB du disque. D'autre part, le disque produirait à la fois des formes Avec Domaine I et Sans Domaine I qui seraient directement incorporées dans sa MB. Nous avons ensuite prouvé que le niveau d'ARN de ces isoformes dans le disque était contrôlée par la voie de signalisation Dpp-BMP 2/4. En effet, en condition normale, Dpp augmente la quantité d'ARN de l'isoforme Sans Domaine I dans le disque et diminue la quantité d'ARN de l'isoforme Avec Domaine I. Finalement, nous avons découvert que Pcan pouvait agir comme un inhibiteur de la voie Dpp en affectant la quantité de ligand dans le milieu extracellulaire. Mes résultats montrent que les deux isoformes agissent de manières différentes sur la voie Dpp dans le disque d'aile.

Il est enfin temps de récapituler « quel Pcan fait quoi » dans ce tissu.

Des sources du Pcan au stade larvaire

Les Pcan du disque imaginal d'aile

A l'issue du premier article, nous avons appris que le Pcan déposé dans la MB du disque imaginal d'aile était synthétisé non pas uniquement par le corps gras et les hémocytes (Dai et al., 2018; Zang et al., 2015), mais aussi par deux autres sources distinctes : la poche du disque d'aile lui-même et l'intestin. Alors que le Pcan non-autonome est déposé en « fine couche » continue tout autour du disque imaginal d'aile, le Pcan autonome s'accumule en cinq points « discrets » situés uniquement du côté de l'épithélium colonnaire : la « costa » et les quatre « quadrants ». Outre cette discrimination spatiale, nous avons également noté que l'expression du *pca*n en quadrants est tardive. Ainsi, le Pcan du disque d'aile est exclusivement d'origine non-autonome jusqu'au moins la moitié du troisième stade larvaire. De façon intéressante, nous avons remarqué la présence du Pcan dans la lumière du disque (Fig 29). Or la source non-autonome est aussi celle qui fournit ce Pcan. En effet, ce Pcan luminal est détecté avant l'expression autonome du *pca*n. Il n'est cependant pas exclu que la poche sécrète aussi du Pcan du côté apical.

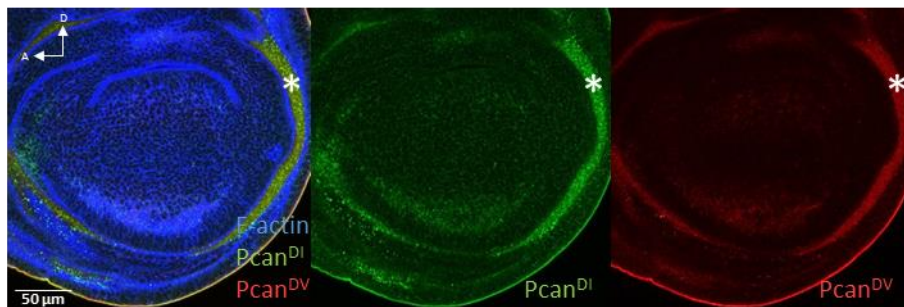


Figure 29 : Pcan^{DI} est présent dans la lumière du disque imaginal d'aile.

Ainsi, à la fin du troisième stade larvaire, on peut distinguer :

- Une « fine couche » de Pcan non-autonome déposé dans la MB tout autour du disque d'aile ;
- Du Pcan luminal au moins non-autonome ;
- Cinq points d'accumulation autonome, la « costa » (déjà présente au milieu du stade L3) et les quatre quadrants (expression tardive), situés sous l'épithélium colonnaire.

A l'issue du second article, nous avons appris que ces différentes sources de Pcan se distinguaient par la nature des isoformes dont elles sont constituées (Fig 30) :

- La fine couche est en partie constituée par une isoforme Pcan^{DI} dont le domaine I est complet (Pcan^{DI+}) ;

- Le Pcan luminal, puisqu'au moins en partie non-autonome, est lui aussi au moins constitué de cette isoforme Pcan^{DI+} ;
- La « costa » est formée par l'isoforme Pcan^{DI} dont l'un des exons du domaine I a été épissé (Pcan^{DI-}) ;
- Les quadrants sont composés de l'isoforme Pcan^{NoDI}.

Concernant la source non-autonome, nous avons récemment découvert que l'intestin moyen fournit du Pcan à la MB du disque d'aile. Même si nous ne connaissons pas encore la nature des isoformes produites par ce tissu, certains indices indiquent qu'il produit au moins une forme avec domaine I. Tout d'abord, nous avons réalisé une RT-qPCR avec de l'ARN de larves entières qui montre que la forme *pcan^{DI}* est majoritaire. Ensuite, nous disposons d'une lignée Pcan-YFP dont le signal YFP est intracellulaire. Cette absence de sécrétion est probablement due au site d'insertion du tag YFP, très proche du peptide signal du domaine I, qui inhiberait le clivage de ce dernier. Cet outil, à défaut d'être fonctionnel, nous permet donc de suivre le site de la production de l'isoforme Pcan^{DI}. En l'utilisant, nous avons ainsi pu voir que cette isoforme était produite par l'intestin moyen. Dans un futur proche, nous allons poursuivre la caractérisation des isoformes du Pcan dans ce tissu, notamment en quantifiant l'expression de ces isoformes par RT-qPCR.

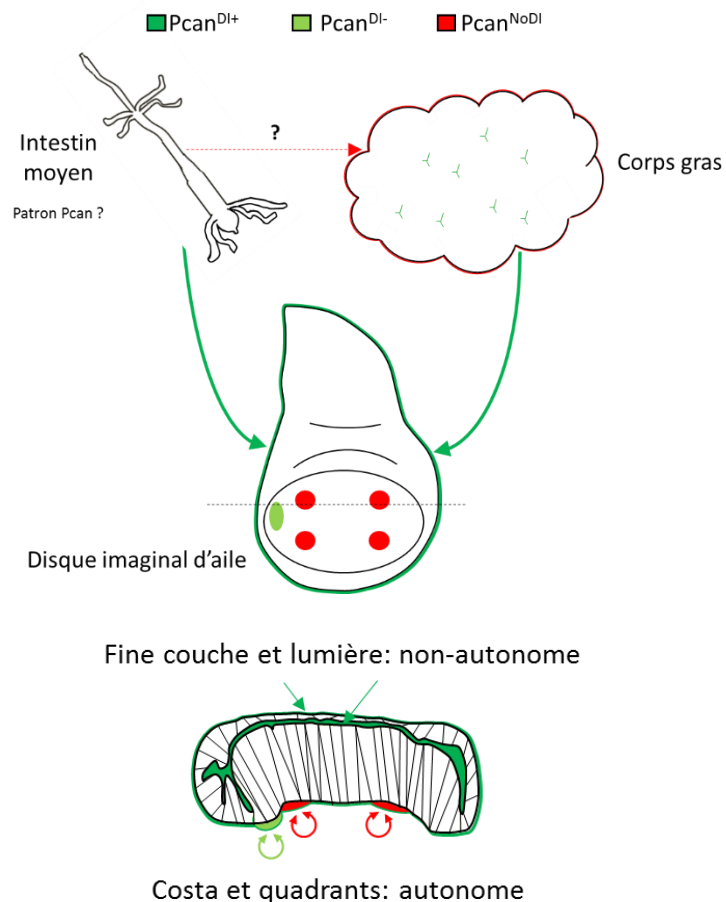


Figure 30 : Isoformes des sources du Pcan déposées dans la MB du disque imaginal d'aile.

Les Pcan du corps gras

Nous savons que le corps gras produit massivement l'isoforme Pcan^{DI+} et très peu l'isoforme Pcan^{NoDI} (98% contre 2% en proportion). De manière surprenante, cette dernière semble être l'isoforme prépondérante dans la MB de ce tissu, tandis que le Pcan^{DI} s'accumule dans les CIVICs. Deux explications peuvent être envisagées : soit la quantité de Pcan^{NoDI} produit suffit à fournir la MB de manière autonome, soit le Pcan^{NoDI} accumulé dans la MB du corps gras a une source non-autonome. Dans le cas d'une source non-autonome, l'intestin ainsi que les hémocytes me paraissent être des candidats potentiels. D'un côté, nous avons montré que l'intestin fournit du Pcan à la MB du disque d'aile. De l'autre, les hémocytes sont apparemment responsables d'une partie de la production des MBs au stade larvaire, notamment en ce qui concerne le Nid (Dai et al., 2018). Dans tous les cas, il faudra, dans un avenir proche, tester l'aptitude de ces tissus à produire du Pcan^{NoDI} et à contribuer au dépôt de ce dernier dans la MB du corps gras. Cette contribution sera mise en évidence en visualisant le dépôt de Pcan de la MB du corps gras en condition de perte-de-fonction tissu-spécifique pour l'isoforme Pcan^{NoDI} soit dans les hémocytes, soit dans l'intestin.

Du transport du Pcan non-autonome

Nous et d'autres avons mis en évidence de nombreuses sources non-autonomes pour les composants des MBs de plusieurs tissus. Le corps gras semble jouer un rôle critique dans ce mécanisme. Cependant, une question essentielle se pose : comment ces composants sont-ils transportés dans l'hémolymphe depuis ce tissu ? Prenons le cas de « l'axe » corps gras – disque d'aile. Ces derniers ont beau être physiquement proches dans le milieu intérieur larvaire, il n'en reste pas moins qu'il faut circuler dans l'hémolymphe pour rallier « l'objectif ». Il a été avancé que le ColIV était sécrété sous forme soluble dans l'hémolymphe grâce à la protéine SPARC (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Le ColIV « rallierait » donc le disque imaginal d'aile par ses propres moyens, sous forme soluble et sans avoir polymérisé. Cependant, une publication récente a mis en évidence le rôle de la concentration en ion Cl⁻ dans l'autopolymérisation péricellulaire du réseau de ColIV (Cummings et al., 2016). Comment se fait-il alors qu'un groupe soluble de protomères de ColIV soit sécrété par par le corps gras (tissu-source), échappe à l'autopolymérisation Cl⁻dépendante au niveau de ce tissu-source, pour finalement atteindre la MB du tissu-cible (e.g. le disque d'aile), où cette fois-ci il subit l'autopolymérisation Cl⁻dépendante ? La réponse réside sans doute dans l'utilisation de transporteurs spécifiques, prévenant la polymérisation des protomères au niveau de la source et relâchant ces derniers au niveau de la MB du tissu-cible. De son côté, le Pcan peut aussi s'oligomériser grâce à son domaine III, ce qui pourrait le rendre plus ou moins insoluble. Néanmoins, il doit lui aussi voyager à travers l'hémolymphe. Là encore, le transit du Pcan dans l'hémolymphe pourraient reposer sur l'usage de transporteurs. Le domaine II du Pcan nous fournit un élément de réponse. Ce domaine est constitué par des répétitions de motifs LDLR qui permettent au

Pcan d'interagir avec des lipoprotéines chez le poulet (Hummel et al., 2004). Partant du fait que le corps gras produit la lipoprotéine Lpp responsable du transport de lipides vers le disque imaginal d'aile (Palm et al., 2012), il est tentant de spéculer sur l'implication des particules lipoprotéiques Lpp-dépendantes dans le transport du Pcan à travers l'hémolymphe. Outre des transporteurs, d'autres mécanismes pourraient être envisagés. Chez la drosophile, des formes dénuées de domaine V sont prédites. Ce domaine permettant l'interaction avec les récepteurs cellulaires, ces isoformes ne pourraient donc pas se lier à ces derniers. Ainsi, ne pouvant être retenues à la surface des cellules productrices, les isoformes sans domaine V pourraient être sécrétées de manière plus efficace et transiter dans l'hémolymphe sous forme soluble. En conclusion, l'étude du mécanisme de transport du Pcan pourrait constituer une première étape vers la compréhension du transport des autres constituants des MBs.

Des fonctions du Pcan et de ses isoformes dans le disque imaginal d'aile

Mécano-régulateur de la morphogénèse

La première étude a démontré que le dépôt du Pcan dans la MB bordant la membrane péripodiale était nécessaire à l'acquisition de la morphologie squameuse des cellules et à la morphologie du disque d'aile en général. Nous avons prouvé que ce rôle était associé à sa propriété élastogène au sein des MBs (Fig 31). De plus, le Pcan déposé dans la MB péripodiale est exclusivement non-autonome bien qu'en son absence, le Pcan autonome semble pouvoir partiellement diffuser de la MB de la poche vers celle de la membrane péripodiale. Ainsi, en assemblant toutes les pièces du puzzle, nous pouvons avancer que la « fine couche » non-autonome de Pcan^{DI} remplit une mission de mécano-régulateur de la morphogénèse du disque imaginal d'aile, ce qui est en accord avec le fait que les chaînes SH du domaine I sont importantes pour l'interaction Pcan/Col IV.

En revanche, le Pcan exprimé dans la poche ne semble pas remplir la même fonction. En effet, la déplétion du Pcan des quadrants et de la costa n'affecte pas ou peu la morphologie du disque. « Peu », car nous avons observé que la courbure « périphérique » basale de la poche, particulièrement visible des côtés antérieur et postérieur en coupe xzy (Fig 31, têtes de flèche noires au stade milieu L3), semble être moins marquée en l'absence des quadrants de Pcan^{NoDI}. Ces derniers, situés juste au niveau de la courbure en condition *wt*, pourraient donc contribuer à la générer en apportant un peu d'élasticité à la MB, mais par un mécanisme différent. En effet, le Pcan^{NoDI} ne peut pas interagir avec le Col IV via les chaînes SH du domaine I. Cette interaction doit certainement dépendre du domaine IV du Pcan.

Chémo-régulateur de la morphogénèse

- i) Pcan luminal

Dans le second article, j'ai suggéré que le Pcan luminal pouvait réguler l'activité du morphogène Dpp dans la poche (Fig 31). Même si l'on ne peut pas exclure une origine autonome à ce pool luminal, nous pouvons affirmer qu'il est au moins constitué par du Pcan^{DI+} non-autonome. Or, la déplétion non-autonome du Pcan induit une forte suractivation de la voie Dpp dans le disque. Ceci suggère que le Pcan^{DI+} non-autonome de la lumière est un inhibiteur de la voie Dpp. Ce Pcan pourrait promouvoir l'internalisation et la dégradation du complexe Dpp/Tkv, ce qui aurait pour effet de réprimer l'activité du morphogène. Les PGSH Dally et Dally-like stabilisent Dpp à la surface des cellules en empêchant l'internalisation du complexe ligand/récepteur : il s'agit donc de régulateurs positifs de la voie Dpp (Akiyama et al., 2008). On peut donc se demander dans quelle mesure Pcan et Dally/Dally-like entrent en compétition pour réguler l'activité de la voie. Nous prévoyons d'aborder cette question en commençant par réaliser des tests d'interaction génétique. En outre, il a été montré que Pentagone (Pent), nécessaire à la diffusion de Dpp, permettait l'internalisation de Dally et Dally-like. Ceci entraîne, entre autre, une inhibition de l'activité de la voie (Norman et al., 2016). On peut donc aussi s'interroger sur une interaction entre Pent et le Pcan luminal : Pent pourrait-il promouvoir son internalisation et sa dégradation ? Si c'était le cas, Pent pourrait être le médiateur de la compétition Pcan vs Dally/Dally-like. Nous voudrions donc tester l'existence d'une interaction génétique entre Pent et Pcan. Enfin, même si nous avons centré notre travail sur Dpp, il ne faut pas oublier son « partenaire de crime » : Gbb. Il a en effet été montré que l'hétérodimère Dpp-Gbb participait au patterning des veines via la même cascade de signalisation Tkv-Mad (Anderson and Wharton, 2017; Bangi and Wharton, 2006; Ray and Wharton, 2001). Nous nous demandons donc si le Pcan luminal affecte la signalisation Dpp en interagissant avec son partenaire Gbb. Nous pensons que le marquage extracellulaire de ce dernier, grâce à un anticorps déjà disponible, pourrait se révéler fort intéressant.

ii) Pcan de la costa

Nous en arrivons au Pcan autonome. Séparément, la déplétion du Pcan de la costa et des quadrants, a un effet opposé sur la voie Dpp. Par ailleurs, bien que significatif, cet effet est, somme toute, beaucoup plus faible par rapport à la déplétion du Pcan non-autonome. Ceci suggère que ces deux sources autonomes de Pcan jouent un rôle d'appoint dans la régulation de l'activité de la voie Dpp, laissant la part belle au Pcan luminal non-autonome. La fonction positive du Pcan^{DI-} de la costa reste un mystère. Sa position pourrait connoter un rôle dans la promotion de la signalisation Dpp à longue portée dans le compartiment antérieur. Cependant, la déplétion du Pcan^{DI-} de la costa entraîne une diminution du pMad dans les compartiments antérieur et postérieur, ce qui montre une diminution uniforme de l'activité de la voie Dpp. Ceci pourrait éventuellement indiquer une diffusion du Pcan^{DI-} dans la MB de la poche. Une autre hypothèse pourrait éventuellement résider dans une spécification Dpp-dépendante des cellules de la costa de l'aile. Peut-être que le Pcan^{DI-} est exprimé au niveau de ces cellules pour pouvoir « optimiser » le peu de Dpp leur parvenant.

iii) Pcan des quadrants

Concernant les quadrants, nous avons discuté de leur rôle négatif et « imperméabilisant » vis-à-vis de Dpp dans le second article. Leur apparition tardive pourrait notamment abolir la diffusion du Dpp hors du disque et promouvoir la synthèse d'ecdysone, réprimé jusqu'alors par Dpp (Setiawan et al., 2018). Ainsi, l'abolition expérimentale de ces quadrants d'expression devrait permettre à Dpp de maintenir la répression de la synthèse d'ecdysone, et d'induire un délai dans la survenue de la métamorphose. Cette hypothèse est renforcée par le délai développemental que nous avons justement observé en utilisant le mutant *pcan J0271#49* (nos résultats non publiés). En allant plus loin, nous pouvons imaginer que la perdurance de la « fuite » de Dpp dans le mutant pourrait entraîner une baisse de l'activation de la voie dans le disque d'aile. Or nous observons le contraire quand nous faisons l'ablation des quadrants. Une étude sortie récemment pourrait apporter un début de réponse à cette contradiction. En s'intéressant au rôle du Dpp dans le déclenchement de la métamorphose, Denton et ses collègues ont montré qu'une surexpression de DppGFP dans l'intestin pouvait induire un phénotype de gain de fonction Dpp dans le disque d'aile (Denton et al., 2018). Ainsi, il est tentant de penser que les quadrants ne sont pas uniquement là pour prévenir la fuite de Dpp, mais aussi pour isoler l'activité du Dpp autonome du disque de « l'invasion » d'un Dpp non-autonome. Dans ce cas-là, l'ablation des quadrants « autoriserait » le Dpp non-autonome à participer à l'activation de la voie dans la poche. Cependant, on ne peut pas exclure que la fine couche non-autonome de Pcan ne participe pas à cette « isolation » puisque le mutant *J0271#49* affecte toutes les sources du Pcan. La déplétion spécifique du Pcan non-autonome pourrait donc aussi entraîner un afflux de Dpp non autonome dans le disque. Quadrants ou fine couche, la contribution de Pcan à l'imperméabilité vis-à-vis de Dpp devra être abordée. La visualisation du DppHA luminal en déplaçant le Dpp non-autonome dans le mutant pour *pcan J0271#49* nous donnera une première indication. Si la quantité de DppHA luminal revient à la normale dans ces conditions, cela confirmera le rôle du Pcan en tant que barrière contre le Dpp extérieur au disque. Les déplétions simultanées Dpp non-autonome/Pcan des quadrants et Dpp non-autonome/Pcan de la fine couche seront envisageables en utilisant deux systèmes d'expressions binaires, *UAS/Gal4* et *LexO/LexA* (del Valle Rodríguez et al., 2012).

Pour résumer, nos résultats suggèrent que l'isoforme Pcan^{DI+} joue à la fois un rôle mécanorégulateur ET chémorégulateur, tandis que les isoformes Pcan^{DI-} et Pcan^{NoDI} semblent agir en tant que chémorégulateur « d'appoint ». Ces fonctions peuvent être considérées à la lumière des localisations des isoformes. Le Pcan^{DI+} sous sa forme luminale libre, i.e. indépendante de la MB, serait dédié à la signalisation, tandis que sa forme basale, dépendante de la MB, révélerait son rôle mécanique. Dans le contexte de la MB, les Pcan^{DI-} et Pcan^{NoDI} seraient, quant à eux, des modulateurs de voies de signalisation. Ainsi, l'utilisation d'isoformes aux structures différentes permet très probablement de moduler le répertoire des interactants du Pcan, et donc les fonctions remplies par ce dernier.

Intérêt de la boucle de rétroaction Pcan/Dpp

Dans le modèle que nous proposons (Fig 31), (1) du Pcan^{DI+} luminal non autonome réprime l'activité de Dpp dans le disque d'aile, participant ainsi à l'établissement du gradient. (2) Dpp, en retour, favorise la synthèse des quadrants de Pcan^{NoDI} et empêche le Pcan^{DI-} d'être produit dans son domaine d'action. (3) En réponse, les quadrants de Pcan^{NoDI} inhibent l'activité de Dpp tandis que le Pcan^{DI-} la favorise. A première vue, nous sommes face à une boucle de rétrocontrôle entre l'activité de Dpp et les isoformes de Pcan dans le disque imaginal d'aile. Cependant, en considérant l'hypothèse selon laquelle les quadrants de Pcan n'agiraient pas sur le Dpp produit par la poche mais sur le Dpp extérieur, nous ne rentrons plus dans le cadre d'une boucle strictement interne au disque. Il s'agirait plutôt d'une boucle « fonctionnelle » permettant au Dpp du disque d'aile de prémunir son activité contre un Dpp venant de l'hémolymphe. Cette boucle Dpp/ Pcan^{NoDI} pourrait donc permettre de tamponner l'arrivée de Dpp non-autonome. Une arrivée massive de ce dernier entraînerait une synthèse élevée de Pcan^{NoDI}, qui, en retour, couperait l'arrivée du Dpp non-autonome afin de préserver l'activité du Dpp autonome de la poche du disque. A l'opposé, en cas de diminution de la production du Dpp de la bande autonome, la synthèse du Pcan^{NoDI} est elle aussi diminuée. Ainsi, le Dpp non-autonome pourrait entrer dans la poche afin de maintenir l'activation de la voie, nécessaire à la régionalisation et/ou à la croissance du disque. Pour la boucle formée par Dpp et l'isoforme Pcan^{DI-}, il est aussi tentant de spéculer sur son rôle de tampon dans l'activation de la voie Dpp dans la poche du disque d'aile. En cas de décroissance de l'activation de la voie Dpp (pour une raison ou pour une autre), le niveau d'expression du Pcan^{DI-} augmenterait, ce qui permettrait en retour de favoriser l'activation de la voie pour, par exemple, maintenir la régionalisation de la poche.

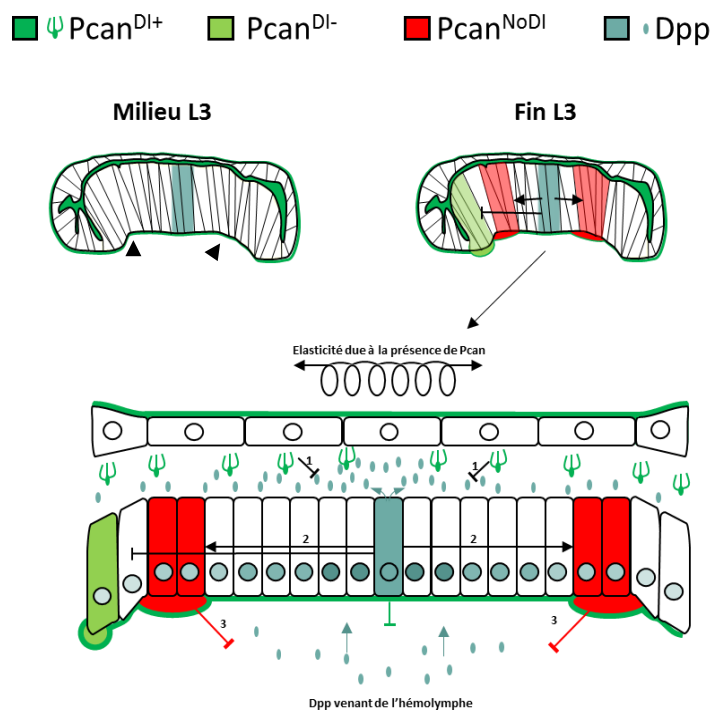


Figure 31 : Les fonctions des isoformes du Pcan dans le disque imaginal d'aile.

Redondance avec d'autres composants de la MB

Outre la redondance partielle avec la fine couche de Pcan observée lorsque l'on abolit l'expression de toutes les sources du Pcan (Bonche ; Chessel et al., en préparation), l'effet modéré de la déplétion des quadrants sur la voie Dpp et sur la mécano-régulation pourrait aussi être imputable à une redondance avec d'autres facteurs. Le Collagène XVIII constitue un candidat sérieux. Premièrement, il s'agit aussi d'un PGSH sécrété déposé dans les MBs. Deuxièmement, il a déjà été montré chez les vertébrés qu'il existait une redondance entre le Pcan et le Col XVIII, probablement d'ordre mécanique (Rossi et al., 2003). Enfin, nous avons récemment découvert que le ColXVIII s'accumulait au niveau de trois des quatre quadrants de Pcan (nos résultats non publiés). A l'avenir, nous souhaitons donc tester cette redondance et déplétant simultanément le Pcan^{NoDI} et le ColXVIII dans la poche. En outre, même s'il ne montre pas d'accumulation particulière dans les quadrants, le ColIV constitue aussi un excellent candidat dans le cadre de la fonction chémo-régulatrice du Pcan. Il a déjà été démontré chez la drosophile qu'il interagissait physiquement avec le Dpp et régulait positivement ou négativement l'activation de sa voie dans l'ovaire, l'embryon et l'intestin (Sawala et al., 2012, 2015; Tian and Jiang, 2014; Wang et al., 2008). Il n'est donc pas exclu qu'il agisse aussi sur Dpp dans le disque imaginal d'aile. Nous nous demandons aussi si l'interaction directe entre le Col IV et Pcan peut faire émerger ou bien masquer des épitopes susceptibles de lier Dpp. Ainsi, il faudrait considérer que Pcan et Col IV n'agissent pas séparément mais en tant que complexe régulateur de Dpp.

De la nature de l'interaction Pcan-Dpp

Même si nous avons démontré qu'une manipulation de Pcan *in vivo* affectait le DppHA extracellulaire, il n'en reste pas moins une interrogation : quelle est la nature biochimique de l'interaction Pcan-Dpp ? Même si l'hypothèse précédente concernant un complexe Pcan-Col IV s'avérait juste, il faudrait tout de même identifier l'isoforme de Pcan impliquée. Certains indices laissent penser à une interaction SH-dépendante. En effet, les isoformes Pcan^{DI+} et Pcan^{DI-} ont des effets opposés sur la voie Dpp. Or, la différence entre elles pourrait résider dans la sulfatation de leurs chaînes SH. Il a été démontré *in vitro* que ce processus détermine la nature biochimique (sites de liaison/affinité) de l'interaction chaînes SH/morphogènes (Ashikari-Hada et al., 2004). Dans notre cas, la différence de sulfatation des chaînes SH des Pcan^{DI+} et Pcan^{DI-} pourrait donc modifier la nature biochimique de l'interaction Pcan-Dpp, et par conséquent déterminer l'activité positive ou négative du Pcan sur Dpp. En outre, il a été montré chez les vertébrés que BMP 2, orthologue de Dpp, interagissait avec les chaînes SH du domaine I de Pcan (DeCarlo et al., 2012). Cependant, il ne faut pas perdre de vue que le domaine I n'est peut-être pas le seul à arborer des chaînes SH. Le domaine V des vertébrés en possède (Brown et al., 1997; Friedrich et al., 1999), et la sulfatation sur ce domaine est clairement augmentée chez des souris *Hspg^{A3/A3}*, possédant un Pcan dont le domaine I est dépourvu de site d'attachement aux chaînes SH (Morita et al., 2005) .

Nous avons aussi constaté la présence de site d'attachement à ces chaînes SH au sein de ce domaine chez la drosophile. Ces hypothétiques chaînes SH pourraient d'ailleurs expliquer l'interaction Pcan^{NoDI} – Dpp que nous avons mis en évidence. Cette liaison pourrait aussi s'effectuer via le cœur protéique, de manière analogue à la liaison Dally-Dpp (Kirkpatrick et al., 2006). Dans tous les cas, nous prévoyons d'utiliser les cellules S2 de drosophile afin de déterminer *in vitro*, dans un premier temps, les sites de liaison de Dpp à Pcan. Pour cela, nous co-exprimerons un Dpp-GFP avec des domaines recombinants du Pcan ancrés à la membrane plasmique des cellules et nous quantifierons l'accumulation membranaire du Dpp-GFP. Dans un second temps, nous muterons *in vivo* les sites d'interactions identifiées grâce au système CRISPR/Cas9 et nous visualiserons les conséquences de ces mutations sur l'activité de la voie Dpp dans la poche du disque d'aile.

Vers d'autres modèles...

Hormis Dpp, Pcan pourrait aussi réguler d'autres morphogènes dans le disque imaginal d'aile. Il a notamment été montré qu'il existait des interactions entre Pcan et Hh dans le cerveau et la glande lymphatique (Grigorian et al., 2013; Park et al., 2003). Même si nous ne l'avons pas caractérisé, Pcan a apparemment un effet sur la voie Hh, car la transcription de *dpp*, qui est Hh-dépendante, est diminuée en condition de perte-de-fonction pour Pcan. En outre, les quadrants autonomes, de par leur localisation, pourraient aussi influencer Wg. En effet, le Pcan des vertébrés est censé lier WNT (cf Introduction II.C.2). Enfin, tout comme dans le cerveau (Park et al., 2003), le Pcan pourrait aussi affecter Branchless (orthologue de FGF2) dans le disque d'aile. Outre l'effet que pourrait avoir Pcan sur d'autres morphogènes du disque d'aile, il serait aussi intéressant d'utiliser d'autres tissus afin de voir si le rôle chémo-régulateur du Pcan dans la morphogénèse est globale. Par exemple, le disque imaginal d'œil pourrait constituer un bon modèle pour y tester l'existence de la boucle Pcan/Dpp que nous avons mise en évidence, ou bien l'interaction potentielle entre Pcan et Hh, puisque Dpp et Hh sont présents dans ce tissu et participent à sa morphogénèse. Ce disque d'œil pourrait d'ailleurs se révéler être un outil précieux dans l'étude du rôle chémo-régulateur du Pcan. En effet, les adultes « rescapés » porteur de l'allèle *pcan* *JO271#49* ont tous des défauts au niveau des yeux...

De même, l'intestin pourrait aussi constituer un modèle d'étude fructueux pour la boucle Dpp/Pcan. Non seulement le Dpp de ce tissu a un rôle dans le déclenchement de la métamorphose (Denton et al., 2018), mais sa MB servirait aussi de barrière vis-à-vis de ce morphogène (Tian and Jiang, 2014). Tian et Jiang ont en effet montré que le Col IV permet de restreindre l'activité de la voie Dpp à la niche des cellules souches intestinales en limitant la diffusion du Dpp extracellulaire. De surcroît, une autre équipe a prouvé qu'une perte du Pcan produit par ces cellules souches menait ces dernières à se détacher de la MB et à perdre leur identité et leur capacité à proliférer (You et al., 2014). Cette étude n'a cependant pas vérifié l'activité de la voie Dpp en absence du Pcan. Au final, ces différents travaux montrent que

la MB est requise pour faire de la niche un environnement favorable au maintien des cellules souches intestinales. Il apparait donc que l'intestin pourrait être utilisé en parallèle du disque imaginal d'aile pour mieux comprendre les interactions entre Pcan et Dpp, ce dernier ayant apparemment les mêmes comportements qu'au sein du disque. En effet, il peut agir au sein même du tissu ou bien en tant que médiateur de la communication inter-organe, en modulant la production d'ecdysone au niveau de la « ring gland » (Denton et al., 2018; Setiawan et al., 2018). La caractérisation de ce tissu en termes d'isoformes de Pcan est cependant un prérequis avant de pouvoir utiliser ce modèle.

Conclusions & Perspectives

A l'issu de mes travaux de thèse, j'ai démontré que le Pcan était une cheville ouvrière de la morphogénèse. L'aspect modulaire de ce PGSH est parfaitement illustré par ses isoformes, qui lui permettent d'être un « couteau suisse » moléculaire. Au sein des MBs, le Pcan peut, grâce à elles, à la fois réguler la tension de ces dernières et interagir avec des ligands de signalisation, garantissant ainsi un environnement favorable à la morphogénèse des tissus.

Alors que la littérature présentait des exemples à sens unique, dans lesquels soit la MB régule les morphogènes, soit les morphogènes régulent la production des composants de la MB, j'ai révélé le caractère intégré de ces deux processus. J'ai mis en évidence un couplage rétroactif entre la MB et les morphogènes en prenant comme paradigme le Pcan et Dpp. Je suis convaincu que de tels boucles de régulations existent non seulement entre Pcan et d'autres morphogènes, mais aussi entre ces derniers et les autres composants des MBs. Une étude *in vivo* systématique devrait permettre de les mettre à jour en utilisant des organismes modèles tels que la drosophile ou bien le poisson-zèbre, premier modèle *in vivo* dans lequel il a été montré que la transcription des composants de la MB était régulée par les morphogènes (Guillon et al., 2016; Pickering et al., 2017). L'analyse poussée de ce couplage devrait permettre, à l'avenir, une meilleure compréhension de la morphogénèse.

De tels travaux en biologie du développement serviront aussi à mieux comprendre les pathologies associées non seulement aux composants des MBs, mais aussi aux morphogènes. Si nous reprenons le cas du couple Pcan/Dpp, l'étude de leurs interactions pourrait permettre de mieux comprendre l'étiologie des syndromes liés au Pcan, le DDSH et le SJS. Les BMP 2/4 jouant un rôle essentiel dans le développement ostéoarticulaire (Lacombe, 1997), l'absence de Pcan dans la matrice ostéocartilagineuse des patients atteints de ces maladies pourrait altérer leur signalisation durant le développement du squelette, ce qui expliquerait en partie la chondrodysplasie observée chez ces individus. L'utilisation des modèles murins dépourvus de Pcan permettrait de vérifier cette hypothèse. Si elle se confirme, un traitement à base de BMP 2/4 pourrait être envisagé. Un des problèmes majeurs concerne le moyen par lequel délivrer le BMP aux cellules cibles. Et la solution aurait un nom : Pcan. Il a en effet été démontré que le domaine I du Pcan peut être utilisé afin de délivrer du BMP 2 recombinant à des cellules souches osseuses de souris en culture, ce qui a pour effet de stimuler la régénération osseuse (Chiu et al., 2016; Jha et al., 2009).

Ce lien pourrait aussi fournir des éclaircissements sur les causes des maladies liées aux BMP 2/4. Ces BMP ont notamment été impliqués dans les adénocarcinomes oesophagiques. Il a même été démontré qu'une suractivation de la voie BMP 4 faisait partie de l'étiologie du syndrome de l'œsophage de Barret (Castillo et al., 2012). Cette affection précancéreuse se caractérise par un changement de morphologie

de l'épithélium de l'œsophage : normalement squameuse, les cellules deviennent colonnaires et métaplasique, favorisant ainsi l'apparition du cancer (Nakagawa et al., 2015). Nos travaux sur le rôle de l'interaction Pcan/Dpp dans l'élongation apico-basale des cellules pourraient fournir un début d'explication et, peut-être, une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre de cette maladie.

Bibliographie

- Abbott, L.A., and Natzle, J.E. (1992). Epithelial polarity and cell separation in the neoplastic l(1)dlg-1 mutant of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 37, 43–56.
- Abe, H., Matsubara, T., Iehara, N., Nagai, K., Takahashi, T., Arai, H., Kita, T., and Doi, T. (2004). Type IV Collagen Is Transcriptionally Regulated by Smad1 under Advanced Glycation End Product (AGE) Stimulation. *J. Biol. Chem.* 279, 14201–14206.
- Abrahamson, D.R., Hudson, B.G., Stroganova, L., Borza, D.B., and St. John, P.L. (2009). Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1471–1479.
- Abrams, E.W., and Andrew, D.J. (2002). Prolyl 4-hydroxylase a-related proteins in *Drosophila melanogaster*: tissue-specific embryonic expression of the 99F8-9 cluster. *112*, 1–7.
- Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M., and Gehring, W.J. (1994). The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development* 120, 743–753.
- Aigouy, B., Umetsu, D., and Eaton, S. (2016). Segmentation and quantitative analysis of epithelial tissues. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 227–239.
- Aikio, M., Elamaa, H., Vicente, D., Izzi, V., Kaur, I., Seppinen, L., Speedy, H.E., Kaminska, D., Kuusisto, S., Sormunen, R., et al. (2014). Specific collagen XVIII isoforms promote adipose tissue accrual via mechanisms determining adipocyte number and affect fat deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111.
- Akiyama, T., and Gibson, M.C. (2015). Decapentaplegic and growth control in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 527, 375–378.
- Akiyama, T., Kamimura, K., Firkus, C., Takeo, S., Shimmi, O., and Nakato, H. (2008). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation by stabilizing Dpp on the cell surface. *Dev. Biol.* 313, 408–419.
- Aldaz, S., Escudero, L.M., and Freeman, M. (2013). Dual role of myosin II during *Drosophila* imaginal disc metamorphosis. *Nat. Commun.* 4, 1761.
- Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 113, 673–676.
- Añazco, C., López-Jiménez, A.J., Rafi, M., Vega-Montoto, L., Zhang, M.Z., Hudson, B.G., and Vanacore, R.M. (2016). Lysyl oxidase-like-2 cross-links collagen IV of glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem.* 291, 25999–26012.
- Anderson, E.N., and Wharton, K.A. (2017). Alternative cleavage of the bone morphogenetic protein (BMP), Gbb, produces ligands with distinct developmental functions and receptor preferences. *J. Biol. Chem.* 292, 19160–19178.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 23, 354–358.
- Arikawa-Hirasawa, E., Wilcox, W.R., Le, A.H., Silverman, N., Govindraj, P., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (2001). Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nat. Genet.* 27, 431–434.
- Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., and Yamada, Y. (2002). Absence of

- acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat. Neurosci.* 5, 119–123.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C.R. (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163, 203–215.
- Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., Itoh, N., Reddi, A.H., and Kimata, K. (2004). Characterization of Growth Factor-binding Structures in Heparin/Heparan Sulfate Using an Octasaccharide Library. *J. Biol. Chem.* 279, 12346–12354.
- Aumailley, M., Wiedmann, H., Mann, K., and Timpl, R. (1989). Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* 184, 241–248.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., and Fox, J.W. (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int.* 43, 7–12.
- Bader, B.L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkapati, S., Murshed, M., and Nischt, R. (2005). Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6846–6856.
- Baena-Lopez, L.A., Nojima, H., and Vincent, J.P. (2012). Integration of morphogen signalling within the growth regulatory network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 166–172.
- Baena-López, L.A., Pastor-Pareja, J.C., and Resino, J. (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* 130, 6497–6506.
- Balasubramani, M., Schreiber, E.M., Candiello, J., Balasubramani, G.K., Kurtz, J., and Halfter, W. (2010). Molecular interactions in the retinal basement membrane system: A proteomic approach. *Matrix Biol.* 29, 471–483.
- Bangi, E., and Wharton, K. (2006). Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *Dev. Biol.* 295, 178–193.
- Bangratz, M., Sarrazin, N.N., Devaux, J.J., Zambroni, D., Echaniz-Laguna, A., René, F., Boërio, D., Davoine, C.-S.S., Fontaine, B., Feltri, M.L., et al. (2012). A mouse model of Schwartz-Jampel syndrome reveals myelinating Schwann cell dysfunction with persistent axonal depolarization in vitro and distal peripheral nerve hyperexcitability when perlecan is lacking. *Am. J. Pathol.* 180, 2040–2055.
- Barrio, L., and Milán, M. (2017). Boundary Dpp promotes growth of medial and lateral regions of the *Drosophila* wing. *Elife* 6.
- Barrio, R., and De Celis, J.F. (2004). Regulation of spalt expression in the *Drosophila* wing blade in response to the Decapentaplegic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Basu, R., and Chang, F. (2007). Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 88–94.
- Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M., and Timpl, R. (1992). Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur. J. Biochem.* 208, 359–366.
- Behrens, D.T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., and Hansen, U. (2012). The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J. Biol. Chem.* 287, 18700–18709.
- Belenkaya, T.Y., Han, C., Yan, D., Opoka, R.J., Khodoun, M., Liu, H., and Lin, X. (2004). *Drosophila*

- Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell* *119*, 231–244.
- Besse, F., Mertel, S., Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Sigrist, S.J., and Ephrussi, A. (2007). The Ig cell adhesion molecule Basigin controls compartmentalization and vesicle release at *Drosophila* melanogaster synapses. *J. Cell Biol.* *177*, 843–855.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 3312–3317.
- Bix, G., and Iozzo, R. V (2008). Novel interactions of perlecan: unraveling perlecan's role in angiogenesis. *Microsc. Res. Tech.* *71*, 339–348.
- Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E.M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Kim, J.K., Höök, M., et al. (2004). Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J. Cell Biol.* *166*, 97–109.
- Blair, S.S. (2007). Wing Vein Patterning in *Drosophila* and the Analysis of Intercellular Signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 293–319.
- Van De Bor, V., Zimniak, G., Papone, L., Cerezo, D., Malbouyres, M., Juan, T., Ruggiero, F., and Noselli, S. (2015). Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Rep.* *13*, 546–560.
- Borchiellini, C., Coulon, J., and Le Parco, Y. (1996). The function of type IV collagen during *Drosophila* muscle development. *Mech. Dev.* *58*, 179–191.
- Bork, P., and Patthy, L. (1995). The SEA module: A new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci.* *4*, 1421–1425.
- Bornemann, D.J., Duncan, J.E., Staatz, W., Selleck, S., and Warrior, R. (2004). Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* *131*, 1927–1938.
- Borza, D.B., Bondar, O., Ninomiya, Y., Sado, Y., Naito, I., Todd, P., and Hudson, B.G. (2001). The NC1 Domain of Collagen IV Encodes a Novel Network Composed of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ Chains in Smooth Muscle Basement Membranes. *J. Biol. Chem.* *276*, 28532–28540.
- Bosch, P.S., Ziukaite, R., Alexandre, C., Basler, K., and Vincent, J.-P. (2017). Dpp controls growth and patterning in *Drosophila* wing precursor through distinct modes of action. *Elife* *6*, 1–16.
- Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E., and Hudson, B.G. (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.* *275*, 30716–30724.
- Bowman, W. (1840). On the Minute Structure and Movements of Voluntary Muscle. *Philos. Trans. R. Soc. London* *130*, 457–501.
- Brankatschk, M., and Eaton, S. (2010). Lipoprotein Particles Cross the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*. *J. Neurosci.* *30*, 10441–10447.
- Brown, J.C., Wiedemann, H., and Timpl, R. (1994). Protein binding and cell adhesion properties of two laminin isoforms (AmB1eB2e, AmB1sB2e) from human placenta. *J. Cell Sci.* *107*, 329–338.
- Brown, J.C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997). The C-Terminal Domain V of Perlecan Promotes $\beta 1$ Integrin-Mediated Cell Adhesion, Binds Heparin, Nidogen and Fibulin-2 and

Can be Modified by Glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* 250, 39–46.

Brown, K.L., Cummings, C.F., Vanacore, R.M., and Hudson, B.G. (2017). Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells. *Protein Sci.* 26, 2151–2161.

Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H., and Skaer, H. (2010). Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 19, 296–306.

Burgess, R.W., Skarnes, W.C., and Sanes, J.R. (2000). Agrin isoforms with distinct amino termini: Differential expression, localization, and function. *J. Cell Biol.* 151, 41–52.

Burke, R., and Basler, K. (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. *Development* 122, 2261–2269.

Capdevila, J., and Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.*

Castillo, D., Puig, S., Iglesias, M., Seoane, A., de Bolós, C., Munitiz, V., Parrilla, P., Comerma, L., Poulson, R., Krishnadath, K.K., et al. (2012). Activation of the BMP4 Pathway and Early Expression of CDX2 Characterize Non-specialized Columnar Metaplasia in a Human Model of Barrett's Esophagus. *J. Gastrointest. Surg.* 16, 227–237.

De Celis, J.F., and Barrio, R. (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech. Dev.* 91, 31–41.

De Celis, J.F., Barrio, R., and Kafatos, F.C. (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* 126, 2653–2662.

Chang, T.T., Thakar, D., and Weaver, V.M. (2017). Force-dependent breaching of the basement membrane. *Matrix Biol.* 57–58, 178–189.

Cheng, Y.S., Champlaud, M.F., Burgeson, R.E., Marinkovich, M.P., and Yurchenco, P.D. (1997). Self-assembly of laminin isoforms. *J. Biol. Chem.* 272, 31525–31532.

Chiu, Y.C., Fong, E.L., Grindel, B.J., Kasper, F.K., Harrington, D.A., and Farach-Carson, M.C. (2016). Sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from perlecan domain I - Functionalized electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds for bone regeneration. *J. Exp. Orthop.* 3, 1–10.

Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J.L., Arias, L., Lamiré, L.A., Boudaoud, A., and Grammont, M. (2017). Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Dev.* 144, 4350–4362.

Cho, J.Y., Chak, K., Andreone, B.J., Wooley, J.R., and Kolodkin, A.L. (2012). The extracellular matrix proteoglycan perlecan facilitates transmembrane semaphorin-mediated repulsive guidance. *Genes Dev.* 26, 2222–2235.

Chu, C.L., Goerges, A.L., and Nugent, M.A. (2005). Identification of common and specific growth factor binding sites in heparan sulfate proteoglycans. *Biochemistry* 44, 12203–12213.

Chung, A., Freeman, I.L., and Braginski, E. (1977). A NOVEL EXTRACELLULAR MEMBRANE ELABORATED BY A MOUSE EMBRYONAL CARCINOMA-DERIVED CELL LINE. 79.

Cohen, I.R., Grassel, S., Murdoch, A.D., and Iozzo, R. V (1993). Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter (heparan sulfate/proteoglycan/basement membrane). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10404–10408.

- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Léopold, P. (2003). A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell* *114*, 739–749.
- Conley, C.A., Silburn, R., Singer, M.A., Ralston, A., Rohwer-Nutter, D., Olson, D.J., Gelbart, W., and Blair, S.S. (2000). Crossveinless 2 contains cysteine-rich domains and is required for high levels of BMP-like activity during the formation of the cross veins in *Drosophila*. *Development* *127*, 3947–3959.
- Cook, O., Biehs, B., and Bier, E. (2004). Brinker and optomotor-blind act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development* *131*, 2113–2124.
- Costell, M., Sasaki, T., Mann, K., Yamada, Y., and Timpl, R. (1996). Structural characterization of recombinant domain II of the basement membrane proteoglycan perlecan. *FEBS Lett.* *396*, 127–131.
- Costell, M., Mann, K., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997). Characterization of recombinant perlecan domain I and its substitution by glycosaminoglycan and oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* *243*, 115–121.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fässler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.* *147*, 1109–1122.
- Couchman, J.R., Kapoor, R., Sthanam, M., and Wu, R.R. (1996). Perlecan and basement membrane-chondroitin sulfate proteoglycan (bamacan) are two basement membrane chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix. *J. Biol. Chem.* *271*, 9595–9602.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D.Y., Fletcher, D.A., and Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife* *6*, 1–16.
- Crozatier, M., Glise, B., and Vincent, A. (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser. *Development* *129*, 4261–4269.
- Cummings, C.F., Pedchenko, V., Brown, K.L., Colon, S., Rafi, M., Jones-Paris, C., Pokydeshava, E., Liu, M., Pastor-Pareja, J.C., Stothers, C., et al. (2016). Extracellular chloride signals collagen IV network assembly during basement membrane formation. *J. Cell Biol.* *213*, 479–494.
- Dai, J., Ma, M., Feng, Z., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Inter-adipocyte Adhesion and Signaling by Collagen IV Intercellular Concentrations in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *27*, 2729-2740.e4.
- Dai, J., Estrada, B., Jacobs, S., Sánchez-Sánchez, B.J., Tang, J., Ma, M., Magadán-Corpas, P., Pastor-Pareja, J.C., and Martín-Bermudo, M.D. (2018). Dissection of Nidogen function in *Drosophila* reveals tissue-specific mechanisms of basement membrane assembly.
- Daley, W.P., Gervais, E.M., Centanni, S.W., Gulfo, K.M., Nelson, D.A., and Larsen, M. (2012). ROCK1-directed basement membrane positioning coordinates epithelial tissue polarity. *Development* *139*, 411–422.
- Darnell, D.K., Stanislaw, S., Kaur, S., and Antin, P.B. (2010). Whole mount in situ hybridization detection of mRNAs using short LNA containing DNA oligonucleotide probes. *Rna* *16*, 632–637.
- Datta, S. (1995). Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development* *121*, 1173–1182.
- Datta, M.W., Hernandez, A.M., Schlicht, M.J., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Dhir, R., Shah, R.B., Farach-Carson, C., Barrett, A., and Datta, S. (2006a). Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway. *Mol. Cancer* *5*, 1–15.

- Datta, S., Pierce, M., and Datta, M.W. (2006b). Perlecan signaling: Helping hedgehog stimulate prostate cancer growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1855–1861.
- DeCarlo, A.A., Belousova, M., Ellis, A.L., Petersen, D., Grenett, H., Hardigan, P., O’Grady, R., Lord, M., Whitelock, J.M., O’Grady, R., et al. (2012). Perlecan domain 1 recombinant proteoglycan augments BMP-2 activity and osteogenesis. *BMC Biotechnol.* *12*, 60.
- Delgado, I., and Torres, M. (2017). Coordination of limb development by crosstalk among axial patterning pathways. *Dev. Biol.* *429*, 382–386.
- Denef, N., Chen, Y.Y., Weeks, S.D., Barcelo, G., and Schüpbach, T. (2008). Crag Regulates Epithelial Architecture and Polarized Deposition of Basement Membrane Proteins in *Drosophila*. *Dev. Cell* *14*, 354–364.
- Denton, D., Xu, T., Dayan, S., Nicolson, S., and Kumar, S. (2018). Dpp regulates autophagy-dependent midgut removal and signals to block ecdysone production. *Cell Death Differ.* *26*, 763–778.
- Denzer, A.J., Schulthess, T., Fauser, C., Schumacher, B., Kammerer, R.A., Engel, J., and Ruegg, M.A. (1998). Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO J.* *17*, 335–343.
- Devergne, O., Tsung, K., Barcelo, G., and Schüpbach, T. (2014). Polarized deposition of basement membrane proteins depends on Phosphatidylinositol synthase and the levels of Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7689–7694.
- Devergne, O., Sun, G.H., and Schüpbach, T. (2017). Stratum, a Homolog of the Human GEF Mss4, Partnered with Rab8, Controls the Basal Restriction of Basement Membrane Proteins in Epithelial Cells. *Cell Rep.* *18*, 1831–1839.
- Díaz de la Loza, M.C., Díaz-Torres, A., Zurita, F., Rosales-Nieves, A.E., Moeendarbary, E., Franze, K., Martín-Bermudo, M.D., and González-Reyes, A. (2017). Laminin Levels Regulate Tissue Migration and Anterior-Posterior Polarity during Egg Morphogenesis in *Drosophila*. *Cell Rep.* *20*, 211–223.
- Dogterom, M., and Koenderink, G.H. (2019). Actin–microtubule crosstalk in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 38–54.
- Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B., and Hassell, J.R. (1997). Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* *272*, 4316–4322.
- Domínguez-Giménez, P., Brown, N.H., Martín-Bermudo, M.D., Dominguez-Gimenez, P., Brown, N.H., and Martin-Bermudo, M.D. (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *J. Cell Sci.* *120*, 1061–1071.
- Doumpas, N., Ruiz-Romero, M., Blanco, E., Edgar, B., Corominas, M., and Teleman, A.A. (2013). Brk regulates wing disc growth in part via repression of Myc expression. *EMBO Rep.* *14*, 261–268.
- Dragojlovic-Munther, M., and Martinez-Agosto, J.A. (2013). Extracellular matrix-modulated Heartless signaling in *Drosophila* blood progenitors regulates their differentiation via a Ras/ETS/FOG pathway and target of rapamycin function. *Dev. Biol.* *384*, 313–330.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farnsdale, R.W., Barnes, M.J., and Liddington, R.C. (2000). Structural basis of Collagen Recognition by Integrins $\alpha 2\beta 1$. *Cell* *101*, 47–56.
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P., and Weller, R.O. (2017). The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat. Immunol.* *18*, 123–131.
- Entchev, E. V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient Formation of the TGF β

Homolog Dpp. *Cell* *103*, 981–991.

Esco, J.D., and Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *6*, 663–670.

Ettner, N., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K., and Timpl, R. (1998). The N-terminal globular domain of the laminin $\alpha 1$ chain binds to $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett.* *430*, 217–221.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.

Farach-Carson, M.C., Warren, C.R., Harrington, D.A., and Carson, D.D. (2014). Border patrol: Insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biol.* *34*, 64–79.

Ferguson, E.L., and Anderson, K. V. (1992). decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* *71*, 451–461.

Ferreira, A., and Milán, M. (2015). Dally proteoglycan mediates the autonomous and nonautonomous effects on tissue growth caused by activation of the PI3K and TOR pathways. *PLoS Biol.* *13*, 1–28.

Fletcher, G.C., Diaz-de-la-Loza, M. del C., Borreguero-Muñoz, N., Holder, M., Aguilar-Aragon, M., and Thompson, B.J. (2018). Mechanical strain regulates the Hippo pathway in *Drosophila*. *Dev.* *145*.

Fox, J.W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., and Engel, J. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* *10*, 3137–3146.

Friedrich, M. V, Schneider, M., Timpl, R., and Baumgartner, S. (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *Eur. J. Biochem.* *267*, 3149–3159.

Friedrich, M.V.K., Göhring, W., Mörgelin, M., Brancaccio, A., David, G., and Timpl, R. (1999). Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J. Mol. Biol.* *294*, 259–270.

Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S., and Nakato, H. (2003). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* *130*, 1515–1522.

Fukumoto, S., Miner, J.H., Ida, H., Fukumoto, E., Yuasa, K., Miyazaki, H., Hoffman, M.P., and Yamada, Y. (2006). Laminin $\alpha 5$ is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J. Biol. Chem.* *281*, 5008–5016.

Funk, S.D., Lin, M.H., and Miner, J.H. (2018). Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the glomerular basement membrane. *Matrix Biol.* *71–72*, 250–261.

Gao, S., Steffen, J., and Laughon, A. (2005). Dpp-responsive silencers are bound by a trimeric Mad-Medea complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 36158–36164.

Gautam, J., Zhang, X., and Yao, Y. (2016). The role of pericytic laminin in blood brain barrier integrity maintenance. *Sci. Rep.* *6*, 1–13.

Gervais, E.M., Sequeira, S.J., Wang, W., Abraham, S., Kim, J.H., Leonard, D., DeSantis, K.A., and Larsen, M. (2016). Par-1b is required for morphogenesis and differentiation of myoepithelial cells during salivary gland development. *Organogenesis* *12*, 194–216.

Gesemann, M., Brancaccio, A., Schumacher, B., and Ruegg, M.A. (1998). Agrin is a high-affinity

- binding protein of dystroglycan in non-muscle tissue. *J. Biol. Chem.* 273, 600–605.
- Gibson, M.C., and Perrimon, N. (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* (80-). 307, 1785–1789.
- Gibson, M.C., and Schubiger, G. (2000). Peripodial Cells Regulate Proliferation and Patterning of *Drosophila* Imaginal Discs. *Cell* 103, 343–350.
- Gibson, M.C., Lehman, D.A., and Schubiger, G. (2002). Lumenal Transmission of Decapentaplegic in *Drosophila* Imaginal Discs. *Dev. Cell* 3, 451–460.
- Gonzalez, E.M., Reed, C.C., Bix, G., Fu, J., Zhang, Y., Gopalakrishnan, B., Greenspan, D.S., and Iozzo, R. V. (2005). BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J. Biol. Chem.* 280, 7080–7087.
- Govindraj, P., West, L., Koob, T.J., Neame, P., Doege, K., and Hassell, J.R. (2002). Isolation and identification of the major heparan sulfate proteoglycans in the developing bovine rib growth plate. *J. Biol. Chem.* 277, 19461–19469.
- Goyal, A., Pal, N., Concannon, M., Paul, M., Doran, M., Poluzzi, C., Sekiguchi, K., Whitelock, J.M., Neill, T., and Iozzo, R. V. (2011). Endorepellin, the angiostatic module of perlecan, interacts with both the $\alpha 2\beta 1$ integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2): A dual receptor antagonism. *J. Biol. Chem.* 286, 25947–25962.
- Graham, P.L., Johnson, J.J., Wang, S., Sibley, M.H., Gupta, M.C., and Kramer, J.M. (1997). Type IV collagen is detectable in most, but not all, basement membranes of *Caenorhabditis elegans* and assembles on tissues that do not express it. *J. Cell Biol.* 137, 1171–1183.
- Grigorian, M., Liu, T., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2013). The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *Dev. Biol.* 384, 301–312.
- Grimm, S., and Pflugfelder, G.O. (1996). Control of the gene *optomotor-blind* in *drosophila* wing development by *decapentaplegic* and *wingless*. *Science* (80-). 271, 1601–1604.
- Groffen, A.J., Hop, F.W., Tryggvason, K., Dijkman, H., Assmann, K.J., Veerkamp, J.H., Monnens, L.A., and Van den Heuvel, L.P. (1997). Evidence for the existence of multiple heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane and mesangial matrix. *Eur. J. Biochem.* 247, 175–182.
- Gubbiotti, M.A., Neill, T., and Iozzo, R. V (2017). A current view of perlecan in physiology and pathology: A mosaic of functions. *Matrix Biol.* 285–298.
- Guillon, E., Breaud, S., and Ruggiero, F. (2016). Slow Muscle Precursors Lay Down a Collagen XV Matrix Fingerprint to Guide Motor Axon Navigation. *J. Neurosci.* 36, 2663–2676.
- Gupta, M.C., Graham, P.L., and Kramer, J.M. (1997). Characterization of $\alpha 1(IV)$ collagen mutations in *Caenorhabditis elegans* and the effects of $\alpha 1$ and $\alpha 2(IV)$ mutations on type IV collagen distribution. *J. Cell Biol.* 137, 1185–1196.
- Gustafsson, E., Aszódi, A., Ortega, N., Hunziker, E., Denker, H.-W., Werb, Z., and Fässler, R. (2003). Role of Collagen Type II and Perlecan in Skeletal Development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 140–150.
- Haigo, S.L., and Bilder, D. (2011). Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science* (80-). 1071–1074.
- Hamano, Y., and Kalluri, R. (2005). Tumstatin, the NC1 domain of $\alpha 3$ chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 333, 292–298.

Hamaratoglu, F., de Lachapelle, A.M., Pyrowolakis, G., Bergmann, S., and Affolter, M. (2011). Dpp signaling activity requires pentagone to scale with tissue size in the growing drosophila wing imaginal disc. *PLoS Biol.* 9.

Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Pyrowolakis, G. (2014). Dpp/BMP signaling in flies: From molecules to biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 32, 128–136.

Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 159–163.

Harmansa, S., Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Caussinus, E. (2015). Dpp spreading is required for medial but not for lateral wing disc growth. *Nature* 527, 317–322.

Harmansa, S., Alborelli, I., Bieli, D., Caussinus, E., and Affolter, M. (2017). A nanobody-based toolset to investigate the role of protein localization and dispersal in *Drosophila*. *Elife* 6, 1–22.

Hartl, T.A., and Scott, M.P. (2014). Wing tips: The wing disc as a platform for studying Hedgehog signaling. *Methods* 68, 199–206.

Hassell, J.R., Robey, P.G., Barrach, H.J., Wilczek, J., Rennard, S.I., and Martin, G.R. (1980). Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 4494–4498.

Heljasvaara, R., Aikio, M., Ruotsalainen, H., and Pihlajaniemi, T. (2017). Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation — Lessons learned from model organisms and human patients. *Matrix Biol.* 57–58, 55–75.

Heller, D., Hoppe, A., Restrepo, S., Gatti, L., Tournier, A.L., Tapon, N., Basler, K., and Mao, Y. (2016). EpiTools: An Open-Source Image Analysis Toolkit for Quantifying Epithelial Growth Dynamics. *Dev. Cell* 36, 103–116.

Henchcliffe, C., Garcia-Alonso, L., Tang, J., and Goodman, C.S. (1993). Genetic analysis of laminin A reveals diverse functions during morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 118, 325–337.

Herranz, H., Weng, R., and Cohen, S.M.M. (2014). Crosstalk between Epithelial and Mesenchymal Tissues in Tumorigenesis and Imaginal Disc Development. *Curr. Biol.* 24, 1476–1484.

Hiramatsu, R., Matsuoka, T., Kimura-Yoshida, C., Han, S.W., Mochida, K., Adachi, T., Takayama, S., and Matsuo, I. (2013). External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. *Dev. Cell* 27, 131–144.

Hohenester, E., and Yurchenco, P.D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh. Migr.* 7, 56–63.

Hollfelder, D., Frasch, M., and Reim, I. (2014). Distinct functions of the laminin β LN domain and collagen IV during cardiac extracellular matrix formation and stabilization of alary muscle attachments revealed by EMS mutagenesis in *Drosophila*. *BMC Dev. Biol.* 14, 26.

Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., et al. (1999). MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover MMP Unit cellular tools in embryonic development, in growth, in mammary involution, and in a number of diseases such. *Cell* 99, 81–92.

Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., and Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J.*

Biochem. 259, 917–925.

Hsiung, F., Ramirez-Weber, F.A., David Iwaki, D., and Kornberg, T.B. (2005). Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437, 560–563.

Hsu, J.C., Koo, H., Harunaga, J.S., Matsumoto, K., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2013). Region-specific epithelial cell dynamics during branching morphogenesis. *Dev. Dyn.* 242, 1066–1077.

Huang, C.C., Hall, D.H., Hedgecock, E.M., Kao, G., Karantza, V., Vogel, B.E., Hutter, H., Chisholm, A.D., Yurchenco, P.D., and Wadsworth, W.G. (2003). Laminin α subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130, 3343–3358.

Huang, D.-H., Chang, Y.-L., Yang, C.-C., Pan, I.-C., and King, B. (2002). pipsqueak Encodes a Factor Essential for Sequence-Specific Targeting of a Polycomb Group Protein Complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6261–6271.

Hummel, S., Osanger, A., Bajari, T.M., Balasubramani, M., Halfter, W., Nimpf, J., and Schneider, W.J. (2004). Extracellular matrices of the avian ovarian follicle: Molecular characterization of chicken perlecan. *J. Biol. Chem.* 279, 23486–23494.

Huzé, C., Bauché, S., Richard, P., Chevessier, F., Goillot, E., Gaudon, K., Ben Ammar, A., Chaboud, A., Grosjean, I., Lecuyer, H.-A.A., et al. (2009). Identification of an Agrin Mutation that Causes Congenital Myasthenia and Affects Synapse Function. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 155–167.

Hynes, R.O. (2012). The evolution of metazoan extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 196, 671–679.

Hynes, R.O., and Zhao, Q. (2000). Analysis The Evolution of Cell Adhesion. *J. Cell Biol.* 150, 89–95.

Ido, H., Harada, K., Futaki, S., Hayashi, Y., Nishiuchi, R., Natsuka, Y., Li, S., Wada, Y., Combs, A.C., Ervasti, J.M., et al. (2004). Molecular Dissection of the α -Dystroglycan- and Integrin-binding Sites within the Globular Domain of Human Laminin-10. *J. Biol. Chem.* 279, 10946–10954.

Inomata, T., Ebihara, N., Funaki, T., Matsuda, A., Watanabe, Y., Ning, L., Xu, Z., Murakami, A., and Arikawa-Hirasawa, E. (2012). Perlecan-deficient mutation impairs corneal epithelial structure. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 1277–1284.

Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1998). Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): Molecular characterization of Mothers against dpp, Medea, and Daughters against dpp. *Mol. Biol. Cell* 9, 2145–2156.

Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 42, 11–55.

Iozzo, R. V., Pillarisetti, J., Sharma, B., Murdoch, A.D., Danielson, K.G., Uitto, J., and Mauviel, A. (1997). Structural and Functional Characterization of the Human Perlecan Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 5219–5228.

Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S. (2015a). Building from the Ground up: Basement Membranes in *Drosophila* Development (Elsevier Ltd).

Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S. (2015b). Dynamic regulation of basement membrane protein levels promotes egg chamber elongation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 406, 212–221.

Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S. (2016). Rab10-Mediated Secretion Synergizes with Tissue Movement to Build a Polarized Basement Membrane Architecture for Organ Morphogenesis. *Dev. Cell* 38, 47–60.

- Ishihara, J., Ishihara, A., Fukunaga, K., Sasaki, K., White, M.J.V., Briquez, P.S., and Hubbell, J.A. (2018). Laminin heparin-binding peptides bind to several growth factors and enhance diabetic wound healing. *Nat. Commun.* *9*.
- Itoh, T., Ikeda, T., Gomi, H., Nakao, S., Suzuki, T., and Itohara, S. (1997). Unaltered secretion of β -amyloid precursor protein in gelatinase a (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* *272*, 22389–22392.
- Jarad, G., Cunningham, J., Shaw, A.S., and Miner, J.H. (2006). Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J. Clin. Invest.* *116*, 2–9.
- Jayadev, R., and Sherwood, D.R. (2017). Basement membranes. *Curr. Biol.* *27*, R207–R211.
- Jazwińska, A., Kirov, N., Wieschhaus, E., Roth, S., and Rushlow, C. (1999). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of *Dpp* target gene regulation. *Cell* *96*, 563–573.
- Jha, A.K., Yang, W., Kirn-Safran, C.B., Farach-Carson, M.C., and Jia, X. (2009). Perlecan domain I-conjugated, hyaluronic acid-based hydrogel particles for enhanced chondrogenic differentiation via BMP-2 release. *Biomaterials* *30*, 6964–6975.
- Jia, Y., Xu, R.-G., Ren, X., Ewen-Campen, B., Rajakumar, R., Zirin, J., Yang-Zhou, D., Zhu, R., Wang, F., Mao, D., et al. (2018). Next-generation CRISPR/Cas9 transcriptional activation in *Drosophila* using *flySAM*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 4719–4724.
- Jung, M., Lord, M.S., Cheng, B., Lyons, J.G., Alkhouri, H., Hughes, J.M., McCarthy, S.J., Iozzo, R.V., and Whitelock, J.M. (2013). Mast Cells Produce Novel Shorter Forms of Perlecan That Contain Functional Endorepellin A ROLE IN ANGIOGENESIS AND WOUND HEALING. *J. Biol. Chem.* *288*, 3289–3304.
- Kamimura, K., Ueno, K., Nakagawa, J., Hamada, R., Saitoe, M., and Maeda, N. (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* *200*, 219–233.
- Kane, N.S., Vora, M., Padgett, R.W., and Li, Y. (2018). *bantam* microRNA is a negative regulator of the *Drosophila* decapentaplegic pathway. *Fly (Austin)*. *12*, 105–117.
- Kanwar, Y.S., and Farquhar, M.G. (1979a). Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. *J. Cell Biol.* *81*, 137–153.
- Kanwar, Y.S., and Farquhar, M.G. (1979b). Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4493–4497.
- Kato, M., Wang, H., Bernfield, M., Gallagher, J.T., and Turnbull, J.E. (1994). Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains. *J. Biol. Chem.* *269*, 18881–18890.
- Ke, H., Feng, Z., Liu, M., Sun, T., Dai, J., Ma, M., Liu, L.P., Ni, J.Q., and Pastor-Pareja, J.C. (2018). Collagen secretion screening in *Drosophila* supports a common secretory machinery and multiple Rab requirements. *J. Genet. Genomics* *45*, 299–313.
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 457–473.
- Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiha, J., Kiss, A., Bircher, U., Szidonya, J., Maróy, P., Juhász, G., Komonyi, O., Csiszár, K., et al. (2012). *Drosophila* basement membrane collagen *col4a1* mutations cause severe myopathy. *Matrix Biol.* *31*, 29–37.

- Kelley, L.C., Lohmer, L.L., Hagedorn, E.J., and Sherwood, D.R. (2014). Traversing the basement membrane in vivo: A diversity of strategies. *J. Cell Biol.* *204*, 291–302.
- Kerever, A., Mercier, F., Nonaka, R., de Vega, S., Oda, Y., Zalc, B., Okada, Y., Hattori, N., Yamada, Y., and Arikawa-Hirasawa, E. (2014). Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res.* *12*, 492–505.
- Khalsa, O., Yoon, J., Torres-Schumann, S., and Wharton, K.A. (1998). TGF- β /BMP superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the *Drosophila* wing. *Develop* *125*, 1009–1010.
- Khoshnoodi, J., Cartailier, J.P., Alvares, K., Veis, A., and Hudson, B.G. (2006). Molecular recognition in the assembly of collagens: Terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J. Biol. Chem.* *281*, 38117–38121.
- Kicheva, A., Pantazis, P., Bollenbach, T., Kalaidzidis, Y., Bittig, T., Jülicher, F., and González-Gaitán, M. (2007). Kinetics of morphogen gradient formation. *Science* (80-). *315*, 521–525.
- Kiehart, D.P., and Feghali, R. (1986). Cytoplasmic myosin from *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* *103*, 1517–1525.
- Kim, S.N., Jeibmann, A., Halama, K., Witte, H.T., Wälte, M., Matzat, T., Schillers, H., Faber, C., Senner, V., Paulus, W., et al. (2014). ECM stiffness regulates glial migration in *Drosophila* and mammalian glioma models. *Dev.* *141*, 3233–3242.
- Kiritsi, D., Has, C., and Bruckner-Tuderman, L. (2013). Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adhes. Migr.* *7*, 135–141.
- Kirkpatrick, C.A., Knox, S.M., Staatz, W.D., Fox, B., Lercher, D.M., and Selleck, S.B. (2006). The function of a *Drosophila* glypican does not depend entirely on heparan sulfate modification. *Dev. Biol.* *300*, 570–582.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K., and Martin, G.R. (1982). Isolation and Characterization of Type IV Procollagen, Laminin, and Heparan Sulfate Proteoglycan from the EHS Sarcoma. *Biochemistry* *21*, 6188–6193.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. (1986). Basement Membrane Complexes with Biological Activity. *Biochemistry* *25*, 312–318.
- Kleinschmit, A., Koyama, T., Dejima, K., Hayashi, Y., Kamimura, K., and Nakato, H. (2010). *Drosophila* heparan sulfate 6-O endosulfatase regulates Wingless morphogen gradient formation. *Dev. Biol.* *345*, 204–214.
- Knox, S., Merry, C., Stringer, S., Melrose, J., and Whitelock, J. (2002). Not all perlecans are created equal. Interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 14657–14665.
- Koliakos, G.G., Kouzi-Koliakos, K., Furcht, L.T., Reger, L.A., and Tsilibary, E.C. (1989). The binding of heparin to type IV collagen: Domain specificity with identification of peptide sequences from the $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ which preferentially bind heparin. *J. Biol. Chem.* *264*, 2313–2323.
- Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T., and Glanville, R.W. (1981). MACROMOLECULAR STRUCTURE OF BASEMENT MEMBRANE COLLAGENS- Identification of 7S collagen as a crosslinking domain of type IV collagen. *125*.
- Künnapu, J., Björkgren, I., and Shimmi, O. (2009). The *Drosophila* DPP signal is produced by cleavage of its proprotein at evolutionary diversified furin-recognition sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8501–8506.

- Kvist, A.J., Johnson, A.E., Mörgelin, M., Gustafsson, E., Bengtsson, E., Lindblom, K., Aszódi, A., Fässler, R., Sasaki, T., Timpl, R., et al. (2006). Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation: Implications for perlecan chondrodysplasias. *J. Biol. Chem.* *281*, 33127–33139.
- Labelle-Dumais, C., Dilworth, D.J., Harrington, E.P., de Leau, M., Lyons, D., Kabaeva, Z., Manzini, M.C., Dobyns, W.B., Walsh, C.A., Michele, D.E., et al. (2011). COL4A1 mutations cause ocular dysgenesis, neuronal localization defects, and myopathy in mice and walker-warburg syndrome in humans. *PLoS Genet.* *7*.
- Lacombe, D. (1997). Les proteines de la morphogenese osseuse (BMP). *Arch. Pediatr.* *4*, 364–370.
- Lafever, K.S., Wang, X., Page-Mccaw, P., Bhave, G., and Page-Mccaw, A. (2017). Both *Drosophila* matrix metalloproteinases have released and membrane-tethered forms but have different substrates. *Sci. Rep.* *7*, 1–16.
- LaFlamme, S.E., Mathew-Steiner, S., Singh, N., Colello-Borges, D., and Nieves, B. (2018). Integrin and microtubule crosstalk in the regulation of cellular processes. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 4177–4185.
- Lecuit, T., and Cohen, S.M. (1998). Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* *125*, 4901–4907.
- Lehner, C.F., and O'Farrell, P.H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell.*
- Lerner, D.W., McCoy, D., Isabella, A.J., Mahowald, A.P., Gerlach, G.F., Chaudhry, T.A., and Horne-Badovinac, S. (2013). A Rab10-Dependent Mechanism for Polarized Basement Membrane Secretion during Organ Morphogenesis. *Dev. Cell* *24*, 159–168.
- Levayer, R., Dupont, C., and Moreno, E. (2016). Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Curr. Biol.* *26*, 670–677.
- Li, S., Qi, Y., McKee, K., Liu, J., Hsu, J., and Yurchenco, P.D. (2017). Integrin and dystroglycan compensate each other to mediate laminin-dependent basement membrane assembly and epiblast polarization. *Matrix Biol.* *57–58*, 272–284.
- Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* *131*, 6009–6021.
- Lindner, J.R., Hillman, P.R., Barrett, A.L., Jackson, M.C., Perry, T.L., Park, Y., and Datta, S. (2007). The *Drosophila* Perlecan gene *trol* regulates multiple signaling pathways in different developmental contexts. *BMC Dev. Biol.* *7*, 121.
- Liu, M., Feng, Z., Ke, H., Liu, Y., Sun, T., Dai, J., Cui, W., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Tango1 spatially organizes ER exit sites to control ER export. *J. Cell Biol.* *216*, 1035–1049.
- Lowell, C.A., and Mayadas, T.N. (2012). Overview-studying integrins in vivo. *Methods Mol. Biol.* *757*, 369–397.
- Lundquist, E.A., Herman, R.K., Rogalski, T.M., Mullen, G.P., Moerman, D.G., and Shaw, J.E. (1996). The *mec-8* gene of *C. Elegans* encodes a protein with two RNA recognition motifs and regulates alternative splicing of *unc-52* transcripts. *Development* *122*, 1601–1610.
- Ma, M., Cao, X., Dai, J., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Basement Membrane Manipulation in *Drosophila* Wing Discs Affects Dpp Retention but Not Growth Mechanoregulation. *Dev. Cell* *42*, 97–106.e4.
- Macdonald, P.R., Lustig, A., Steinmetz, M.O., and Kammerer, R.A. (2010). Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J. Struct. Biol.* *170*, 398–405.

- Malik, S., Jang, W., Park, S.Y., Kim, J.Y., Kwon, K.S., and Kim, C. (2019). The target specificity of the RNA binding protein Pumilio is determined by distinct co-factors. *Biosci. Rep.* 39.
- Martin, F.A. (2004). The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. *Development* 131, 4921–4930.
- Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E.L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R., and Baumgartner, S. (1999). wing blister, A new *Drosophila* laminin chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J. Cell Biol.* 145, 191–201.
- Martinez, J.R., Dhawan, A., and Farach-Carson, M.C. (2018). Modular proteoglycan perlecan/HSPG2: Mutations, phenotypes, and functions. *Genes (Basel)*. 9.
- Martinez, J.R., Grindel, B.J., Hubka, K.M., Dodge, G.R., and Farach-Carson, M.C. (2019). Perlecan/HSPG2: Signaling role of domain IV in chondrocyte clustering with implications for Schwartz-Jampel Syndrome. *J. Cell. Biochem.* 120, 2138–2150.
- Marty, T., Müller, B., Basler, K., and Affolter, M. (2000). Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription. *Nat. Cell Biol.* 2, 745–749.
- Matsubayashi, Y., Louani, A., Dragu, A., Sánchez-Sánchez, B.J., Serna-Morales, E., Yolland, L., Gyoergy, A., Vizcay, G., Fleck, R.A., Heddleston, J.M., et al. (2017). A Moving Source of Matrix Components Is Essential for De Novo Basement Membrane Formation. *Curr. Biol.* 27, 3526-3534.e4.
- Matsuda, S., and Affolter, M. (2017). Dpp from the anterior stripe of cells is crucial for the growth of the *Drosophila* wing disc. *Elife* 6, 1–9.
- Matsuda, S., Harmansa, S., and Affolter, M. (2016). BMP morphogen gradients in flies. *Cytokine Growth Factor Rev.* 27, 119–127.
- Matsuo, I., and Kimura-Yoshida, C. (2013). Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 399–407.
- McCall, A.S., Cummings, C.F., Bhave, G., Vanacore, R., Page-Mccaw, A., and Hudson, B.G. (2014). Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* 157, 1380–1392.
- McCarthy, K.J. (2015). The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New (Elsevier Ltd).
- McClure, K.D., and Schubiger, G. (2005). Developmental analysis and squamous morphogenesis of the peripodial epithelium in *Drosophila* imaginal discs. *Development* 132, 5033–5042.
- McKee, K.K., Harrison, D., Capizzi, S., and Yurchenco, P.D. (2007). Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J. Biol. Chem.* 282, 21437–21447.
- McLean, J. (1916). The thromboplastic action of Cephalin. *Am. J. Physiol.* 250–257.
- Medioni, C., and Noselli, S. (2005). Dynamics of the basement membrane in invasive epithelial clusters in *Drosophila*. *Development* 132, 3069–3077.
- Melrose, J., Roughley, P., Knox, S., Smith, S., Lord, M., and Whitelock, J. (2006). The structure, location, and function of perlecan, a prominent pericellular proteoglycan of fetal, postnatal, and mature hyaline cartilages. *J. Biol. Chem.* 281, 36905–36914.
- Merz, D.C., Alves, G., Kawano, T., Zheng, H., and Culotti, J.G. (2003). UNC-52/Perlecan affects gonadal leader cell migrations in *c. elegans* hermaphrodites through alterations in growth factor

signaling. *Dev. Biol.* 256, 174–187.

Meyer, F., and Moussian, B. (2009). *Drosophila* multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy. *Dev. Growth Differ.* 51, 483–498.

Meyer, S., Schmidt, I., and Klämbt, C. (2014). Glia ECM interactions are required to shape the *Drosophila* nervous system. *Mech. Dev.* 133, 105–116.

Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5691–5696.

Miller, J.D., Stevens, E.T., Smith, D.R., Wight, T.N., and Wrenshall, L.E. (2008). Perlecan: A major IL-2-binding proteoglycan in murine spleen. *Immunol. Cell Biol.* 86, 192–199.

Milner, M.J., Bleasby, A.J., and Kelly, S.L. (1984). The role of the peripodial membrane of leg and wing imaginal discs of *Drosophila melanogaster* during evagination and differentiation in vitro. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 180–186.

Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H., and Tabata, T. (1999). *brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* 398, 242–246.

Miner, J.H. (2012). The glomerular basement membrane. *Exp. Cell Res.* 318, 973–978.

Miner, J.H., and Sanes, J.R. (1994). Collagen IV $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains in rodent basal laminae: Sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol.* 127, 879–891.

Miner, J.H., and Yurchenco, P.D. (2004). Laminin Functions in Tissue Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 255–284.

Miner, J.H., Patton, B.L., Lentz, S.I., Gilbert, D.J., Snider, W.D., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Sanes, J.R. (1997). The laminin α chains: Expression, developmental transitions, and chromosomal locations of $\alpha 1$ -5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel $\alpha 3$ isoform. *J. Cell Biol.* 137, 685–701.

Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G., and Sutherland, A.E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131, 2247–2256.

Miosge, N. (2001). The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol. Histopathol.* 16, 1239–1248.

Misra, J.R., and Irvine, K.D. (2018). The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu. Rev. Genet.* 52, 65–87.

Mittal, R., Patel, A.P., Debs, L.H., Nguyen, D., Patel, K., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Chapagain, P., and Liu, X.Z. (2016). Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J. Cell. Physiol.* 231, 2599–2621.

Miyagoe, Y., Hanaoka, K., Nonaka, I., Hayasaka, M., Nabeshima, Y., Arahata, K., Nabeshima, Y.I., and Takeda, S. (1997). Laminin $\alpha 2$ chain-null mutant mice by targeted disruption of the *Lama2* gene: A new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 415, 33–39.

Momota, R., Naito, I., Ninomiya, Y., and Ohtsuka, A. (2011). *Drosophila* type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol.* 30, 258–266.

Mongiati, M., Taylor, K., Otto, J., Aho, S., Uitto, J., Whitelock, J.M., and Iozzo, R. V. (2000). The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J. Biol.*

Chem. 275, 7095–7100.

Mongiati, M., Sweeney, S.M., San Antonio, J.D., Fu, J., and Iozzo, R. V. (2003). Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J. Biol. Chem.* 278, 4238–4249.

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.

Montgomery, N.T., Zientek, K.D., Pokidysheva, E.N., and Bächinger, H.P. (2018). Post-translational modification of type IV collagen with 3-hydroxyproline affects its interactions with glycoprotein VI and nidogens 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 293, 5987–5999.

Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., and Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15050–15055.

Morita, H., Yoshimura, A., Inui, K., Ideura, T., Watanabe, H., Wang, L., Soininen, R., and Tryggvason, K. (2005). Heparan Sulfate of Perlecan Is Involved in Glomerular Filtration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 1703–1710.

Mosig, R.A., Dowling, O., DiFeo, A., Ramirez, M.C.M., Parker, I.C., Abe, E., Diouri, J., Al Aqeel, A., Wylie, J.D., Oblander, S.A., et al. (2007). Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1113–1123.

Mullen, G.P., Rogalski, T.M., Bush, J.A., Gorji, P.R., and Moerman, D.G. (1999). Complex patterns of alternative splicing mediate the spatial and temporal distribution of perlecan/UNC-52 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 10, 3205–3221.

Müller, B., Hartmann, B., Pyrowolakis, G., Affolter, M., and Basler, K. (2003). Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. *Cell* 113, 221–233.

Murdoch, A., Dodge, G., Cohen, I., Tuan, R., and Iozzo, R. (1992). Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). *J. Biol. Chem.* 267, 8544–8557.

Murphy-Ullrich, J.E., and Sage, E.H. (2014). Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol.* 37, 1–14.

Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M., and Nischt, R. (2000). The Absence of Nidogen 1 Does Not Affect Murine Basement Membrane Formation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7007–7012.

Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33–43.

Nakagawa, H., Whelan, K., and Lynch, J.P. (2015). Mechanisms of Barrett’s oesophagus: Intestinal differentiation, stem cells, and tissue models. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 29, 3–16.

Nakaya, Y., and Sheng, G. (2013). EMT in developmental morphogenesis. *Cancer Lett.* 341, 9–15.

Nakaya, Y., Sukowati, E.W., Alev, C., Nakazawa, F., and Sheng, G. (2010). Involvement of dystroglycan in epithelial-mesenchymal transition during chick gastrulation. *Cells Tissues Organs* 193, 64–73.

Nakaya, Y., Sukowati, E.W., and Sheng, G. (2013). Epiblast integrity requires CLASP and Dystroglycan-mediated microtubule anchoring to the basal cortex. *J. Cell Biol.* 202, 637–651.

- Neumann, F.R., Bittcher, G., Annies, M., Schumacher, B., Kröger, S., and Ruegg, M.A. (2001). An alternative amino-terminus expressed in the central nervous system converts agrin to a type II transmembrane protein. *Mol. Cell. Neurosci.* *17*, 208–225.
- Ni, J.-Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.-P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.-S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., et al. (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat. Methods* *8*, 405–407.
- Nicole, S., Davoine, C.-S.S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C. Ben, Hammouda, H., Cruaud, C., White, P.S., et al. (2000). Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat. Genet.* *26*, 480–483.
- Ning, L., Xu, Z., Furuya, N., Nonaka, R., Yamada, Y., and Arikawa-Hirasawa, E. (2015). Perlecan inhibits autophagy to maintain muscle homeostasis in mouse soleus muscle. *Matrix Biol.* *48*, 26–35.
- Noakes, P.G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1995a). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin β 2. *Nature* *374*, 258–262.
- Noakes, P.G., Miner, J.H., Gautam, M., Cunningham, J., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1995b). The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin β 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β 1. *IO*, 400–406.
- Noonan, D.M., and Hassell, J.R. (1993). Perlecan, the large low-density proteoglycan of basement membranes: structure and variant forms. *Kidney Int.* *43*, 53–60.
- Noonan, D.M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y., and Hassell, J.R. (1991). The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* *266*, 22939–22947.
- Norman, M., Vuilleumier, R., Springhorn, A., Gawlik, J., and Pyrowolakis, G. (2016). Pentagone internalises glypicans to fine-tune multiple signalling pathways. *Elife* *5*.
- Nusinow, D., Greenberg, L., and Hatini, V. (2008). Reciprocal roles for bowl and lines in specifying the peripodial epithelium and the disc proper of the *Drosophila* wing primordium. *Development* *135*, 3031–3041.
- Nyström, A., Shaik, Z.P., Gullberg, D., Krieg, T., Eckes, B., Zent, R., Pozzi, A., and Iozzo, R. V. (2009). Role of tyrosine phosphatase SHP-1 in the mechanism of endorepellin angiostatic activity. *Blood* *114*, 4897–4906.
- Oberbäumer, I., Wiedemann, H., Timpl, R., and Kühn, K. (1982). Shape and assembly of type IV procollagen obtained from cell culture. *EMBO J.* *1*, 805–810.
- Ogiso, Y., Tsuneizumi, K., Masuda, N., Sato, M., and Tabata, T. (2011). Robustness of the Dpp morphogen activity gradient depends on negative feedback regulation by the inhibitory Smad, Dad. *Dev. Growth Differ.* *53*, 668–678.
- Oh, J., Takahashi, R., Adachi, E., Kondo, S., Kuratomi, S., Noma, A., Alexander, D.B., Motoda, H., Okada, A., Seiki, M., et al. (2004). Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. *Oncogene* *23*, 5041–5048.
- Okada, M., Imoto, K., Sugiyama, A., Yasuda, J., and Yamawaki, H. (2017). New insights into the role of basement membrane-derived matricryptins in the heart. *Biol. Pharm. Bull.* *40*, 2050–2060.
- Olsen, B.R. (1999). Life without perlecan has its problems. *J. Cell Biol.* *147*, 909–911.

- Organista, M.F., Martín, M., de Celis, J.M., Barrio, R., López-Varea, A., Esteban, N., Casado, M., and de Celis, J.F. (2015). The Spalt Transcription Factors Generate the Transcriptional Landscape of the *Drosophila melanogaster* Wing Pouch Central Region. *PLoS Genet.* *11*, 1–27.
- Orkin, B.Y.R.W., Gehron, P., Mcgoodwin, E.B., George, R., Valentine, T., and Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *145*, 204–220.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Sante, J.M., and Rubin, G.M. (2003). *Drosophila* Matrix Metalloproteinases Are Required for Tissue Remodeling, but Not Embryonic Development. *Dev. Cell* *4*, 95–106.
- Pallavi, S.K., and Shashidhara, L.S. (2003). Egr/Ras pathway mediates interactions between peripodial and disc proper cells in *Drosophila* wing discs. *Development* *130*, 4931–4941.
- Palm, W., Sampaio, J.L., Brankatschk, M., Carvalho, M., Mahmoud, A., Shevchenko, A., and Eaton, S. (2012). Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*-assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet.* *8*.
- Pandya, P., Orgaz, J.L., and Sanz-Moreno, V. (2017). Actomyosin contractility and collective migration: may the force be with you. *Curr. Opin. Cell Biol.* *48*, 87–96.
- Panganiban, G.E., Rashka, K.E., Neitzel, M.D., and Hoffmann, F.M. (1990). Biochemical characterization of the *Drosophila* dpp protein, a member of the transforming growth factor beta family of growth factors. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2669–2677.
- Paralkar, V.M., Weeks, B.S., Yu, Y.M., Kleinman, H.K., and Reddi, A.H. (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: Potentiation and binding to type IV collagen. *J. Cell Biol.* *119*, 1721–1728.
- Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M.M., Caldwell, M.C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C.J.R., McDermott, S., and Datta, S. (2003). *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev. Biol.* *253*, 247–257.
- Parkin, J. Des, San Antonio, J.D., Pedchenko, V., Hudson, B., Jensen, S.T., and Savige, J. (2011). Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimer predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum. Mutat.* *32*, 127–143.
- Pastor-Pareja, J.C., and Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Dev. Cell* *21*, 245–256.
- Pastor-Pareja, J.C., Ming, W., and Tian, X. (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *DMM Dis. Model. Mech.* *1*, 144–154.
- Patel, V.N., Knox, S.M., Likar, K.M., Lathrop, C.A., Hossain, R., Eftekhari, S., Whitelock, J.M., Elkin, M., Vlodaysky, I., and Hoffman, M.P. (2007). Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF10 activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis. *Development* *134*, 4177–4186.
- Pathak, A., and Kumar, S. (2012). Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10334–10339.
- Paulsson, M., Yurchenco, P.D., Ruben, G.C., Engel, J., and Timpl, R. (1987). Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane. *J. Mol. Biol.* *197*, 297–313.
- Peng, W.J., Yan, J.W., Wan, Y.N., Wang, B.X., Tao, J.H., Yang, G.J., Pan, H.F., and Wang, J. (2012). Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in systemic sclerosis. *J. Clin. Immunol.*

32, 1409–1414.

Pickering, J., Cunliffe, V.T., Van Eeden, F., and Borycki, A.G. (2017). Hedgehog signalling acts upstream of Laminin $\alpha 1$ transcription in the zebrafish paraxial mesoderm. *Matrix Biol.* *62*, 58–74.

Pirrotta, V. (1986). Cloning *Drosophila* genes.

Plachot, C., Chaboub, L.S., Adissu, H.A., Wang, L., Urazaev, A., Sturgis, J., Asem, E.K., and Lelièvre, S.A. (2009). Factors necessary to produce basoapical polarity in human glandular epithelium formed in conventional and high-throughput three-dimensional culture: Example of the breast epithelium. *BMC Biol.* *7*, 1–12.

Port, F., and Bullock, S.L. (2016). Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nat. Methods* *13*, 852–854.

Port, F., Chen, H.-M., Lee, T., and Bullock, S.L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E2967–E2976.

Pöschl, E., Fox, J.W., Block, D., Mayer, U., and Timpl, R. (1994). Two non-contiguous regions contribute to nidogen binding to a single EGF-like motif of the laminin gamma 1 chain. *EMBO J.* *13*, 3741–3747.

Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* *131*, 1619–1628.

Poulain, F.E., and Yost, H.J. (2015). Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development* *142*, 3456–3467.

Pozzi, A., Yurchenco, P.D., and Iozzo, R. V. (2017). The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.* *57–58*, 1–11.

Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., et al. (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* (80-.). *317*, 86–94.

Qin, Y., Rodin, S., Simonson, O.E., and Hollande, F. (2017). Laminins and cancer stem cells: Partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* *45*, 3–12.

Ralston, A., and Blair, S.S. (2005). Long-range Dpp signaling is regulated to restrict BMP signaling to a crossvein competent zone. *Dev. Biol.* *280*, 187–200.

Ramos-Lewis, W., and Page-McCaw, A. (2019). Basement membrane mechanics shape development: Lessons from the fly. *Matrix Biol.* *75–76*, 72–81.

Ramos-Lewis, W., LaFever, K.S., and Page-McCaw, A. (2018). A scar-like lesion is apparent in basement membrane after wound repair in vivo. *Matrix Biol.* *74*, 101–120.

Rauskolb, C., Sun, S., Sun, G., Pan, Y., and Irvine, K.D. (2014). Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell* *158*, 143–156.

Ray, R.P., and Wharton, K.A. (2001). Context-dependent relationships between the BMPs *gbb* and *dpp* during development of the *Drosophila* wing imaginal disk. *Development* *128*, 3913–3925.

Rehn, M., Hintikka, E., and Pihlajaniemi, T. (1996). Characterization of the mouse gene for the $\alpha 1$ chain of type XVIII collagen (*Col18a1*) reveals that the three variant N-terminal polypeptide forms are transcribed from two widely separated promoters. *Genomics* *32*, 436–446.

- Reichsman, F., Smith, L., and Cumberledge, S. (1996). Glycosaminoglycans Can Modulate Extracellular Localization of the wingless Protein and Promote Signal Transduction. *J Cell Biol* 135, 819–827.
- Restrepo, S., Zartman, J.J.J., and Basler, K. (2014). Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr. Biol.* 24, R245–R255.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–19.
- Robb, J.A. (1969). Maintenance of imaginal discs of *Drosophila melanogaster* in chemically defined media. *J. Cell Biol.* 41, 876–885.
- Rodenfels, J., Lavrynenko, O., Ayciriex, S., Sampaio, J.L., Carvalho, M., Shevchenko, A., and Eaton, S. (2014). Production of systemically circulating Hedgehog by the intestine couples nutrition to growth and development. *Genes Dev.* 28, 2636–2651.
- Rodriguez, A., Zhou, Z., Tang, M.L., Meller, S., Chen, J., Bellen, H., and Kimbrell, D.A. (1996). Identification of Immune System and Response Genes, and Novel Mutations.pdf.
- Rogalski, T.M., Williams, B.D., Mullen, G.P., and Moerman, D.G. (1993). Products of the *unc-52* gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. 1471–1484.
- Rogalski, T.M., Gilchrist, E.J., Mullen, G.P., and Moerman, D.G. (1995). Mutations in the *unc-52* gene responsible for body wall muscle defects in adult *Caenorhabditis elegans* are located in alternatively spliced exons. *Genetics* 139, 159–169.
- Rogalski, T.M., Mullen, G.P., Bush, J.A., Gilchrist, E.J., and Moerman, D.G. (2001). UNC-52/perlecan isoform diversity and function in *Caenorhabditis elegans*. In *Biochemical Society Transactions*, pp. 171–176.
- Ross, J.J., Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S.C., O’connor, M.B., and Marsh, J.L. (2001). Twisted is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410, 479–483.
- Rossi, M., Morita, H., Sormunen, R., Airene, S., Kreivi, M., Wang, L., Fukai, N., Olsen, B.R., Tryggvason, K., Soininen, R., et al. (2003). Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. *EMBO J.* 22, 236–245.
- Roy, S., Huang, H., Liu, S., and Kornberg, T.B. (2014). Cytoskeleton-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* decapentaplegic signaling protein. *Science* (80-.). 343.
- Rudziak, P., Ellis, C.G., and Kowalewska, P.M. (2019). Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues. *Mediators Inflamm.* 2019, 4123605.
- Ruiz-Losada, M., Blom-Dahl, D., Córdoba, S., and Estella, C. (2018). Specification and patterning of *Drosophila* appendages. *J. Dev. Biol.* 6.
- Ruppert, R., Hoffmann, E., and Sebald, W. (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 237, 295–302.
- Saikia, P., Medeiros, C.S., Thangavadivel, S., and Wilson, S.E. (2018). Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. *Cell Tissue Res.* 374, 439–453.
- Sánchez-Sánchez, B.J., Urbano, J.M., Comber, K., Dragu, A., Wood, W., Stramer, B., and Martín-Bermudo, M.D. (2017). *Drosophila* Embryonic Hemocytes Produce Laminins to Strengthen Migratory Response. *Cell Rep.* 21, 1461–1470.

- Sariola, H., Timpl, R., von der Mark, K., Mayne, R., Fitch, J.M., Linsenmayer, T.F., and Ekblom, P. (1984). Dual origin of glomerular basement membrane. *Dev. Biol.* *101*, 86–96.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Sasse, P., Malan, D., Fleischmann, M., Roell, W., Gustafsson, E., Bostani, T., Fan, Y., Kolbe, T., Breitbach, M., Addicks, K., et al. (2008). Perlecan is critical for heart stability. *Cardiovasc. Res.* *80*, 435–444.
- Sawala, A., Sutcliffe, C., and Ashe, H.L. (2012). Multistep molecular mechanism for bone morphogenetic protein extracellular transport in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 11222–11227.
- Sawala, A., Scarcia, M., Sutcliffe, C., Wilcockson, S.G., and Ashe, H.L. (2015). Peak BMP Responses in the *Drosophila* Embryo Are Dependent on the Activation of Integrin Signaling. *Cell Rep.* *12*, 1584–1593.
- Schneider, M., Khalil, A.A., Poulton, J., Castillejo-Lopez, C., Egger-Adam, D., Wodarz, A., Deng, W.-M., and Baumgartner, S. (2006). Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the *Drosophila* follicular epithelium to maintain epithelial organization. *Development* *133*, 3805–3815.
- Schwank, G., Restrepo, S., and Basler, K. (2008). Growth regulation by Dpp: An essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development* *135*, 4003–4013.
- Schwank, G., Dalessi, S., Yang, S.F., Yagi, R., de Lachapelle, A.M., Affolter, M., Bergmann, S., and Basler, K. (2011). Formation of the long range Dpp morphogen gradient. *PLoS Biol.* *9*.
- Sedlak, B.J., Manzo, R., and Stevens, M. (1984). Localized cell death in *Drosophila* imaginal wing disc epithelium caused by the mutation *apterous-blot*. *Dev. Biol.* *104*, 489–496.
- Sekiguchi, R., and Yamada, K.M. (2018). *Basement Membranes in Development and Disease* (Elsevier Inc.).
- Seppinen, L., and Pihlajaniemi, T. (2011). The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. *Matrix Biol.* *30*, 83–92.
- Setiawan, L., Pan, X., Woods, A.L., O'Connor, M.B., and Hariharan, I.K. (2018). The BMP2/4 ortholog Dpp can function as an inter-organ signal that regulates developmental timing. *Life Sci. Alliance* *1*, e201800216.
- Shahab, J., Baratta, C., Scuric, B., Godt, D., Venken, K.J.T., and Ringuette, M.J. (2015). Loss of SPARC dysregulates basal lamina assembly to disrupt larval fat body homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Dyn.* *244*, 540–552.
- Sharma, B., and Iozzo, R. V (1998). Transcriptional silencing of perlecan gene expression by interferon- γ . *J. Biol. Chem.* *273*, 4642–4646.
- Sher, I., Zisman-Rozen, S., Eliahu, L., Whitelock, J.M., Maas-Szabowski, N., Yamada, Y., Breitkreutz, D., Fusenig, N.E., Arikawa-Hirasawa, E., Iozzo, R. V., et al. (2006). Targeting Perlecan in Human Keratinocytes Reveals Novel Roles for Perlecan in Epidermal Formation. *J. Biol. Chem.* *281*, 5178–5187.
- Shimell, M.J., Ferguson, E.L., Childs, S.R., and O'Connor, M.B. (1991). The *Drosophila* gene *tollid* is related to the human bone morphogenetic protein 1. *Cell* *67*, 469–481.
- Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H., and O'Connor, M.B. (2005). Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell* *120*,

873–886.

- Shipley, J.M., Wesselschmidt, R.L., Kobayashi, D.K., Ley, T.J., and Shapiro, S.D. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3942–3946.
- Sivasankaran, R., Vigano, M.A., Müller, B., Affolter, M., and Basler, K. (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J.* *19*, 6162–6172.
- Skeath, J.B., Wilson, B.A., Romero, S.E., Snee, M.J., Zhu, Y., and Lacin, H. (2017). The extracellular metalloprotease AdamTS-A anchors neural lineages in place within and preserves the architecture of the central nervous system. *Development* *144*, 3102–3113.
- Smith, S.M.L., West, L.A., and Hassell, J.R. (2007). The core protein of growth plate perlecan binds FGF-18 and alters its mitogenic effect on chondrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* *468*, 244–251.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D. (1999). Absence of Basement Membranes after Targeting the LAMC1 Gene Results in Embryonic Lethality Due to Failure of Endoderm Differentiation. *J Cell Biol* *144*, 151–160.
- Sorrosal, G., Pérez, L., Herranz, H., and Milán, M. (2010). Scarface, a secreted serine protease-like protein, regulates polarized localization of laminin A at the basement membrane of the Drosophila embryo. *EMBO Rep.* *11*, 373–379.
- Spike, C.A., Shaw, J.E., and Herman, R.K. (2001). Analysis of smu-1, a Gene That Regulates the Alternative Splicing of unc-52 Pre-mRNA in Caenorhabditis elegans. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4985–4995.
- Spike, C.A., Davies, A.A., Shaw, J.E., and Herman, R.K. (2002). MEC-8 regulates alternative splicing of unc-52 transcripts in C. elegans hypodermal cells. *Development* *129*, 4999–5008.
- Srivastava, A., Pastor-Pareja, J.C., Igaki, T., Pagliarini, R., and Xu, T. (2007). Basement membrane remodeling is essential for Drosophila disc eversion and tumor invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2721–2726.
- Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L., et al. (2008). The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* *454*, 955–960.
- Strigini, M., and Cohen, S.M. (2000). Wingless gradient formation in the Drosophila wing. *Curr. Biol.*
- Sturtevant, M.A., Biehs, B., Marin, E., and Bier, E. (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the Drosophila wing. *Development* *124*, 21–32.
- Sugaya, K., Hongo, E., Ishihara, Y., and Tsuji, H. (2006). The conserved role of Smu1 in splicing is characterized in its mammalian temperature-sensitive mutant. *J. Cell Sci.* *119*, 4944–4951.
- Sui, L., Alt, S., Weigert, M., Dye, N., Eaton, S., Jug, F., Myers, E.W., Jülicher, F., Salbreux, G., and Dahmann, C. (2018). Differential lateral and basal tension drive folding of Drosophila wing discs through two distinct mechanisms. *Nat. Commun.* *9*, 4620.
- Swain, A., Misulovin, Z., Pherson, M., Gause, M., Mihindikulasuriya, K., Rickels, R.A., Shilatifard, A., and Dorsett, D. (2016). Drosophila TDP-43 RNA-Binding Protein Facilitates Association of Sister Chromatid Cohesion Proteins with Genes, Enhancers and Polycomb Response Elements. *PLoS Genet.* *12*, 1–32.
- Swarup, S., and Verheyen, E.M. (2012). Wnt / Wingless Signaling in Drosophila. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, 1–16.

- Tabata, T., and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* *131*, 703–712.
- Talts, J.F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R. (1999). Binding of the G domains of laminin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains and perlecan to heparin, sulfatides, α -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* *18*, 863–870.
- Tang, W., Wang, D., and Shen, J. (2016). Asymmetric distribution of Spalt in *Drosophila* wing squamous and columnar epithelia ensures correct cell morphogenesis. *Sci. Rep.* *6*, 1–9.
- Tanimoto, H., Itoh, S., Ten Dijke, P., and Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol. Cell* *5*, 59–71.
- Teleman, A.A., and Cohen, S.M. (2000). Dpp gradient formation in the *drosophila* wing imaginal disc. *Cell* *103*, 971–980.
- Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2017). Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol.* *75–76*, 220–259.
- Thyboll, J., Kortessmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2002). Deletion of the Laminin 4 Chain Leads to Impaired Microvessel Maturation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1194–1202.
- Tian, A., and Jiang, J. (2014). Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *Elife* *2014*, 1–23.
- Tsilibary, E.C., Koliakos, G.G., Charonis, A.S., Vogel, A.M., Reger, L.A., and Furcht, L.T. (1988). Heparin type IV collagen interactions: Equilibrium binding and inhibition of type IV collagen self-assembly. *J. Biol. Chem.* *263*, 19112–19118.
- Tsuda, M., Izumi, S., and Nakato, H. (2001). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the gene for Dally, a *Drosophila* integral membrane proteoglycan. *FEBS Lett.* *494*, 241–245.
- Turing, A.M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. London* *237*, 37–72.
- Urbano, J.M., Torgler, C.N., Molnar, C., Tepass, U., López-Varea, A., Brown, N.H., de Celis, J.F., and Martín-Bermudo, M.D. (2009). *Drosophila* laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* *136*, 4165–4176.
- Utriainen, A., Sormunen, R., Kettunen, M., Carvalhaes, L.S., Sajanti, E., Eklund, L., Kauppinen, R., Kitten, G.T., and Pihlajaniemi, T. (2004). Structurally altered basement membranes and hydrocephalus in a type XVIII collagen deficient mouse line. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 2089–2099.
- del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., and Desplan, C. (2012). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* *9*, 47–55.
- Vert, J.P., Foveau, N., Lajaunie, C., and Vandenbrouck, Y. (2006). An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* *7*, 1–17.
- Vidal-Petiot, E., Cheval, L., Faugeron, J., Malard, T., Doucet, A., Jeunemaitre, X., and Hadchouel, J. (2012). A new methodology for quantification of alternatively spliced exons reveals a highly tissue-specific expression pattern of WNK1 isoforms. *PLoS One* *7*, 1–9.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U., and Jäckle, H. (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Dyn.* *224*, 403–412.
- Vuilleumier, R., Springhorn, A., Patterson, L., Koidl, S., Hammerschmidt, M., Affolter, M., and

- Pyrowolakis, G. (2010). Control of Dpp morphogen signalling by a secreted feedback regulator. *Nat. Cell Biol.* *12*, 611–617.
- Vuilleumier, R., Affolter, M., and Pyrowolakis, G. (2011). Pentagone: patrolling BMP morphogen signaling. *6934*.
- Wang, X., and Page-McCaw, A. (2014). A matrix metalloproteinase mediates long-distance attenuation of stem cell proliferation. *J. Cell Biol.* *206*, 923–936.
- Wang, M., Ogé, L., Perez-Garcia, M., Hamama, L., and Sakr, S. (2018). The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets, Biological Functions, and Post Transcriptional Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 410.
- Wang, X., Harris, R.E., Bayston, L.J., and Ashe, H.L. (2008). Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* *455*, 72–77.
- Warren, C.R., Grindel, B.J., Francis, L., Carson, D.D., and Farach-Carson, M.C. (2014). Transcriptional activation by NF κ B increases perlecan/HSPG2 expression in the desmoplastic prostate tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.* *115*, 1322–1333.
- Warren, C.R., Kassir, E., Spurlin, J., Martinez, J., Putnam, N.H., and Farach-Carson, M.C. (2015). Evolution of the Perlecan/HSPG2 gene and its activation in regenerating *Nematostella vectensis*. *PLoS One* *10*, 1–14.
- Weber, U., Siegel, V., and Mlodzik, M. (1995). pipsqueak encodes a novel nuclear protein required downstream of seven-up for the development of photoreceptors R3 and R4. *EMBO J.* *14*, 6247–6257.
- Weiss, A., Charbonnier, E., Ellertsdóttir, E., Tsigos, A., Wolf, C., Schuh, R., Pyrowolakis, G., and Affolter, M. (2010). A conserved activation element in BMP signaling during *Drosophila* development. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Whitelock, J.M., Graham, L.D., Melrose, J., Murdoch, A.D., Iozzo, R. V, and Anne Underwood, P. (1999). Human perlecan immunopurified from different endothelial cell sources has different adhesive properties for vascular cells. *Matrix Biol.* *18*, 163–178.
- Whitelock, J.M., Melrose, J., and Iozzo, R. V (2008). Diverse Cell Signaling Events Modulated by Perlecan. *Biochemistry* *47*, 11174–11183.
- Widmann, T.J., and Dahmann, C. (2009a). Dpp signaling promotes the cuboidal-to-columnar shape transition of *Drosophila* wing disc epithelia by regulating Rho1. *J. Cell Sci.* *122*, 1362–1373.
- Widmann, T.J., and Dahmann, C. (2009b). Wingless signaling and the control of cell shape in *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev. Biol.* *334*, 161–173.
- Wijeratne, S.S., Martinez, J.R., Grindel, B.J., Frey, E.W., Li, J., Wang, L., Farach-Carson, M.C., and Kiang, C.-H.H. (2016). Single molecule force measurements of perlecan/HSPG2: A key component of the osteocyte pericellular matrix. *Matrix Biol.* *50*, 27–38.
- Willem, M., Miosge, N., Halfter, W., Smyth, N., Jannetti, I., Burghart, E., Timpl, R., and Mayer, U. (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin α 1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* *129*, 2711–2722.
- Wolfstetter, G., and Holz, A. (2012). The role of LamininB2 (LanB2) during mesoderm differentiation in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 267–282.
- Wolfstetter, G., Shirinian, M., Stute, C., Grabbe, C., Hummel, T., Baumgartner, S., Palmer, R.H., and Holz, A. (2009). Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and

endoderm. *Mech. Dev.* 126, 721–736.

Wolfstetter, G., Dahlitz, I., Pfeifer, K., Töpfer, U., Alt, J.A., Pfeifer, D.C., Lakes-Harlan, R., Baumgartner, S., Palmer, R.H., and Holz, A. (2019). Characterization of *Drosophila* Nidogen / entactin reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning. *Development* 146, dev168948.

Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25, 1–47.

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

Xu, X., Li, Z., Leng, Y., Neu, C.P., and Calve, S. (2016). Knockdown of the pericellular matrix molecule perlecan lowers in situ cell and matrix stiffness in developing cartilage. *Dev. Biol.* 418, 242–247.

Xu, Y.-X., Ashline, D., Liu, L., Tassa, C., Shaw, S.Y., Ravid, K., Layne, M.D., Reinhold, V., and Robbins, P.W. (2015). The glycosylation-dependent interaction of perlecan core protein with LDL: implications for atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 56, 266–276.

Xu, Z., Ichikawa, N., Kosaki, K., Yamada, Y., Sasaki, T., Sakai, L.Y., Kurosawa, H., Hattori, N., and Arikawa-Hirasawa, E. (2010). Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition. *Matrix Biol.* 29, 461–470.

Yao, Y., Chen, Z.-L., Norris, E.H., and Strickland, S. (2017). Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Physiol. Behav.* 176, 139–148.

Yarnitzky, T., and Volk, T. (1995). Laminin is Required for Heart, Somatic Muscles and Gut Development in the *Drosophila* Embryo. 609–618.

Yasothornsrikul, S., Davis, W.J., Cramer, G., Kimbrell, D.A., and Dearolf, C.R. (1997). Viking: Identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* 198, 17–25.

Ylikärppä, R., Eklund, L., Sormunen, R., Kontiola, A.I., Utriainen, A., Määttä, M., Fukai, N., Olsen, B.R., and Pihlajaniemi, T. (2003). Lack of type XVIII collagen results in anterior ocular defects. *FASEB J.* 17, 2257–2259.

You, J., Zhang, Y., Li, Z., Lou, Z., Jin, L., and Lin, X. (2014). *Drosophila* Perlecan Regulates Intestinal Stem Cell Activity via Cell-Matrix Attachment. *Stem Cell Reports* 2, 761–769.

Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Yurchenco, P.D. (2015). Integrating Activities of Laminins that Drive Basement Membrane Assembly and Function. *Curr. Top. Membr.* 76, 1–30.

Yurchenco, P.D., and Patton, B.L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1277–1294.

Yurchenco, P.D., and Ruben, G.C. (1987). Basement membrane structure in situ: Evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J. Cell Biol.* 105, 2559–2568.

Yurchenco, P.D., Cheng, Y.S., and Colognato, H. (1992). Laminin forms an independent network in basement membranes. *J. Cell Biol.* 117, 1119–1133.

Zang, Y., Wan, M., Liu, M., Ke, H., Ma, S., Liu, L.P., Ni, J.Q., and Pastor-Pareja, J.C. (2015). Plasma membrane overgrowth causes fibrotic collagen accumulation and immune activation in *Drosophila*

adipocytes. *Elife* 4, 1–23.

Zhou, S., Lo, W.C., Suhalim, J.L., Digman, M.A., Gratton, E., Nie, Q., and Lander, A.D. (2012). Free extracellular diffusion creates the Dpp morphogen gradient of the *Drosophila* wing disc. *Curr. Biol.* 22, 668–675.

Zhou, Z., Wang, J., Cao, R., Morita, H., Soininen, R., Chan, K.M., Liu, B., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2004). Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in Perlecan heparan sulfate-deficient mice. *Cancer Res.* 64, 4699–4702.

Zoeller, J.J., McQuillan, A., Whitelock, J., Ho, S.Y., and Iozzo, R. V. (2008). A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. *J. Cell Biol.* 181, 381–394.

Zoeller, J.J., Whitelock, J.M., and Iozzo, R. V. (2009). Perlecan regulates developmental angiogenesis by modulating the VEGF-VEGFR2 axis. *Matrix Biol.* 28, 284–291.