



HAL
open science

Régulation et rôles de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogenèse chez la drosophile

Charlotte Mallart

► **To cite this version:**

Charlotte Mallart. Régulation et rôles de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogenèse chez la drosophile. Morphogenèse. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL066 . tel-04028322

HAL Id: tel-04028322

<https://theses.hal.science/tel-04028322v1>

Submitted on 14 Mar 2023

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.

Régulation et rôles de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogenèse chez la drosophile

Regulation and roles of the JAK-STAT pathway during Drosophila oogenesis

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Science de la vie et santé

Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **I2BC (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**, sous la direction de **Marianne MALARTRE**, maîtresse de conférence et la co-direction de **Anne-Marie PRET**, professeure

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 13 Décembre 2022, par

Charlotte MALLART

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Fabienne MALAGNAC

Professeure, Paris-Saclay, I2BC

Présidente

Antoine GUICHET

Directeur de recherche, CNRS, IJM

Rapporteur & Examineur

Vincent MIROUSE

Directeur de recherche, CNRS, iGReD

Rapporteur & Examineur

Jens JANUSCHKE

Directeur de recherche, University of Dundee

Examineur

Titre : Régulation et rôles de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogenèse chez la drosophile

Mots clés : Signalisation JAK-STAT, Épithélium folliculaire, Morphogenèse, E-Cadhérine, Ovocyte, Polarité

Résumé : La voie de signalisation JAK-STAT joue un rôle central en immunologie et lors du développement par son implication dans des processus cellulaires majeurs (prolifération, différenciation, migration, apoptose). Bien que les connaissances sur son fonctionnement, ses cibles et sa régulation s'étoffent, nombreux sont les mécanismes restants incomplets. Elle est conservée chez de nombreux métazoaires, autant au niveau fonctionnel que moléculaire et la drosophile est un modèle de choix pour l'étude de cette voie de signalisation car les différents types d'acteur la composant présentent peu de redondance. En particulier, au cours de l'ovogenèse, la voie JAK-STAT est impliquée dans de nombreux événements de morphogenèse nécessaires à la maturation de l'œuf, offrant autant de phénotypes à étudier pour comprendre son fonctionnement. Dans ce contexte, mon projet de thèse avait pour but de participer à l'étude de la régulation de la voie JAK-STAT en utilisant comme système l'ovaire de drosophile.

Au niveau de la chambre à œuf, ou follicule, les cellules polaires, localisées en paires aux pôles antérieur et postérieur de l'épithélium folliculaire, sont les seules productrices du ligand de la voie JAK-STAT. De fait, suite à la sécrétion du ligand, la signalisation était jusqu'ici décrite comme symétrique entre les pôles antérieur et postérieur. En caractérisant précisément le patron d'activité de la voie JAK-STAT en contexte sauvage, j'ai observé et décrit que si la symétrie s'applique en effet au début de l'ovogenèse, une asymétrie se met en place entre les pôles par une diminution de la taille du gradient au pôle postérieur en milieu d'ovogenèse. De façon fortuite, j'ai observé que la E-Cadhérine, une protéine d'adhérence inter-cellulaire, présente une dynamique similaire dans les cellules folliculaires postérieures. J'ai pu démontrer que la E-Cadhérine est impliquée dans les mêmes processus cellulaires que la voie JAK-STAT lors de l'ovogenèse et que son expression est nécessaire à la transduction de la voie JAK-STAT.

La poursuite de cette étude a mis en évidence que la E-Cadhérine forme un complexe avec un des acteurs de la voie JAK-STAT, le facteur de transcription Stat92E. L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer que la E-cadhérine agit comme régulateur positif de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire.

En parallèle, j'ai étudié les causes et rôles physiologiques de la restriction de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires postérieures. Le pôle postérieur du follicule est caractérisé par la présence de l'ovocyte, sécrétant le ligand Gurken de la voie EGFR et l'activation combinée des voies EGFR et JAK-STAT dans les cellules folliculaires postérieures induit leur différenciation. Ces cellules envoient en retour une information de nature inconnue vers l'ovocyte, permettant l'initiation du transport polarisé et de l'ancrage du déterminant *oskar* au cortex postérieur de l'ovocyte. J'ai identifié que la diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires postérieures est exercée par la voie Gurken/EGFR. J'ai constaté que la restriction résultante du gradient d'activité de la voie JAK-STAT permet la différenciation d'une sous-population de cellules folliculaires postérieures, que j'ai nommée cellules d'ancrage postérieur. J'ai observé que ces cellules sont les seules gardant un contact étroit avec la membrane postérieure de l'ovocyte entre les stades 9 et 10b et ce notamment grâce à la E-Cadhérine, qui est une cible de la voie JAK-STAT dans les cellules d'ancrage postérieur. Enfin, j'ai également décrit que, du fait de ce contact avec l'ovocyte, le nombre de cellules d'ancrage postérieur doit être finement régulé car il contrôle directement la taille de la zone vers laquelle va être transporté et s'ancrer l'ARNm *oskar*. Ce nouveau niveau de régulation de la zone d'ancrage de l'ARNm *oskar* est crucial, car j'ai identifié qu'une zone d'ancrage trop grande dans l'ovocyte mène à des défauts lors du développement du futur embryon.

Title : Regulation and roles of the JAK-STAT pathway during *Drosophila* oogenesis

Keywords : JAK-STAT signaling, Follicular epithelium, Morphogenesis, E-Cadherin, Oocyte, Polarity

Abstract : The JAK-STAT signaling pathway plays a central role in immunology and development through its involvement in major cellular processes (proliferation, differentiation, migration, apoptosis). Although knowledge of its function, targets and regulation is growing, many mechanisms remain incomplete. The JAK-STAT pathway is conserved in many metazoans, both at the functional and molecular levels, and *Drosophila* is a model of choice for the study of this signaling pathway because the different types of actors composing the pathway show little redundancy. In particular, during oogenesis, the JAK-STAT pathway is involved in various morphogenesis events necessary for egg maturation, offering as many phenotypes to study in order to understand its functioning. In this context, my thesis project aimed to participate in the study of the regulation of the JAK-STAT pathway using the *Drosophila* ovary as a system.

In the egg chamber, or follicle, polar cells, located in pairs at the anterior and posterior poles of the follicular epithelium, are the only JAK-STAT pathway ligand producing cells. Therefore, following ligand secretion, the JAK-STAT signaling was previously described as symmetric between the anterior and posterior poles. By precisely characterizing the JAK-STAT pathway activation pattern in wild type condition, I observed and described that while symmetry does indeed apply at the beginning of oogenesis, an asymmetry is established between the poles by a decrease in the size of the gradient at the posterior pole at mid oogenesis. Fortuitously, I observed that E-Cadherin, a cell-cell adhesion protein, shows similar dynamics in posterior follicle cells. I was able to demonstrate that E-Cadherin is involved in the same cellular processes as the JAK-STAT pathway during oogenesis and that its expression is necessary for transduction of the JAK-STAT pathway.

Further study revealed that E-Cadherin forms a complex with one of the actors of the JAK-STAT pathway, the transcription factor Stat92E. Together, these results demonstrated that E-cadherin acts as a positive regulator of the JAK-STAT pathway in the follicular epithelium.

In parallel, I investigated the causes and physiological roles of the restriction of the JAK-STAT pathway in posterior follicle cells. The posterior pole of the follicle is characterized by the presence of the oocyte, secreting the Gurken ligand of the EGFR pathway and the combined activation of the EGFR and JAK-STAT pathways in posterior follicle cells induces their differentiation. These cells send back an information of unknown nature to the oocyte, allowing the initiation of the polarized transport and anchoring of the determinant oskar to the posterior cortex of the oocyte. I identified that the decrease in E-Cadherin in posterior follicle cells is mediated by the Gurken/EGFR pathway. I found that the resulting restriction of the JAK-STAT pathway activity gradient allows the differentiation of a subpopulation of posterior follicle cells, which I named Posterior Anchoring Cells (PACs). I observed that the PACs are the only cells that maintain close contact with the posterior membrane of the oocyte between stages 9 and 10b, and that this contact is mainly mediated by E-Cadherin, a target of the JAK-STAT pathway in the PACs. Finally, I also described that, due to this close contact with the oocyte, the number of PACs must be finely regulated as it directly controls the size of the zone to which oskar will be transported and anchored. This new level of regulation of the oskar anchoring zone is crucial, as I have identified that a too wide oskar anchoring zone in the oocyte leads to defects during the development of the future embryo.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de mon jury de thèse de prendre de leur temps précieux pour lire et évaluer mon travail. J'espère que vous allez prendre autant de plaisir à lire ce manuscrit que j'en ai pris à l'écrire.

Merci à Fabienne Malagnac d'avoir si spontanément accepté d'être présidente de mon jury ainsi que pour les gentils mots et encouragements. Merci à Antoine Guichet, pour avoir accepté le rôle de rapporteur et pour avoir contribué grandement à l'avancée de mes travaux en participant à un de mes comités de suivi et en m'ayant fourni l'anticorps le plus important de toute ma thèse. Merci à Vincent Mirouse d'avoir accepté d'être rapporteur et de m'avoir accueillie dans son équipe au cours de mon stage de Master 2. Merci à Jens Januschke, examinateur, d'avoir accepté de venir d'Écosse pour ma soutenance et ce malgré la barrière de la langue.

Ensuite, je tiens également à remercier Fred Bernard, mon tuteur de thèse, et Jean-René Huynh de m'avoir suivie tout au long de ma thèse en participant à chacun de mes très (trop) longs comités de suivi, vos conseils m'ont été précieux et ont guidé mes travaux.

En prenant le temps de regarder en arrière, j'essaie de voir tout ce que cette thèse m'a apportée. Je ne m'y attendais pas, mais cette aventure aura été autant scientifique qu'humaine, deux domaines dans lesquels j'ai encore beaucoup à apprendre. Elle aura été très longue. Elle aura été très difficile. On dit souvent « si c'était à refaire, je le referais ». Pour la science, je suis d'accord. Mais pour le reste, si je pouvais, j'effacerais tout et je recommencerais. Si j'ai appris une chose, c'est que la recherche est une aventure solitaire que l'on ne peut pas faire seul.

Je remercie ma « première » équipe, l'ancienne équipe Pret, de m'avoir accueillie dès mon stage de Master 1, gardée pour mon stage de Master 2 et de m'avoir offert l'opportunité de faire une thèse. Même si je ne vous ai pas rejointes dans vos années de gloire, je garderai dans mon cœur le souvenir de mon long passage parmi vous. À Anne-Marie, merci pour ton savoir sans faille et sans limite, et pour cette phrase magique, qui aura été le début d'une belle quête scientifique « Il n'y aurait pas moins de E-Cadhérine au pôle postérieur ? ». À Fabienne, merci pour tous ces moments au labo, pour ta super playlist et pour ta persévérance face à ces expériences de biologie moléculaire sans queue ni tête. À Sophie, merci pour tous ces moments précieux où on n'était que toutes les deux au labo et lors desquels tu as pris de ton temps pour écouter mes folles histoires et mes surprenantes observations. Merci à vous deux d'être restées jusqu'au bout, malgré tous les malentendus.

Marianne, je resterai pour toujours ta première thésarde, mais tu es mon unique directrice de thèse. L'une comme l'autre on aura commis des erreurs, mais c'est comme ça qu'on apprend, et j'en aurai appris des choses. Merci de m'avoir inspirée, encouragée, rassurée, relevée (ou de m'avoir proposé une paille quand se relever était trop dur). Merci d'avoir été enthousiaste quand je ne l'étais pas. Merci aussi de pas l'avoir été parfois, ça m'a poussée à aller plus loin pour te convaincre.

Jacques, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, consciemment et inconsciemment. Tu as cru en moi dès mon premier stage, alors que je n'étais qu'en 2^{ème} année de

licence et ça a énormément compté pour moi. Merci de m'avoir adoptée dans ton équipe et d'avoir tout fait pour que je puisse venir à bout de ma thèse dans les meilleures conditions, malgré toutes les difficultés que ça t'a apporté.

Merci Mickaël d'avoir pris de ton temps pour me partager ton savoir en biologie moléculaire et pour les petites discussions autour du micro-onde. Une pensée également pour Perla et Pierre, bon courage pour la fin de vos thèses. Merci à Delphine pour ton travail sans lequel j'aurais été bien démunie, et comme tu l'as dit, les meilleures sont nées un 19 septembre.

Une pensée pour les anciens thésards de l'I2BC Laura et Pierrick, qui m'ont fait regretter de ne pas être au bâtiment 26, ainsi qu'à Romane, qui m'a fait être contente d'être au bâtiment 21.

Merci à mes amis. Merci à Laura, tu auras été le rayon de soleil à la fin d'une horrible première année de thèse. Merci à Alexanne, ma super première stagiaire. Une pensée pour Tanguy et Émeline de m'avoir gardée de puis le lycée, pour la bande du magistère Solène, Cloé, Constance, Célia et ma fillotte chérie Claire. Merci à la crème de la crème qui aura souffert en même temps que moi (sauf un !) Florian, Marion, Floriane et Alexis. Merci aux copains de grimpe pour ces moments où la thèse n'existait plus et en particulier aux plus beaux couples Solène & Pierre et Suzanne & Ivan. Merci à Victor et Matthieu, les copains de Marc qui sont maintenant aussi les miens. Et enfin, merci à Mathilde. On ne se sera pas beaucoup vue en quatre ans. Faut dire que Paris c'est loin quand on est en thèse et Orsay c'est loin quand on est en médecine. Mais je savais que tu étais là, et c'est ça qui compte.

Merci à Susanne et Jean-Loup de m'avoir accueillie chez vous pendant la rédaction de ma thèse et d'avoir pris tant soin de moi.

Merci à ma famille. À mes grands-parents Nini et Pagé pour leur soutien. À ma sis et mon bro, merci d'avoir été vilains avec moi quand j'étais petite, ça m'a aidé à forger mon caractère de cochon sans lequel je n'aurais jamais pu aller au bout de cette thèse. Je ne peux pas écrire ces lignes sans avoir une pensée pour Cuca et Pato, mes grands-parents partis trop tôt, avec qui j'aurais tant aimé pouvoir parler de ma recherche.

Un immense merci à mes parents. Depuis aussi loin que mes souvenirs remontent, vous êtes mes modèles et mon inspiration. Merci d'être toujours là pour moi que je sois triste ou heureuse, passionnée ou découragée, fatiguée ou excitée. Vous êtes mon socle, sans vous tout s'effondre, vous me poussez plus loin, vous me tirez vers le haut. Je n'aurais jamais été jusque-là sans vous.

Enfin, merci Marc de m'avoir écoutée râler, pleurer, m'énerver, me décourager. Merci d'avoir eu la patience de m'attendre les soirs (comme celui-ci) où je rentrais tard. Merci de m'avoir écoutée raconter mes interminables mais palpitantes histoires de voie JAK-STAT, de E-Cadhérine et de pôle postérieur. Merci de m'avoir forcée à déconnecter parfois. Merci pour tous les sacrifices. Merci pour les aventures passées et les nombreuses à venir. Mais surtout, merci d'avoir été là depuis le début et d'être toujours là à la fin.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION – PARTIE 1	1
1. La voie JAK-STAT : vous la préférez complexe ou simple ?	1
1.1. Tout commence chez les vertébrés	1
1.1.1. La cascade de signalisation : ne pas se fier aux apparences.....	1
1.1.1.1. Les familles nombreuses des ligands et leurs récepteurs.....	3
1.1.1.2. Les kinases JAK, uniques en leur genre	3
1.1.1.3. Les facteurs de transcription STAT, rapides et efficaces	4
1.1.2. Les rôles de la voie JAK-STAT : attention, ne pas perturber !	5
1.2. La drosophile permet d’y voir plus clair	7
1.2.1. Unpaired, y’en a pas deux, mais trois	7
1.2.2. Les acteurs solitaires de la transduction	8
1.2.2.1. Le récepteur Domeless	8
1.2.2.2. La kinase Hopscotch	8
1.2.2.3. Le facteur de transcription Stat92E	9
2. Si c’est connu chez l’un, c’est conservé chez l’autre : quelques exemples de rôles de la voie JAK-STAT.....	10
2.1. Prolifération et identité cellulaire	10
2.1.1. Le point commun entre une souris géante et une mouche aux gros yeux	10
2.1.2. Le lien du « sang » entre l’Homme et la drosophile	11
2.2. Migration cellulaire : conservation jusqu’au bout des ovaires	12
2.3. Intercalation cellulaire : pousse-toi de là que je m’y mette.....	13
3. La protection rapprochée de la voie JAK-STAT : régulation à tous les niveaux	15
3.1. Les trois familles de protéines inhibitrices de la voie JAK-STAT	15
3.1.1. Qu’est-ce qui inhibe les STAT activés ?.....	15
3.1.2. Et qu’est-ce qui supprime la signalisation par les cytokines ?.....	15
3.1.3. Enfin, qu’est-ce qui déphosphoryle les acteurs de la cascade ?.....	16
3.2. Le lien étroit entre les cytokines et la matrice extracellulaire	16
3.3. Les effets opposés des corécepteurs : l’homologie ne fait pas le type de régulation	17
3.4. Endocytose activatrice ou inhibitrice, pourquoi choisir ?.....	17
3.5. Régulation VIP : Vachement Influencée par la Polarité	18
4. L’ovaire de drosophile, une mine de rôles de la voie JAK-STAT	21
4.1. Mais commençons par le début, qu’est-ce qu’un ovaire de drosophile ? ...	21
4.1.1. Le germarium, l’origine de l’œuf	23

4.1.1.1. Les cellules souches germinales, nichées en antérieur du germarium.....	23
4.1.1.2. La formation du cyste, ou l'art de ne pas finir les divisions	23
4.1.1.3. La niche de cellules souches somatiques à la croisée des signaux passés et futurs	25
4.1.1.4. Déployer sa tige et bourgeonner hors du germarium.....	25
4.1.2. Le cyste dans le vitellarium : la cellule reine et ses ouvrières	29
4.1.3. L'épithélium folliculaire dans le vitellarium : monocouche, multifonction. 29	
4.1.3.1. Deux belles paires de cellules polaires	29
4.1.3.2. Les cellules folliculaires : rien ne se crée, tout se transforme	31
4.2. Les rôles de la voie JAK-STAT, maniaque de l'auto-contrôle.....	35
4.2.1. L'apoptose des cellules polaires : à la fin, il n'en restera que deux.....	37
4.2.2. Élongation : deux astuces pour passer d'une sphère à une ellipsoïde ...	37
4.2.3. Qui a cassé la symétrie de la voie JAK-STAT ?.....	39
4.3. On ne perturbe pas la voie JAK-STAT sans casser des œufs.....	41
INTRODUCTION – PARTIE 2.....	45
1. La polarisation antéro-postérieure : la course d'orientation de l'ovocyte .	45
1.1. Retour aux sources : initiation de la polarisation dans le germarium.....	47
1.1.1. La sélection de l'ovocyte : un match gagné d'avance	47
1.1.2. La transmission de savoir entre cystes pour l'ancrage de l'ovocyte.....	49
1.2. Maintenance de Par ici et de Par là	51
1.3. Et attendez, c'est pas fini, combien de réseaux de microtubules ?	53
1.3.1. Un noyau pour gouverner l'axe dorso-ventral	53
1.3.2. Le réseau cortical : difficile de ne pas être biaisé.....	55
1.4. Pas de transport, pas d'ancrage	56
1.4.1. ... pas d'ancrage, pas de déterminants... ..	56
1.4.2. ... pas de déterminants ... pas de déterminants	56
2. Le lien mystérieux entre les CFP et l'ovocyte	58
PROJET DE THÈSE	60
RÉSULTATS – PARTIE 1	63
Papier n°1 : E-cadherin acts as a positive regulator of the JAK-STAT signaling pathway during <i>Drosophila</i> oogenesis	65

RÉSULTATS – PARTIE 2.....	83
Papier n°2 : The localization of the posterior determinant Oskar in the <i>Drosophila</i> oocyte is defined by an interplay between E-Cadherin, EGFR and JAK-STAT signaling pathways in the adjacent follicular epithelium	85
Résultats préliminaires complémentaires au papier n°2.....	139
1. La voie JAK-STAT semble nécessaire à la forte accumulation de Cad99C dans les CAP et sous forme de vésicules au cortex de l'ovocyte.....	139
2. Des projections membranaires riches en actine-F émanent des CAP et pénètrent dans l'ovocyte au niveau de la zone d'ancrage d' <i>oskar</i> /Staufen.	141
3. <i>enabled</i> est exprimé dans les CAP en réponse à la voie JAK-STAT et est suffisant au maintien d'un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte.	143
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	147
1. Le rôle de la E-Cadhérine comme régulateur positif de la voie JAK-STAT.....	150
1.1. Nouvelle preuve d'une adhérence dépendante de la E-Cadhérine entre cellules folliculaires et germinales.....	150
1.2. Quelle population de E-Cadhérine folliculaire est impliquée dans la régulation positive de la voie JAK-STAT ?.....	151
1.3. La localisation subcellulaire de la E-Cadhérine et son interaction avec Stat92E dans l'ovaire	151
1.4. Discussion sur la conservation de la régulation de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine	152
1.4.1. Conservation de l'activation apicale de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine	153
1.4.2. La régulation positive de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine sans polarisation apicale.....	153
1.4.2.1. Ouverture aux niches de cellules souches germinales chez la drosophile	153
1.4.2.2. Ouverture à la niche de cellules souches dans l'intestin chez la drosophile	154
2. Les causes et conséquences de la dynamique de la E-Cadhérine et de la voie JAK-STAT au pôle postérieur	155
2.1. La diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires entourant l'ovocyte	155
2.1.1. Le rôle de la voie Gurken/EGFR dans la diminution de la E-Cadhérine	155
2.1.2. La diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires en contact avec la région antéro-latérale de l'ovocyte.....	157

2.1.3. Les conséquences de la diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires sur leur contact avec l'ovocyte	158
2.2. La E-Cadhérine comme cible de la voie JAK-STAT dans les CAP.....	159
2.2.1. L'expression de <i>shotgun</i> par la voie JAK-STAT dans les CAP ne dépend pas de Slbo	159
2.2.2. La E-Cadhérine et la voie JAK-STAT effectuent une boucle d'amplification dans les CAP	159
2.3. Les conséquences de la régulation croisée de la E-Cadhérine sur le gradient d'activité de la voie JAK-STAT au pôle postérieur.....	160
3. Le rôle nouvellement identifié de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogénèse : la différenciation des CAP	161
3.1. Le maintien d'un contact étroit entre les membranes semble indépendant d'une interaction Cadhérine-Cadhérine	161
3.2. Lien entre la E-Cadhérine, la polarité des CAP et le maintien d'un espace étroit entre les membranes	162
3.2.1. Lien entre polarité des CAP et les microvillosités apicales riches en Cad99C	162
3.2.1.1. La détection inattendue de Cad99C dans les cellules germinales.	163
3.2.1.2. Les rôles potentiels de la Cad99C au niveau des CAP.....	163
3.2.1.3. Lien entre la E-Cadhérine et la formation de microvillosités en région apicale des CAP	163
3.2.2. Lien entre polarité des CAP et les filopodes en émanant.....	164
3.2.3. Le cas particulier de la perte de fonction de la E-Cadhérine.....	164
4. Chronologie des évènements menant à l'ancrage initial d'<i>oskar</i>/Staufen	166
4.1. Le lien entre la séparation des membranes et le transport d' <i>oskar</i> /Staufen	166
4.1.1. L'influence de la séparation des membranes sur le réseau de microtubules	166
4.1.2. Les mécanismes possibles de restriction des croissants de Par-1 et d' <i>oskar</i> /Staufen	167
4.2. Le lien entre les CAP et l'ancrage d' <i>oskar</i> /Staufen.....	168
5. Ouverture sur le maintien de l'ancrage d'Oskar après le stade 10b	168
6. Ouverture à l'ancrage de l'ARNm <i>bicoid</i> au pôle antérieur de l'ovocyte..	169
BIBLIOGRAPHIE	181

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION – PARTIE 1.....	1
Figure 1 – La cascade de signalisation JAK-STAT chez les vertébrés.....	2
Figure 2 – La conservation fonctionnelle et moléculaire de la signalisation JAK-STAT entre les vertébrés et la drosophile.....	6
Figure 3 – La conservation des différents niveaux de régulation de la voie JAK-STAT entre les vertébrés et la drosophile.....	14
Figure 4 – Organisation d'une paire d'ovaire chez la drosophile.....	21
Figure 5 – Organisation du germarium : la niche des cellules souches germinales.....	22
Figure 6 – Organisation du germarium : la formation du cyste et la localisation des cellules souches somatiques.....	24
Figure 7 – Organisation du germarium : les étapes du bourgeonnement.....	26
Figure 8 – Les mécanismes de transport d'éléments cytoplasmiques des cellules nourricières vers l'ovocyte.....	28
Figure 9 – La morphogenèse des sous-populations antérieures de l'épithélium folliculaire.....	30
Figure 10 – Le patron d'activation de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire.....	34
Figure 11 – Le processus de monosis : premier rôle de la voie JAK-STAT dans le vitellarium.....	36
Figure 12 – L'élongation du follicule selon l'axe antéro-postérieur par deux processus successifs impliquant le patron d'activation de la voie JAK-STAT.....	38
Figure 13 – L'asymétrie antéro-postérieure de différenciation des cellules folliculaires.....	40
Figure 14 – Les différents niveaux de régulation du gradient d'activité de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire.....	42
INTRODUCTION – PARTIE 2.....	45
Figure 15 – La sélection de l'ovocyte dans le germarium.....	46
Figure 16 – La polarisation antéro-postérieure de l'ovocyte dans le germarium...	48
Figure 17 – La régionalisation des protéines Par au cortex de l'ovocyte.....	50
Figure 18 – Les voies de migration du noyau de l'ovocyte au stade 6.....	52
Figure 19 – La mise en place du réseau de microtubules cortical et du transport des déterminants cytoplasmiques dans l'ovocyte.....	54

RÉSULTATS – PARTIE 1.....	63
Figure 1 – JAK-STAT signaling activity and E-cadherin expression are dynamic and asymmetric between anterior and posterior poles starting at stages 7 and 6 of oogenesis respectively.....	67
Figure 2 – Somatic and germinal E-cadherin is necessary for JAK-STAT mediated polar cell apoptosis.....	71
Figure 3 – E-cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling.....	72
Figure 4 – E-cadherin and Stat92E are part of a physical complex in the follicular epithelium.....	74
Figure supplémentaire 1 – Expression patterns of the Gal4 drivers used to drive UAS transgenes in different cell types.....	78
Figure supplémentaire 2 – JAK-STAT signaling downregulation and E-Cadherin knock-down both lead to border cell migration defects.....	79
Figure supplémentaire 3 – Epithelial integrity is maintained in <i>shg</i> knock-down conditions as a result of N-Cadherin-mediated adhesion between follicle cells....	80
Figure supplémentaire 4 – E-Cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling, as shown by the use of RNAi line #3.....	81
RÉSULTATS – PARTIE 2.....	83
Figure 1 – <i>oskar</i> mRNA anchoring zone faces a precise number of PFCs, which maintain a tight contact with the oocyte.....	130
Figure 2 – JAK-STAT activity gradient is restricted to the PACs and is necessary to define the size of <i>oskar</i> mRNA anchoring zone in the oocyte.....	131
Figure 3 – JAK-STAT pathway activity in the PACs is sufficient to control the size of the <i>oskar</i> mRNA anchoring zone in the oocyte.....	132
Figure 4 – E-Cadherin levels decrease in PFCs in response to the Grk/EGFR signaling pathway.....	133
Figure 5 – <i>shg</i> , encoding E-Cadherin, is a regulator and a target of the JAK-STAT signaling pathway in the PACs.....	134
Figure 6 – <i>shg</i> is necessary to maintain the morphology and apico-basal polarity of the PACs and for <i>oskar</i> mRNA anchoring in the oocyte.....	135
Figure 7 – <i>shg</i> is sufficient in the PACs to control the size of <i>oskar</i> mRNA anchoring zone in the oocyte and is acting downstream of JAK-STAT signaling.	136
RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES COMPLÉMENTAIRES AU PAPIER N°2.....	138
Figure 1 – La voie JAK-STAT semble nécessaire à la forte accumulation de Cad99C dans les CAP et sous forme de vésicules au cortex de l'ovocyte.....	138
Figure 2 – Des projections membranaires riches en actine-F émanent des CAP et pénètrent dans l'ovocyte au niveau de la zone d'ancrage d' <i>oskar</i> /Staufen.....	140
Figure 3 – <i>enabled</i> est exprimé dans les CAP en réponse à la voie JAK-STAT et est suffisant au maintien d'un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte....	142

DISCUSSION..... 155

Figure 1 – Les Cellules d'Ancrage Postérieur (CAP) : une sous-population de
cellules folliculaires postérieures..... 148

Figure 2 – La diminution de la E-Cadhérine dans les cellules médiales entrant
en contact avec l'ovocyte..... 156

ABRÉVIATIONS

JAK : Janus Kinase

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

Upd : Unpaired

Dome : Domeless

Hop : Hopscotch

Baz : Bazooka

Slbo : Slow border cells

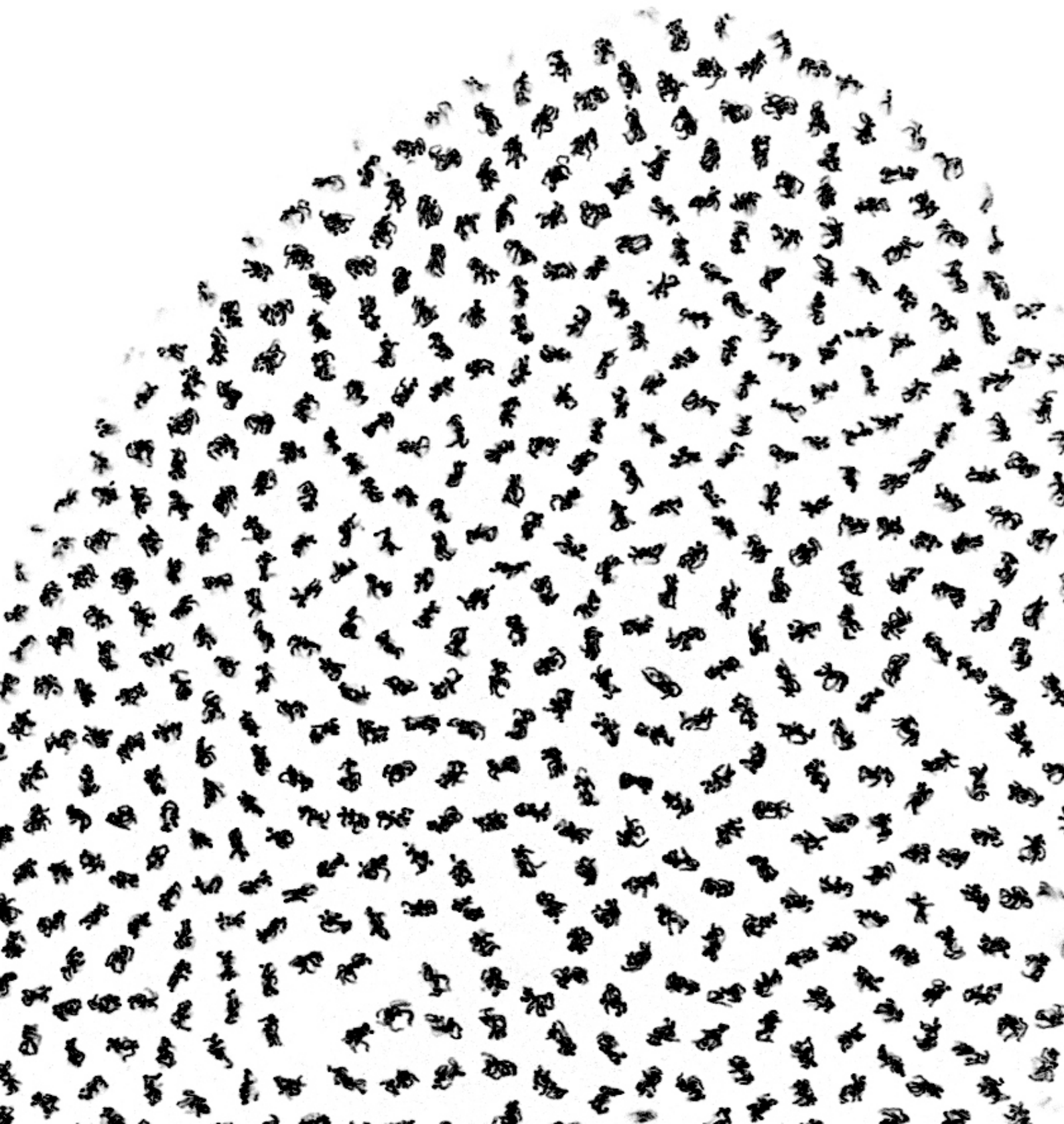
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

Oskar/Staufen : l'ARNm d'*oskar* en complexe avec la protéine Staufen

CFP : Cellules Folliculaires Postérieures

CAP/PACs : Cellules d'Ancre Postérieur / Posterior Anchoring Cells

INTRODUCTION



Noyaux (DAPI) se divisant de façon synchrone lors de la cellularisation de l'embryon.

INTRODUCTION – PARTIE 1

1. La voie JAK-STAT : vous la préférez complexe ou simple ?

1.1. Tout commence chez les vertébrés

En 1994 dans le journal Science paraît une revue nommant pour la première fois la famille de voies de signalisation JAK-STAT (acronymes expliqués lors de la présentation des acteurs de la signalisation) (Darnell et al., 1994) *. Cet article marque un tournant car la voie JAK-STAT et ses acteurs n'ont pas été découverts en une fois. Le processus d'identification de cette famille s'étale sur plusieurs dizaines d'années et est le fruit d'études dans des domaines distincts. Cette revue de 1994 rassemble et connecte toutes ces découvertes, regroupant tous les acteurs identifiés en famille et leur attribuant un nom.

Tout débute dans les années 50, quand des petites protéines produites et secrétées par les cellules en réponse à une infection virale sont identifiées par Isaac et Lindenmann (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ils les nomment interférons, du fait de leur implication dans le processus d'interférence virale [1]. En particulier, la mise en contact de cellules en culture avec des interférons entraîne une induction transcriptionnelle rapide et transitoire de gènes nommés « Gènes Stimulés par les Interférons » (ISG pour Interferon Stimulated Genes) (Knight and Korant, 1979; Friedman et al., 1984; Larner et al., 1984).

Dans les années 90, de nombreuses études sont menées, notamment par J. Darnell Jr et G. Stark, afin d'identifier les acteurs impliqués dans la transduction de ce signal extracellulaire. Le fait que la signalisation à l'interféron nécessite une cascade de phosphorylation est un premier indice qui mènera à faire le lien avec une nouvelle classe de Protéines Tyrosine Kinases (PTK), appelée JAK (Tiwari et al., 1988; Wathélet et al., 1989). En parallèle, la stimulation de la transcription des ISG observée en réponse aux interférons conduit à la description d'une nouvelle famille de facteurs de transcription, appelée STAT (Friedman et al., 1984; Larner et al., 1984).

* 1994, c'est mon année de naissance. Coïncidence ? Je ne crois pas.

1 – L'Interférence virale est la capacité d'un virus à inhiber la réplication d'un autre virus.

1.1.1. La cascade de signalisation : ne pas se fier aux apparences...

D'un point de vue global, la cascade de signalisation JAK-STAT est très simple. Elle est composée de trois classes d'acteurs permettant la transduction du signal extracellulaire (Figure 1A).

Le ligand extracellulaire vient se fixer sur les sous-unités de son récepteur transmembranaire. Suite à cette fixation, les sous-unités du récepteur vont changer de conformation et permettre le rapprochement de kinases JAK, liées à leurs région intracellulaire. Ces dernières vont pouvoir ainsi se transphosphoryler et phosphoryler

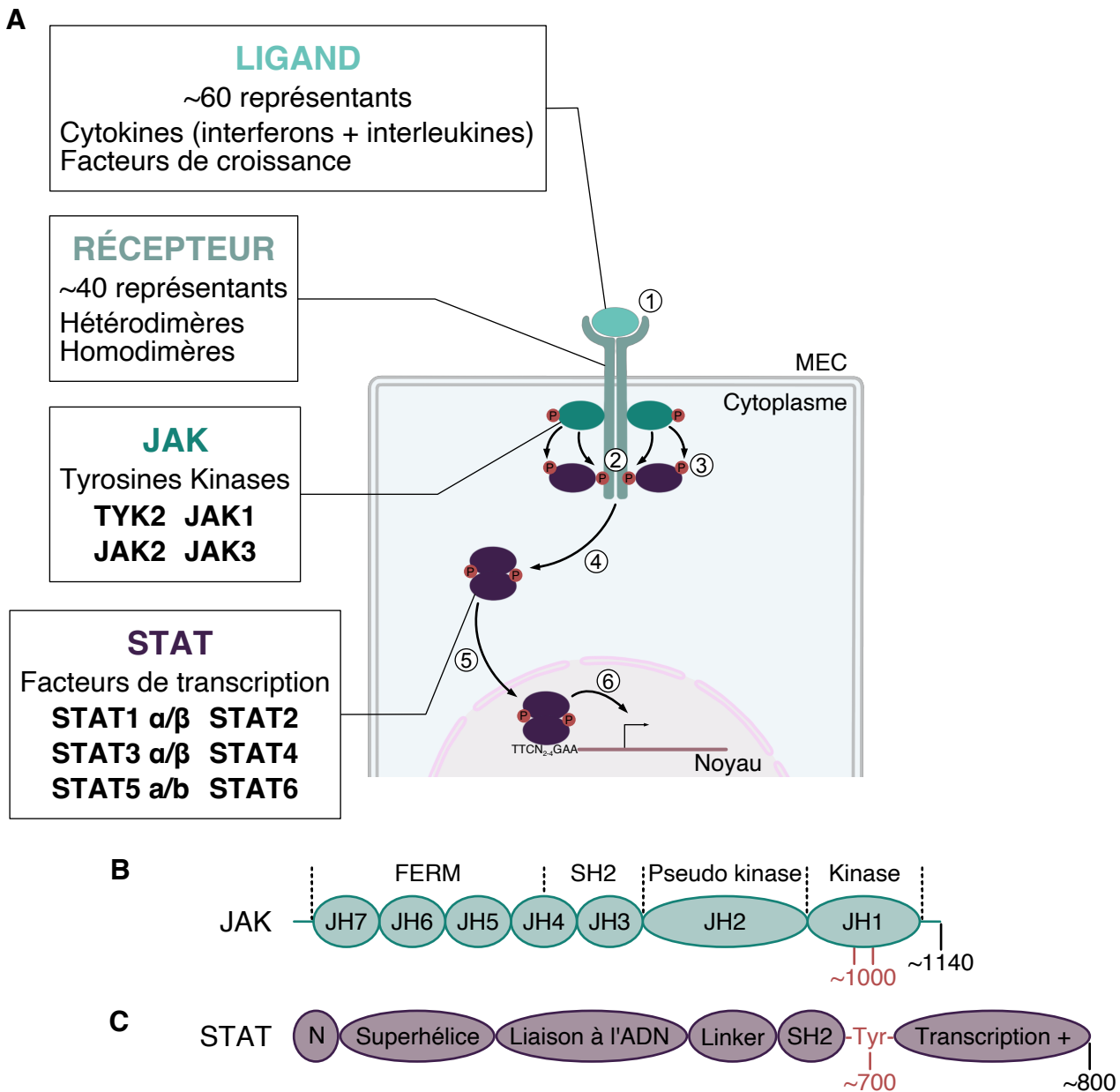


Figure 1 - La cascade de signalisation JAK-STAT chez les vertébrés. (A) Représentation schématique de la cascade de signalisation. Les étiquettes indiquent les différents acteurs avec leurs caractéristiques principales, détaillées dans le texte, et les noms des représentants en gras si adapté. Les (P) marrons symbolisent les phosphorylations. Les chiffres encadrés indiquent la chronologie des étapes de la cascade. (1) Liaison du ligand extracellulaire sur le récepteur et transphosphorylation activatrice des kinases JAK. (2) Phosphorylation des deux sous-unités du récepteur et des STAT. (3) Phosphorylation des STAT. (4) Association des STAT en dimère. (5) Translocation au noyau et fixation du dimère de STAT sur la séquence palindromique consensus TTCN₂-4GAA. (6) Activation de la transcription. **(B,C)** Représentation schématique de la structure commune aux protéines des familles JAK (B) et STAT (C) de N-terminal vers C-terminal. La taille des domaines telle que représentée n'est pas proportionnelle à la réalité. La taille approximative des protéines est indiquée en noir et les sites de phosphorylation sur tyrosine (Tyr) en marron. (B) L'anagramme FERM vient de 4.1 (Four point one), Ezrin, Radixin et Moesin, les noms des quatre premières familles de protéines dans lesquelles ce type de domaine a été identifié. Il permet l'interaction de protéines cytoplasmiques avec la membrane plasmique. Les domaines de type SH2 permettent une association avec d'autres protéines si elles présentent une phosphorylation sur Tyrosine. JH1 est le domaine catalytique à activité Tyrosine kinase. Il permet le transfert du phosphate γ de l'ATP sur un résidu tyrosine et présente deux sites de transphosphorylation activatrice aux alentours de la position 1000. Le domaine pseudokinase JH2 est structurellement similaire au domaine kinase mais présente des substitutions d'acides aminés le rendant inactif. (C) Les domaines N-terminal ("N"), "Superhélice" et "Transcription +" favorisent l'association en dimère, l'import/export nucléaire et l'activation de la transcription respectivement. Le domaine linker, comme son nom l'indique, fait le lien entre les domaines de liaison à l'ADN et SH2.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Hu *et al*, 2021, Ungureanu *et al*, 2011, Chishti *et al*, 1998 et Marengere and Pawson, 1994.

le récepteur, initiant le recrutement des facteurs de transcription STAT. A leurs tours phosphorylés, les deux facteurs de transcription vont s'associer en dimère, être transloqués au noyau et réguler l'expression de gènes cibles (Hu et al., 2021).

En revanche, ce qui rend cette voie de signalisation complexe, c'est que chaque classe d'acteurs de la voie JAK-STAT est composée de nombreux représentants. Revenons maintenant dans le détail.

1.1.1.1. Les familles nombreuses des ligands et leurs récepteurs

À ce jour, plus de 60 ligands différents de la voie JAK-STAT ont été identifiés. Aux interférons se sont ajoutés par la suite les interleukines (regroupées avec les interférons dans la famille des cytokines) et les facteurs de croissance (Darnell et al., 1994). Ils se fixent sur leurs récepteurs spécifiques, eux aussi très nombreux, puisque plus de 40 récepteurs sont associés à une activation de la voie JAK-STAT (la liste complète est accessible via la référence indiquée en bibliographie à (RND Systems)). Ces récepteurs sont composés de deux sous-unités, qui s'associent entre elles soit indépendamment du ligand (dimère constitutif), soit en réponse à sa fixation, et ce sous forme d'hétérodimères ou d'homodimères dans le cas des récepteurs aux cytokines ou aux facteurs de croissances respectivement (Hu et al., 2021).

Dans le contexte des études menées sur la réponse aux interférons, il avait été observé que la transduction du signal extracellulaire nécessitait une cascade de phosphorylation. Or, contrairement aux récepteurs de type tyrosine kinase, la particularité de ces récepteurs est qu'ils n'ont pas d'activité kinase intrinsèque. Un intermédiaire présentant une activité enzymatique est donc nécessaire. De fait, leurs régions intracellulaires contiennent, dans la section la plus proche de la membrane, deux domaines appelés Box 1 et 2, leur permettant une association non covalente mais constitutive avec les kinases de la famille JAK (Murakami et al., 1991; Kaplan et al., 1996).

1.1.1.2. Les kinases JAK, uniques en leur genre

Totalement indépendamment des études sur la réponse à l'interféron, les premières JAK ont été découvertes au cours de deux cribles d'identification de membres de la famille des Protéines Tyrosines Kinases (PTK, [2]) : TYK2, pour Tyrosine Kinase 2 (Firmbach-Kraft et al., 1990), et JAK1 et 2 (Wilks, 1989; Wilks et al., 1991). Un dernier membre de la famille, JAK3, est identifié peu après par plusieurs équipes (Rane and Reddy, 2000).

En revanche, elles sont rangées dans une classe distincte au sein de la famille des PTK du fait de leur structure particulière [3]. Les JAK sont composées de 7 domaines JH, pour JAK Homology (Figure 1B). Un élément distinctif par rapport aux autres PTK est la présence, en C-terminal, de non pas un mais deux domaines catalytiques adjacent, JH1 et JH2. Cependant, seul JH1 est fonctionnel. JH2 n'est pas associé à

une activité kinase mais est un domaine appelé « pseudokinase », qui aurait un rôle de régulateur négatif de l'activité kinase du domaine JH1 (Luo et al., 1997; Ungureanu et al., 2011). Les cinq autres domaines sont localisés en N-terminal : JH4-5-6-7, qui forment un domaine FERM (Chishti et al., 1998), et JH3-4, formant un domaine SH2 (Marengere and Pawson, 1994). Après repliement de la protéine, ces domaines permettent ensemble l'interaction constitutive des JAK avec leurs récepteurs (Ferrao and Lupardus, 2017).

Les premiers liens entre la cascade de phosphorylation en réponse à l'interféron et les JAK est fait par la découverte des rôles de Tyk2 puis de JAK1 et 2 dans cette signalisation (Velazquez et al., 1992; Müller et al., 1993).

2 – Les protéines à activité tyrosine kinase transfèrent le phosphate- γ de l'ATP sur des résidus tyrosines. Classiquement, les PTK possèdent un seul domaine catalytique tyrosine kinase, souvent localisé proche de l'extrémité C-terminale de la protéine ainsi que des domaines caractéristiques de liaison à d'autres intermédiaires de la cascade de signalisation (SH2, SH3, FERM, PH et FABD) (Rane and Reddy, 2000).

3 – Initialement, le nom JAK a pour signification « Juste Another Kinase ». Suite à l'identification de nombreuses différences structurales avec les autres PTK (présence d'un second domaine catalytique, liaison constitutive avec le récepteur), la signification de JAK est alors changée en « Janus Kinase », en référence au dieu romain Janus à deux visages.

1.1.1.3. Les facteurs de transcription STAT, rapides et efficaces

La découverte des facteurs de transcription STAT a lieu dans le contexte de la recherche sur les interférons présentée plus haut. L'induction rapide de la transcription des ISG suggère qu'un élément de régulation de l'expression génique est présent et activé dans les cellules recevant le signal interféron. Ce facteur de transcription constitué de quatre sous-unités est d'abord nommé Interferon-Stimulated Gene Factor 3 (ISGF3) [4-5] (Levy et al., 1988; Fu et al., 1990). La découverte d'autres protéines présentant des homologies de séquence avec les sous-unités 84-91 et 113 d'ISGF3 entraîne leur regroupement dans une même famille nommée STAT [6] : 91 et 84 deviennent STAT1 α et β respectivement, 113 devient STAT2, auxquels s'ajoutent STAT3 et 4 (Darnell et al., 1994; Zhong et al., 1994). STAT3 β , isoforme de STAT3, STAT5a et 5b et STAT6 sont découverts et rejoignent la famille peu après (Hou et al., 1994; Liu et al., 1995; Schaefer et al., 1995).

Les STAT présentent 6 domaines régulant différentes fonctions de ces protéines (voir Figure 1C (Ehret et al., 2001; Hu et al., 2021)). Notamment, et c'est ce qui fait leur particularité, ils possèdent un résidu tyrosine permettant leur phosphorylation, conservé chez les 7 membres, en C-terminal, et un domaine SH2 de liaison aux tyrosines phosphorylées (Fu, 1992).

4 – Les quatre sous-unités d'ISGF3 sont nommées d'après leur poids moléculaire : 48, 84, 91 et 113kDa. Par analyse de séquence, la sous-unité 48 est distinguée des autres car appartenant à la famille des IRF et est nommée IRF9 [5]. Les sous-unités 84 et 91 sont des protéines issues de deux transcrits d'un même gène et ont une forte homologie avec 113 (Fu et al., 1990; Darnell et al., 1994).

5 – IRF9 est l'un des membres de la famille des Facteurs de Réponse à l'Interféron (IRF pour Interferon regulatory factors) agissant comme co-facteur avec le dimère STAT1/2.

6 – STAT est l'acronyme de « Signal Transducer and Activator of Transcription », mais pas seulement : STAT en anglais signifie « rapidement », reflétant bien la vitesse de transduction du signal au cours de cette signalisation à l'interféron (Stark and Darnell, 2012).

1.1.2. Les rôles de la voie JAK-STAT : attention, ne pas perturber !

Bien qu'identifiée dans le contexte d'études sur la réponse aux interférons, il devient rapidement clair que la voie JAK-STAT est aussi la voie de transduction des signaux interleukines et facteurs de croissance et ainsi qu'elle régule des processus cellulaires majeurs : la prolifération, la différenciation et la migration, et ce en contexte physiologique pour l'immunité et le développement embryonnaire.

Mais c'est également un nouvel exemple de sa complexité car ces trois familles de ligands ont des effets antagonistes (référence dans la bibliographie (RND Systems)). Les interférons sont connus comme favorisant l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'entrée en apoptose contrairement aux facteurs de croissance, favorisant la prolifération et inhibant l'apoptose. Enfin, certaines interleukines ont les mêmes effets que les interférons et d'autres que les facteurs de croissance. Cette dualité est le reflet des diverses cibles des facteurs de transcription STAT, incluant des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. STAT1 favorise l'apoptose et inhibe la prolifération cellulaire via l'activation de la transcription du gène codant p21, et a donc en effet suppresseur de tumeur (Chin et al., 1996). Au contraire, STAT3 et 5 ont des effets oncogènes. Par exemple, STAT3 a pour cible des gènes codant des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-xl, Bcl-2, Mcl-1) et des protéines favorisant la prolifération (Cycline D, Myc) (Bromberg et al., 1999). Par conséquent des perturbations de la voie JAK-STAT sont à l'origine de nombreuses formes de cancer du sang ou à tumeur solide (Bromberg, 2002).

CONCLUSION

La voie de signalisation JAK-STAT peut donc être activée par plus de 60 ligands différents, pouvant se fixer sur plus de 40 récepteurs. Cette quantité d'initiateurs de la cascade donne une première indication sur la variété de signalisations JAK-STAT existantes. Mais si on prend en plus en compte que la majorité de ces récepteurs peut être associée à plusieurs JAK parmi les 4 membres et que les différentes kinases peuvent elles aussi activer plusieurs STAT parmi les 7 représentants et qu'en retour,

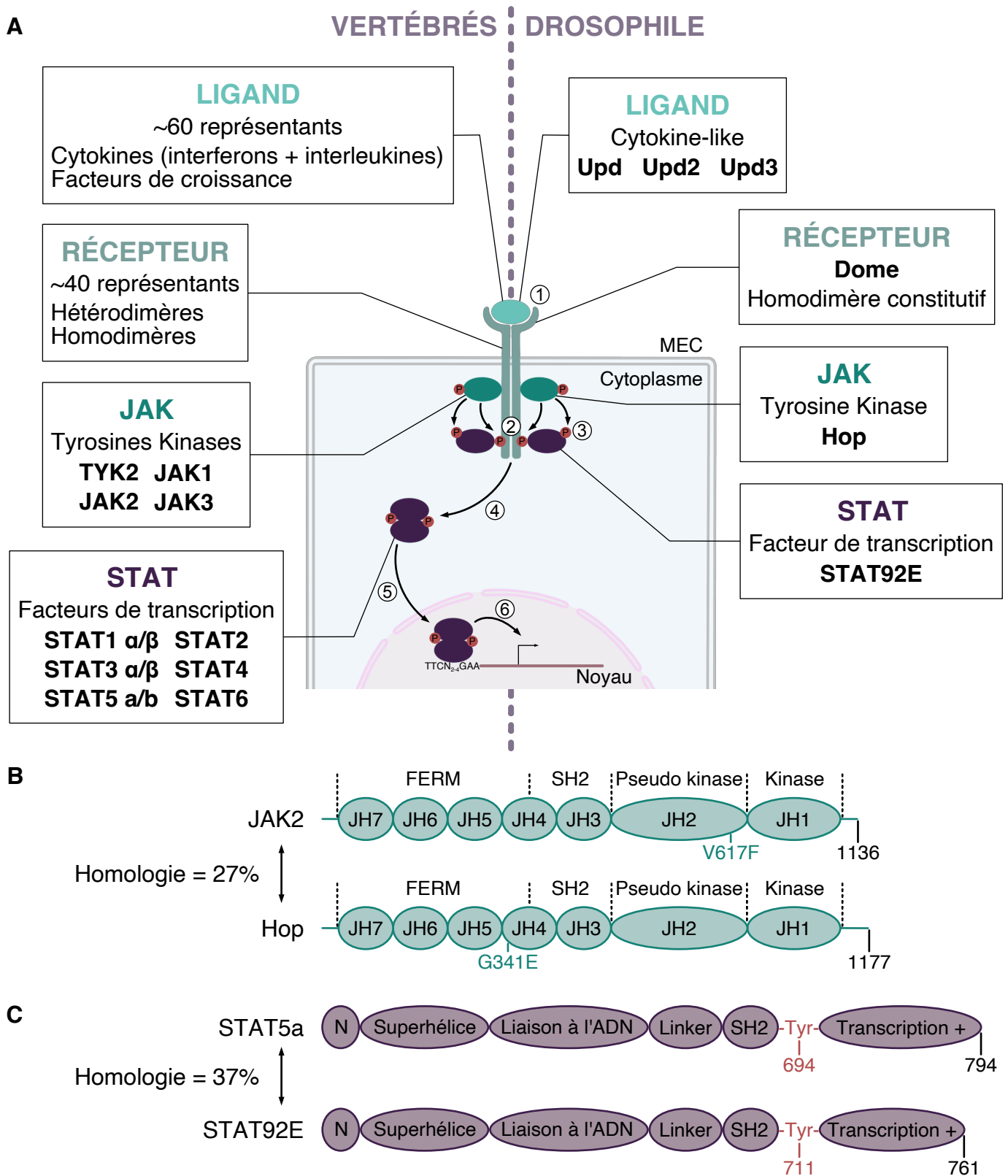


Figure 2 - La conservation fonctionnelle et moléculaire de la signalisation JAK-STAT entre les vertébrés et la drosophile. (A) Représentation schématique de la cascade de signalisation JAK-STAT chez les vertébrés (Gauche) et chez la drosophile (Droite). Les différents types d'acteurs sont indiqués par les étiquettes, avec leurs caractéristiques principales, détaillées dans le texte, et les noms des représentants en gras, si adapté. Les (P) marrons symbolisent les phosphorylations. Les chiffres encadrés indiquent la chronologie des étapes de la cascade, détaillée en légende de la figure 1, identique entre les vertébrés et la drosophile. **(B,C)** Représentation schématique des structures de Hop (B) et STAT92E (C) sous celles des représentants chez les vertébrés avec lesquelles elles ont le plus d'homologie de séquence (pourcentages présentés à gauche). Les domaines sont organisés de N-terminal vers C-terminal et leurs fonctions sont détaillées en légende de la figure 1. La taille approximative des protéines est indiquée en noir, les mutations par substitution entraînant une activation constitutive (détaillées dans le texte en partie 2.1.2) en bleu et les sites de phosphorylation sur tyrosine (Tyr) en marron. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Hu *et al*, 2021 et Hanratty and Dearolf 1993.

ces STAT peuvent former soit des homodimères soit des hétérodimères, et cibler de nombreux gènes, on entrevoit alors l'immense complexité de cette voie de signalisation. Par conséquent, son étude chez le modèle vertébré, pourtant cruciale au vu de ses rôles dans des processus physiologiques variés et les effets délétères de sa perturbation, présente une limite. L'identification d'un modèle plus simple mais robuste pour comprendre le fonctionnement précis de cette voie de signalisation et de sa régulation est rapidement devenu indispensable.

La voie JAK-STAT est l'une des voies de signalisation les mieux conservées autant au niveau fonctionnel que moléculaire et elle est retrouvée dans un grand nombre d'espèces de la famille des métazoaires, dont les invertébrés. Dans le contexte de ma thèse, j'ai utilisé le modèle de la drosophile, chez qui la voie JAK-STAT a l'avantage d'être simplifiée puisqu'un nombre bien inférieur de membres de la voie y sont représentés, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de cette signalisation.

1.2. La drosophile permet d'y voir plus clair

Chez la drosophile, la cascade de signalisation JAK-STAT se déroule similairement aux vertébrés (Figure 2A) mais les acteurs de la transduction du signal ne sont présents que sous une seule forme. Seul le ligand existe sous trois formes. L'absence de redondance des différents transducteurs de la voie JAK-STAT permet donc d'affecter son activité en ne modifiant qu'un seul de ces acteurs.

1.2.1. Unpaired, y'en a pas deux, mais trois

Unpaired (Upd), le ligand activateur de la voie JAK-STAT chez la drosophile a été identifié comme tel en 1998 par D.A. Harrison (Harrison et al., 1998). Cependant, ce n'est pas la recherche sur la voie JAK-STAT qui a permis la découverte de ce gène, mais l'étude de la segmentation de la larve de drosophile menée par E. Wieschaus dans les années 80 [7] (Gergen and Wieschaus, 1986).

Le gène *upd* est présent sur le chromosome X de la drosophile. Il code une glycoprotéine qui, après sécrétion, diffuse pour signaler à proximité ou à distance de son lieu de production (Harrison et al., 1998; Zeidler et al., 1999). Deux autres gènes homologues d'*upd* ont été identifiés, appelés *upd2* et *upd3*, à proche distance du gène *upd* (Hombría et al., 2005; Wright et al., 2011). Des recherches d'homologie de séquence avec les familles de gènes codant les ligands qui activent la voie JAK-STAT chez les vertébrés n'ont rien donné. Cependant, la structure secondaire d'Upd présente de nombreuses régions repliées en hélices alpha, similaires aux structures des cytokines des vertébrés (Harrison et al., 1998).

7 – Le gène *upd* est identifié comme gène de segmentation car sa mutation, en plus d'entraîner une déformation des spiracles postérieures, engendre une diminution du nombre de segments chez l'embryon. Cependant, parmi les catégories de gènes de segmentation, les gènes de

classe gap et pair-rule contrôlent des groupes de segments adjacents ou un segment sur deux respectivement (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). *upd* est nécessaire à la formation des segments T2, A5, de la frontière A6/A7 et du segment A8, ce qui correspond à un espacement de type 6-1,5-1,5. Ce type d'espacement particulier empêche de classer *upd* dans une des catégories de gènes de segmentation existantes et lui a valu son nom, *unpaired* (Gergen and Wieschaus, 1986). Par la suite, il a été identifié que Upd, via l'activation de la voie JAK-STAT, régule l'expression des gènes pair-rule *even-skipped (eve)*, *fushi tarazu (ftz)* et *runt* (Harrison et al., 1998).

1.2.2. Les acteurs solitaires de la transduction

1.2.2.1. Le récepteur Domeless

Le seul et unique récepteur de la voie JAK-STAT chez la drosophile est l'acteur qui a été découvert le plus tardivement, de façon simultanée par J. Castelli-Gair Hombria et S. Hou. Le gène *domeless* ou *dome* [8], également nommé *master of marelle/mom* par S. Hou, est localisé sur le chromosome X et code une protéine transmembranaire. Il présente près de 20% d'homologie de séquences avec les récepteurs aux cytokines des vertébrés, la plus forte homologie étant avec IL6-R, (Brown et al., 2001; Chen, 2002). Le récepteur Dome est adressé à la membrane où il va s'homodimériser indépendamment du ligand (Brown et al., 2003).

La région extracellulaire de Dome présente cinq domaines « fibronectin-type III », dont deux forment un domaine similaire aux domaines « cytokine binding module » (CBM) retrouvés dans les récepteurs aux cytokines de classe I chez les vertébrés. La fixation du ligand Upd sur ce domaine CBM-like entraîne un changement de conformation du récepteur (Brown et al., 2003).

Comme les récepteurs de la voie JAK-STAT chez les vertébrés, Dome ne possède pas de domaine kinase intrinsèque dans sa région intracellulaire mais présente un motif LP, similaire au domaine Box 1 des récepteurs de la voie JAK-STAT chez les vertébrés, et permettant la liaison constitutive de la kinase JAK (Fisher et al., 2016).

8 – Le nom *domeless* vient de la déformation des spiracles postérieures chez la larve, qui perdent leur forme caractéristique de dôme, associée à une perturbation de la voie JAK-STAT et observée en perte de fonction de *dome* (Brown et al., 2001).

1.2.2.2. La kinase Hopscotch

En 1986, la même année où les phénotypes associés à une mutation du gène *upd* sont publiés par E. Wieschaus, le gène *hopscotch (hop)*, [9] est identifié, lui aussi localisé sur le chromosome X (Perrimon and Mahowald, 1986). Mais il faut attendre encore 7 ans avant que son activité et son lien avec la voie JAK-STAT soient découverts : en 1993, R. Binari et N. Perrimon identifient que le gène *hop* code une protéine à activité tyrosine kinase (Binari and Perrimon, 1994). Hop présente les sept différentes régions JAK homology trouvées chez les JAK des vertébrés dont les

domaines catalytiques JH1 et JH2, le domaine pseudokinase, avec autour de 39% et 25% d'homologie, respectivement (Figure 2B). Mais en comparant la séquence entière de *hop*, c'est avec le gène codant Jak2 que la plus forte homologie est trouvée (27%)(Binari and Perrimon, 1994). Similairement aux JAK des vertébrés, Hop présente un domaine FERM permettant son association avec chaque monomère Dome sur le motif LP (Fisher et al., 2016).

9 – Les phénotypes associés à une mutation de *hop* sont les mêmes que ceux associés à une mutation d'*upd* en terme de segmentation. Son nom, signifiant marelle en anglais, a été donné par rapport à cette particularité de réguler la segmentation uniquement au niveau de certains segments, comme on sauterait des cases en jouant à la marelle (Perrimon and Mahowald, 1986; Binari and Perrimon, 1994).

1.2.2.3. Le facteur de transcription Stat92E

Peu après la caractérisation de Hop, les équipes de N. Perrimon et J. Darnell Jr découvrent simultanément un même gène codant un facteur de transcription, nommé respectivement *Drosophila-Stat* (*D-Stat*) et *marelle* (*mrl*), le choix de ce dernier nom toujours en référence à ces phénotypes particuliers observés sur la segmentation de la larve (Hou et al., 1996; Yan et al., 1996). Par la suite, ce gène a été renommé *Stat92E*, son nom le plus utilisé actuellement [10].

La séquence en acides aminés de Stat92E présente des homologies proches de 35% avec STAT5 et 6 des vertébrés (Figure 2C) (Hou et al., 1996). Stat92E est recruté sur Dome phosphorylé, ce qui le place à proximité de Hop, permettant sa phosphorylation sur une tyrosine en position 704 (Yan et al., 1996). Il va alors se détacher et s'associer en dimères pour être transloqué dans le noyau et se fixer sur des sites de fixation, TTCnnnGAA, proches en terme de séquence des sites de fixation de STAT chez les vertébrés [11] (Hou et al., 1996; Yan et al., 1996).

10 - *mrl/D-Stat* est le seul acteur de la voie JAK-STAT dont le gène n'est pas localisé sur le chromosome X. Il se trouve sur le chromosome 3, au niveau de la région 92E2, ce qui a donné son nom le plus utilisé actuellement, *Stat92E* (Hou et al., 1996; Yan et al., 1996).

11 – En plus de ce mode d'action classique, Stat92E présente un rôle non canonique de régulation de l'expression génique : il est également présent sous forme non phosphorylée dans le noyau, où il est associé avec la protéine HP1 et favorise la compaction sous forme d'hétérochromatine. Pour cette fonction, sa phosphorylation par Hop a pour conséquence de désassembler le complexe Stat92E/HP1 et de déstabiliser l'hétérochromatine (Shi et al., 2006, 2008). Ce rôle pourrait être conservé chez les vertébrés, où STAT3 et STAT5a sont aussi présents sous formes non phosphorylées dans le noyau, mais leur lien avec l'hétérochromatine n'a pas été démontré (Li, 2008).

CONCLUSION

Ainsi, cette conservation fonctionnelle et moléculaire de la signalisation JAK-STAT entre les vertébrés et la drosophile justifie totalement l'utilisation de ce modèle génétique pour l'étude de la voie JAK-STAT. Mais si vous avez besoin d'autres arguments pour être convaincus, outre la cascade de signalisation, les rôles impliquant la voie JAK-STAT chez les vertébrés trouvent également leur parallèle chez la drosophile. Comme évoqué précédemment, la voie JAK-STAT régule des processus cellulaires majeurs en contexte physiologique pour l'immunité et le développement embryonnaire, et ce de façon conservée chez la drosophile, de même que sa dérégulation induit des pathologies comparables chez la drosophile et l'homme.

La partie suivante a pour but d'exposer des exemples de processus contrôlés par la voie JAK-STAT chez les vertébrés qui trouvent leur écho chez la drosophile.

2. Si c'est connu chez l'un, c'est conservé chez l'autre : quelques exemples de rôles de la voie JAK-STAT

2.1. Prolifération et identité cellulaire

2.1.1. Le point commun entre une souris géante et une mouche aux gros yeux

En 1997, dans le but d'étudier ses rôles chez les vertébrés, des souris mutantes nulles STAT3 ont été générées (STAT3^{-/-}) (Takeda et al., 1997). Étonnamment, alors que la perte de fonction totale des autres membres de la famille STAT n'empêche pas le développement embryonnaire (Levy and Lee, 2002), aucun individu STAT3^{-/-} n'est viable. Le génotype STAT3^{-/-} confère un phénotype léthal embryonnaire à un stade très précoce, suggérant un rôle important de STAT3 pour les premières étapes du développement.

En 2004, cette léthalité est contournée en générant cette fois des souris hétérozygotes STAT3^{-/SA}, porteuse d'un allèle nul de STAT3 (-) en face d'un allèle muté codant une forme de STAT3 à activité transcriptionnelle réduite (SA) (Shen et al., 2004). Si les individus STAT3^{-/SA} parviennent à terme, ils naissent avec un net défaut de croissance possiblement en raison d'un défaut dans la voie Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) [12]. Cette hypothèse se confirme grâce à une étude montrant que la perte de fonction d'un inhibiteur de JAK-STAT entraîne une augmentation de la signalisation IGF-1, conduisant à une augmentation drastique de la taille des souris dû à une prolifération cellulaire accrue (Metcalf et al., 2000).

Mais bien avant le début de cette histoire, un lien entre la voie JAK-STAT, un défaut de prolifération cellulaire et la léthalité embryonnaire avait déjà été identifié, chez la drosophile. À leur découverte, à la fois *hop* et *Stat92E* sont décrits comme étant nécessaires à la survie au stade larvaire à la fois par effet maternel et zygotique [13]. Leur expression par la larve est requise pour l'acquisition d'une taille correcte des disques imaginaux en favorisant la prolifération cellulaire, influant la taille des

appendices au stade adulte [14] (Perrimon and Mahowald, 1986; Hou et al., 1996). En prenant l'exemple du disque œil-antenne, une suractivation de la voie JAK-STAT entraîne une augmentation du taux de prolifération des cellules du disque imaginal, menant *in fine* à la formation d'un œil élargi au stade adulte (Bach et al., 2003), tandis qu'à l'inverse, la surexpression d'un inhibiteur de la voie JAK-STAT conduit à un œil réduit (Betz et al., 2001).

12 – IGF-1 est un facteur de croissance majeur du développement embryonnaire tardif, nécessaire à la croissance par prolifération, qui agit sur la durée du cycle cellulaire. (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993; Agrogiannis et al., 2014).

13 – *Stat92E*, *hop* et *dome* sont à la fois des gènes à effet maternel et zygotiques. En effet, leurs ARNm sont déposés dans l'œuf au cours de l'ovogenèse et sont requis après fécondation pour la segmentation puis sont exprimés par le zygote pour le rôle discuté dans cette partie (Perrimon and Mahowald, 1986; Hou et al., 1996; Brown et al., 2001). En revanche, *upd* n'a pas d'effet maternel et son rôle dans la segmentation dépend de son expression par le zygote (Harrison et al., 1998).

14 – Les disques imaginaux sont des structures présentes au stade larvaire qui donneront différents organes (yeux, organes génitaux) et appendices (pattes, ailes, antennes, altères) au stade adulte. Leur nom vient d'imago, nom donné au stade adulte d'un insecte.

2.1.2. Le lien du « sang » entre l'Homme et la drosophile

La voie JAK-STAT a été largement démontrée comme étant impliquée dans l'homéostasie cellulaire et le maintien de l'état indifférencié des cellules souches somatiques et ce autant chez les vertébrés que chez la drosophile, comme par exemple dans l'intestin, où la signalisation est active dans les cellules souches intestinales (Beebe et al., 2010; Matthews et al., 2011; Peron et al., 2020).

Mais prenons plutôt un autre exemple de cette conservation, dans un contexte d'immunité au niveau de la niche des cellules souches hématopoïétiques. Cette niche est trouvée au niveau de la moelle osseuse chez les vertébrés [15], et dans la glande lymphatique chez la larve de drosophile [16]. Dans ces deux cas, la voie JAK-STAT est active dans les progéniteurs hématopoïétiques (Morin-Poulard et al., 2013; Fasouli and Katsantoni, 2021).

Chez les vertébrés, la voie JAK-STAT est ainsi à l'origine de nombreux syndromes myéloprolifératifs, c'est-à-dire une surproduction de cellules du sang : des globules rouges dans le cas de la polycythemia vera et des plaquettes pour la thrombocytémie essentielle (Levine et al., 2005). Une mutation dans le gène codant JAK2 a été identifiée dans 90% des cas de polycythemia vera et dans 50% des cas de thrombocytémie essentielle. Cette mutation, une substitution de la valine en position 617 en phénylalanine (V617F), est localisée dans le domaine pseudokinase JH2. Elle

empêche la régulation négative de JH2 sur JH1, et de fait entraîne une activation constitutive de JAK2 (Levine et al., 2005).

Chez la drosophile, avant même l'identification du gène *hop*, une mutation appelée *Tum^L* est étudiée pour son effet oncogène et sa létalité (Corwin and Hanratty, 1976). Au stade larvaire, elle induit une prolifération excessive des hémocytes, et en particulier des plasmacytes, qui vont se différencier prématurément en lamellocytes, s'agréger et former des tumeurs appelées mélanotiques (Hanratty and Ryerse, 1981). Il est décrit plus tard que *Tum^L* correspond à la substitution d'une glycine en acide glutamique en position 341 dans le domaine JH4 du gène *hop* (Hanratty and Dearolf, 1993), entraînant une activation constitutive de la kinase et donc une hyper-activation de la voie JAK-STAT (Harrison et al., 1995; Luo et al., 1997). L'allèle de *hop* portant la mutation est maintenant appelé *hop^{TUM}*. Ces similitudes entre les phénotypes liés à cet allèle et les syndromes myéloprolifératifs ont poussé une équipe à mener une étude des cibles transcriptionnelles de JAK-STAT en contexte d'activation constitutive par *Hop^{TUM}*. Certaines de ces cibles sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire et ont des homologues chez l'Homme (Bina et al., 2010).

15 – Chez les vertébrés, l'hématopoïèse est le processus de production des deux lignées de cellules du sang, myéloïde et lymphoïde.

16 – Chez la drosophile, il n'y a pas de lignée lymphoïde. Les progéniteurs multipotents de la lignée myéloïde sont appelés pro-hémocytes. Ils vont donner trois types cellulaires, regroupés sous le nom d'hémocytes (Letourneau et al., 2016) :

- Les plasmacytes, dont le rôle est similaire aux macrophages.
- Les cellules à cristaux, dont le rôle est similaire aux plaquettes.
- Les lamellocytes, produits uniquement au stade pupal en réponse à un stress immun, permettant d'encapsuler et de neutraliser des pathogènes.

La lignée myéloïde émerge très tôt au cours du développement, lors de deux vagues ayant lieu aux stades embryonnaire et larvaire. Au stade adulte, plus aucun processus d'hématopoïèse n'a lieu, les cellules différenciées circulent dans l'hémolymph (Letourneau et al., 2016).

2.2. Migration cellulaire : conservation jusqu'au bout des ovaires

Chez les vertébrés, la voie JAK-STAT favorise la migration cellulaire dans des contextes physiologiques, par exemple lors de la gastrulation chez *Dario rerio*, où STAT3 est actif dans les cellules du mésoderme axial et nécessaire de façon autonome cellulaire pour la migration de la sous-population antérieure de ce feuillet (Yamashita et al., 2002), ainsi que lors de la cicatrisation après blessure au niveau de la peau chez la souris, où STAT3 est requis dans les kératinocytes (Sano et al., 1999). De fait, une suractivation de STAT3 a très souvent été détectée dans les cellules tumorales de cancer du sein, de la prostate et de l'ovaire (Burke et al., 2001; Gao et al., 2001; Bromberg, 2002). En prenant l'exemple des cancers ovariens, dans une

majorité des cas, les cellules cancéreuses dérivent de l'épithélium monostratifié recouvrant l'ovaire (Auersperg et al., 2001). Il a été montré que le caractère agressif du cancer, dont la transition épithélio-mésenchymateuse pour la formation de métastase, est dépendant de l'activation de STAT3 (voir [30]) (Silver et al., 2004).

Chez la drosophile, un cas similaire de délamination et de migration de cellules provenant d'un épithélium monostratifié, appelées cellules de bordure, a lieu dans l'ovaire et est étudié pour ses similitudes avec le comportement des cellules des carcinomes ovariens (Naora and Montell, 2005). Notamment, la voie JAK-STAT, fortement active dans les cellules de bordure, est requise pour leur transition épithélio-mésenchymateuse et leur migration (voir [30]) (Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002; Silver et al., 2005). Ce modèle a permis l'identification de deux gènes spécifiquement exprimés dans les cellules de bordures, *slow border cells (slbo)*, une cible de la voie JAK-STAT, et *jaguar*, lui-même régulé par *slbo* et codant la Myosine VI (Montell et al., 1992; Geisbrecht and Montell, 2002). Ces deux gènes ont des homologues chez les vertébrés, eux aussi surexprimés dans des formes agressives de cancer ovarien (Sundfeldt et al., 1999; Yoshida et al., 2004).

2.3. Intercalation cellulaire : pousse-toi de là que je m'y mette

Au cours du développement embryonnaire, la voie JAK-STAT est impliquée dans des processus d'intercalation cellulaire. Pour reprendre l'exemple de *Dario rerio*, en plus du rôle dans la migration cellulaire présenté ci-dessus, la voie JAK-STAT est requise dans les cellules du mésoderme axial pour agir de façon non-autonome cellulaire sur l'intercalation des cellules du mésoderme para-axial lors du processus de convergence extension (Yamashita et al., 2002).

La régulation de ce type de réarrangement cellulaire par la voie JAK-STAT a également été observé chez la drosophile. Son action est cependant plus directe puisque la voie JAK-STAT est requise de façon autonome-cellulaire. Par exemple, dans l'épithélium folliculaire de l'ovaire, la voie JAK-STAT est nécessaire à la constriction apicale des cellules folliculaires, menant à une intercalation orientée et à l'élongation du tissu (voir 4.2.2)(Alégot et al., 2018). Lors de l'élongation de la bandelette germinative chez l'embryon, la voie JAK-STAT va aussi favoriser l'intercalation des cellules de l'ectoderme ventro-latéral, mais son action passe au contraire par une répression de la constriction apicale (Bertet et al., 2009).

CONCLUSION

Ainsi, la conservation de rôles de la voie JAK-STAT chez la drosophile est un argument supplémentaire en faveur de la pertinence de son utilisation comme modèle d'étude de cette signalisation. De plus, les nombreux phénotypes associés à une perturbation de la voie JAK-STAT observables aux différents stades de développement de la drosophile offrent autant de possibilité d'investigation de ses mécanismes de régulation.

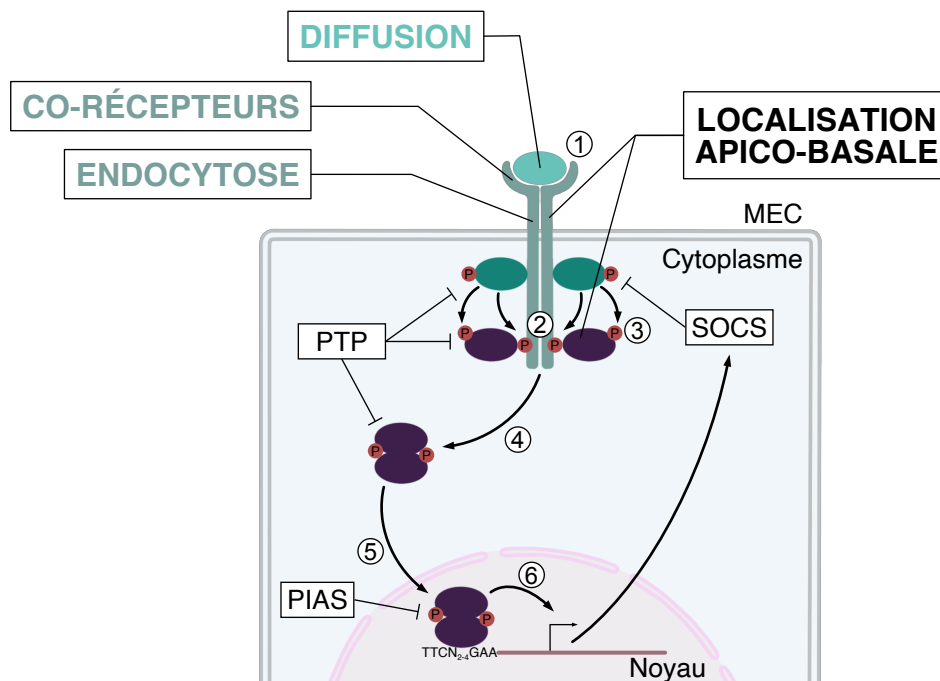


Figure 3 - La conservation des différents niveaux de régulation de la voie JAK-STAT entre les vertébrés et la drosophile. Représentation schématique de la cascade de signalisation JAK-STAT illustrant les niveaux d'action des différents systèmes de régulation (étiquettes) et des protéines régulatrices (PIAS, SOCS, PTP), dont les mécanismes d'action sont détaillés dans le texte. Les (P) marrons symbolisent les phosphorylations. Pour le détail des acteurs principaux de la voie JAK-STAT, voir figures 1 et 2. Les chiffres encadrés indiquent la chronologie des étapes de la cascade, détaillée en légende de la figure 1, identique entre les vertébrés et la drosophile.

Chez les vertébrés, certains de ces mécanismes déjà identifiés sont retrouvés chez la drosophile.

3. La protection rapprochée de la voie JAK-STAT : régulation à tous les niveaux

Les mécanismes de régulation de la voie JAK-STAT sont multiples, touchant chaque niveau de la cascade de signalisation. Dans cette partie, je vais présenter certains de ces mécanismes conservés entre vertébrés et drosophile (Figure 3).

3.1. Les trois familles de protéines inhibitrices de la voie JAK-STAT

Un des systèmes de modulation de la voie JAK-STAT est via des acteurs externes aux acteurs principaux de la cascade de signalisation. Trois familles de protéines présentant des homologues chez les vertébrés et chez la drosophile sont connues pour réguler négativement la voie JAK-STAT. Faisons un quizz (la question est dans le titre) :

3.1.1. Qu'est-ce qui inhibe les STAT activés ?

La famille des Protéines Inhibitrices des STAT Activés (PIAS pour Protein Inhibitor of Activated STAT), dont il existe quatre membres chez les vertébrés (Hu et al., 2021) et un homologue chez la drosophile, dPIAS (aussi appelé Zimp)(Betz et al., 2001). Ils interagissent physiquement avec les dimères de STAT, empêchant leur liaison à l'ADN (Chung et al., 1997; Betz et al., 2001). Les PIAS sont aussi associés à une fonction de sumoylation de facteurs de transcription dont les STAT [17] (Kotaja et al., 2002; Ungureanu et al., 2003), sans que l'implication de ce rôle dans le mécanisme de régulation de la voie JAK-STAT *in vivo* n'ait été précisément identifié.

17 – La sumoylation est un mécanisme de modification post-traductionnelle permettant la liaison covalente réversible de protéines SUMO sur des résidus lysine de leurs protéines cibles, modifiant leur capacité d'interaction avec d'autres protéines, leur stabilité, leur localisation ou leur activité.

3.1.2. Et qu'est-ce qui supprime la signalisation par les cytokines ?

La famille des Suppresseurs de Signalisation par les Cytokines (SOCS pour Suppressors Of Cytokine Signaling), avec sept membres chez les vertébrés (Hu et al., 2021) et trois homologues chez la drosophile, dont un, SOCS36E, qui agit comme régulateur négatif de la voie JAK-STAT (Callus and Mathey-Prevot, 2002; Karsten et al., 2002; Baeg et al., 2005). Les SOCS agissent par plusieurs mécanismes pour inhiber la voie JAK-STAT, notamment en se liant aux récepteurs et aux JAK, empêchant la fixation de STAT et la cascade de phosphorylation (Hu et al., 2021). La grande particularité des SOCS est qu'ils sont aussi des cibles transcriptionnelles des

STAT, permettant la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négatif après activation de la voie.

3.1.3. Enfin, qu'est-ce qui déphosphoryle les acteurs de la cascade ?

Des phosphatases ! (Je vous ai eu ?) Notamment PTBP1 chez les vertébrés (de la famille des PTP pour Protein Tyrosine Phosphatases, (Myers et al., 2001)) et son homologue chez la drosophile PTP61F (Baeg et al., 2005; Müller et al., 2005) régulent négativement la voie JAK-STAT en interagissant avec les acteurs phosphorylés de la cascade via des domaines SH, en les déphosphorylant et en empêchant ainsi la transduction du signal.

3.2. Le lien étroit entre les cytokines et la matrice extracellulaire

Les cytokines et les facteurs de croissance sont des molécules sécrétées et diffusibles et il est admis depuis longtemps que leurs effets multiples dans l'activation du système immunitaire ne peuvent pas être expliqués sans l'influence de la matrice extracellulaire, notamment les protéoglycanes, sur leur diffusion et leur rétention [18] (Schönherr and Hausser, 2000). Leur implication dans l'action des cytokines est telle qu'ils sont qualifiés de corécepteurs.

Chez la drosophile, le ligand Upd est également sécrété et son association avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire a été caractérisée dès son identification comme ligand de la voie JAK-STAT (Harrison et al., 1998). Sa diffusion doit être finement contrôlée pour assurer une activation correcte de la voie JAK-STAT. Par exemple, la diffusion d'Upd peut être restreinte pour une action autocrine, comme dans l'intestin (Johansen et al., 2003), ou au contraire peut être étendue pour former un gradient d'activation de la voie JAK-STAT, comme dans le disque œil-antenne (Zeidler et al., 1999). Similairement, dans l'épithélium folliculaire de l'ovaire, la voie JAK-STAT est activée en gradient (Xi et al., 2003) dont la taille est influencée par l'interaction d'Upd avec les protéoglycanes (Hayashi et al., 2012) mais aussi par l'espacement plus ou moins important séparant les cellules folliculaires épithéliales et les cellules germinales, entre lesquelles Upd diffuse, qui agit respectivement soit comme rétenteur soit comme facilitateur de la diffusion (Manning et al., 2015).

18 – Chez les vertébrés, les constituants majeurs de la matrice extracellulaire sont le collagène et l'élastine, qui confèrent respectivement une résistance au stress mécanique et une élasticité, les glycoprotéines, qui ont une fonction d'organisation via leur interaction avec les cellules et enfin les hyaluronanes et les protéoglycanes, qui assurent une résistance à la compression.

3.3. Les effets opposés des corécepteurs : l'homologie ne fait pas le type de régulation

Certains récepteurs aux cytokines nécessitent un corécepteur pour une transduction correcte du signal. C'est le cas d'IL6-R, un des récepteurs d'IL6, qui n'est qu'une chaîne de liaison à IL6 existant sous une forme soluble et une forme transmembranaire, qui ne peuvent ni l'une ni l'autre transduire le message extracellulaire. Un corécepteur est ainsi nécessaire pour activer la cascade intracellulaire JAK-STAT, gp130 (Taga et al., 1989; Tanaka et al., 2014).

Chez la drosophile, le gène putatif CG14225 est associé à *dome* lors d'une étude par recherche d'homologie de séquences. Il est localisé à proximité de ce dernier dans le génome (Hombría and Brown, 2002). Dans deux études parues simultanément, CG14225 est ensuite caractérisé comme codant une protéine transmembranaire similaire à Dome et est renommé *latran* par l'une, *eye transformer* par l'autre, qui reste le nom le plus couramment utilisé [19] (Kallio et al., 2010; Makki et al., 2010). Ce qui est intéressant, bien que *dome* et *eye transformer* présentent une forte homologie avec les gènes codant IL6-R et gp130 respectivement (Kallio et al., 2010), c'est qu'Eye Transformer joue un rôle de dominant négatif en formant un hétérodimère inactif avec Dome empêchant ainsi la transduction du signal (Fisher et al., 2016). Cette interaction récepteur-corécepteur décrite chez les vertébrés entre IL6-R et gp130 est donc conservée chez la drosophile, mais avec des effets opposés.

19 – Le nom *eye transformer (ET)* a été choisi en référence aux phénotypes associés à une suractivation de la voie JAK-STAT sur le développement de l'œil (voir 2-1-1) et observés en contexte de perte de fonction d'*ET* dans cette étude, confirmant son rôle de répresseur de la signalisation JAK-STAT. Le choix du nom *latran* n'est pas expliqué par les auteurs, mais il est toujours intéressant de savoir qu'il s'agit du nom d'un quartier de Rome.

3.4. Endocytose activatrice ou inhibitrice, pourquoi choisir ?

Les récepteurs de voies de signalisation ont d'abord été considérés comme étant actifs lorsqu'ils sont localisés à la membrane plasmique. On pensait que dès leur internalisation par endocytose, ils n'étaient plus capables de transduire le signal [20]. On sait maintenant que l'endocytose de récepteurs peut favoriser, voir être nécessaire à la transduction du signal, par exemple en rapprochant le complexe ligand/récepteur des autres acteurs de la transduction dans les vésicules (Ceresa and Schmid, 2000; Le Roy and Wrana, 2005).

Chez les vertébrés, la voie JAK-STAT présente des exemples de ces deux modes d'action. Dans des cellules humaines en culture, la transduction du signal à l'interféron α par son récepteur IFN α R est dépendante de l'endocytose alors qu'en réponse à l'interféron γ , l'activité du récepteur IFN γ R a lieu à la membrane plasmique (Marchetti et al., 2006).

Chez la drosophile, la voie JAK-STAT est aussi sujette à cette double régulation, mais

sur un seul et même récepteur. Dans des cellules actives pour la voie JAK-STAT, Dome est soumis à l'endocytose de façon dépendante du ligand (Ghiglione et al., 2002) mais les conséquences sur son activité sont l'objet de controverses. Une étude a montré que Dome ne transduit le signal que depuis la membrane plasmique, l'endocytose du complexe Upd/Dome ayant pour effet d'arrêter la signalisation (Vidal et al., 2010). Ce résultat s'oppose à ceux d'une étude précédente montrant qu'aucune transduction du signal n'a lieu à la membrane plasmique. Dans ce cas, l'endocytose du complexe Upd/Dome est nécessaire à la transduction du signal, qui a lieu dans les endosomes précoces, mais aussi à l'arrêt de la signalisation, par cheminement des endosomes vers la voie de dégradation lysosomale (Devergne et al., 2007). Ces résultats semblent contradictoires, cependant ces conclusions ont été émises à partir de résultats obtenus dans des tissus différents n'ayant pas la même organisation : cellules en culture et disque imaginal d'aile pour l'un, épithélium folliculaire de l'ovaire pour l'autre (seules les cellules de bordure sont communes aux deux études, mais Devergne *et al* n'ont pas étudié l'activation de la voie JAK-STAT dans ces cellules, ils ont uniquement montré que Dome y est soumis à l'endocytose). L'importance que semble avoir la polarité des cellules dans la signalisation JAK-STAT, abordée ci-dessous (voir 3.5) pourrait peut-être expliquer ces différences.

20 – Les premiers liens entre endocytose et signalisation mettaient en évidence que l'internalisation des récepteurs permettait leur recyclage ou leur dégradation. L'endocytose était donc uniquement associée à un moyen d'arrêter une signalisation.

3.5. Régulation VIP : Vachement Influencée par la Polarité

De façon conservée, la polarité cellulaire influence l'efficacité de la signalisation JAK-STAT, en régulant la localisation subcellulaire (1) des récepteurs ou (2) des facteurs de transcription.

- (1) Dans des cellules rénales canines en culture présentant une polarité apico-basale, la localisation apicale d'un type de récepteur à IL-6 est nécessaire à l'activation de STAT3 (Buk et al., 2004). Chez la drosophile, Dome est détecté tout le long de la membrane plasmique de cellules mésodermiques non-polarisées de l'embryon (Sotillos et al., 2008). En revanche, dans des cellules polarisées, comme les cellules folliculaires de l'ovaire et de l'ectoderme chez l'embryon, Dome est localisé aux membranes apico-latérale et apicale respectivement (Ghiglione et al., 2002; Sotillos et al., 2008). Ces localisations sont importantes pour compartimenter la réponse au ligand Upd en fonction de la localisation de la source de ce dernier.
- (2) Dans des cellules de carcinome de la tête et du cou, STAT3 se localise et est activé au niveau de sites d'adhérence intercellulaire riches en Cadhérine épithéliale (E-Cadhérine) (Onishi et al., 2008). De même, Stat92E est localisé au niveau de complexes apicaux des cellules de l'ectoderme de l'embryon grâce à une interaction physique avec la protéine de polarité Par-3, ce qui est nécessaire à une activation efficace de la voie JAK-STAT (Sotillos et al., 2013).

CONCLUSION

À ce jour, de nombreux mécanismes de régulation de la voie JAK-STAT ont été identifiés. Si certains modes d'action ont été précisément décrits, notamment la régulation par les protéines SOCS et PTP, par les corécepteurs et par interaction avec la matrice extracellulaire, d'autres restent à préciser, comme la régulation par les protéines PIAS, les conséquences de l'endocytose, ainsi que les protéines impliquées dans la polarisation de la signalisation JAK-STAT. De plus, pour certains processus physiologiques impliquant la voie JAK-STAT, les mécanismes permettant la régulation de la signalisation n'ont pas encore été identifiés. Il reste donc pertinent de poursuivre les études afin d'éclaircir ces zones d'ombres.

L'ovaire de drosophile est un système d'étude particulièrement adapté. La voie JAK-STAT y est impliquée dans de nombreux événements, autant à des stades précoces que tardifs de l'ovogénèse. Ainsi son activation spatiale et temporelle doit être finement régulée. Comme indiqué précédemment, ces processus peuvent être de type migratoire, mais la voie JAK-STAT est aussi impliquée dans la différenciation et l'apoptose de différents types cellulaires ovariens. L'ovaire offre ainsi une palette de phénotypes observables qui illustrent l'activité de la voie JAK-STAT.

4. L'ovaire de drosophile, une mine de rôles de la voie JAK-STAT

4.1. Mais commençons par le début, qu'est-ce qu'un ovaire de drosophile ?

Les ovaires de drosophile sont des organes associés en paire, constitués chacun d'une vingtaine d'ovarioles se rejoignant en un oviducte latéral débouchant sur l'oviducte commun (Figure 4A). Une ovariole peut être assimilée à une chaîne de production d'œufs organisée chronologiquement selon l'axe antéro-postérieur (Figure 4B). Le germarium, lieu de production des follicules ovariens (aussi appelés chambres à œuf), se situe à l'extrémité la plus antérieure. Les follicules sont générés en continu et évoluent progressivement vers l'extrémité la plus postérieure en 60 heures environ, en passant par quatorze stades de maturation définis selon la taille et les caractéristiques morphologiques des follicules. Le stade 14 correspond à l'œuf prêt à être fécondé, alors libéré dans le réseau d'oviductes (Spradling, 1993).

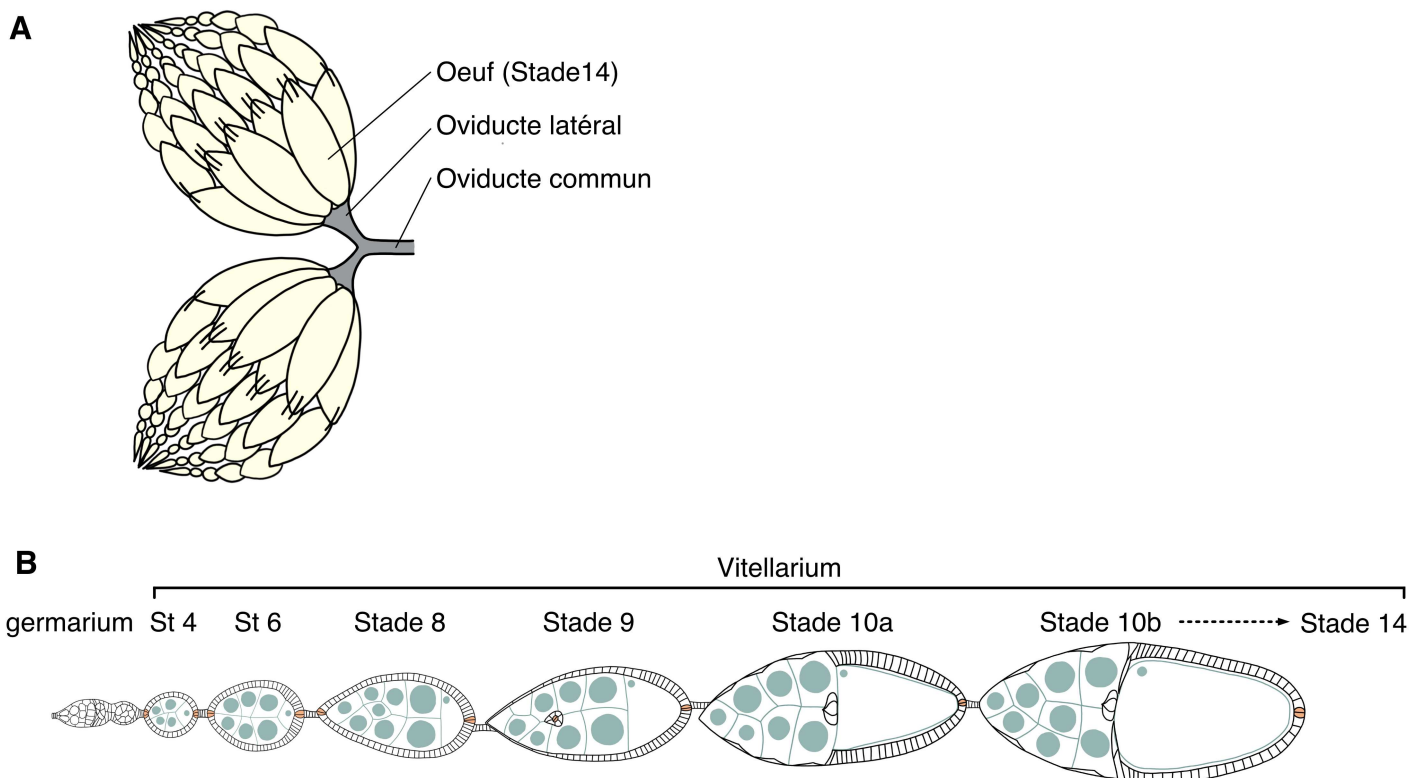


Figure 4 - Organisation d'une paire d'ovaire chez la drosophile. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Représentation schématique d'une paire d'ovaires. Les œufs matures sont au contact des oviductes latéraux, débouchants dans l'oviducte commun. **(B)** Schéma d'une ovariole, constituée du germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, composant le vitellarium (les détails morphologiques du germarium et des follicules sont présentés dans les figures 5, 6, 7 et 9).

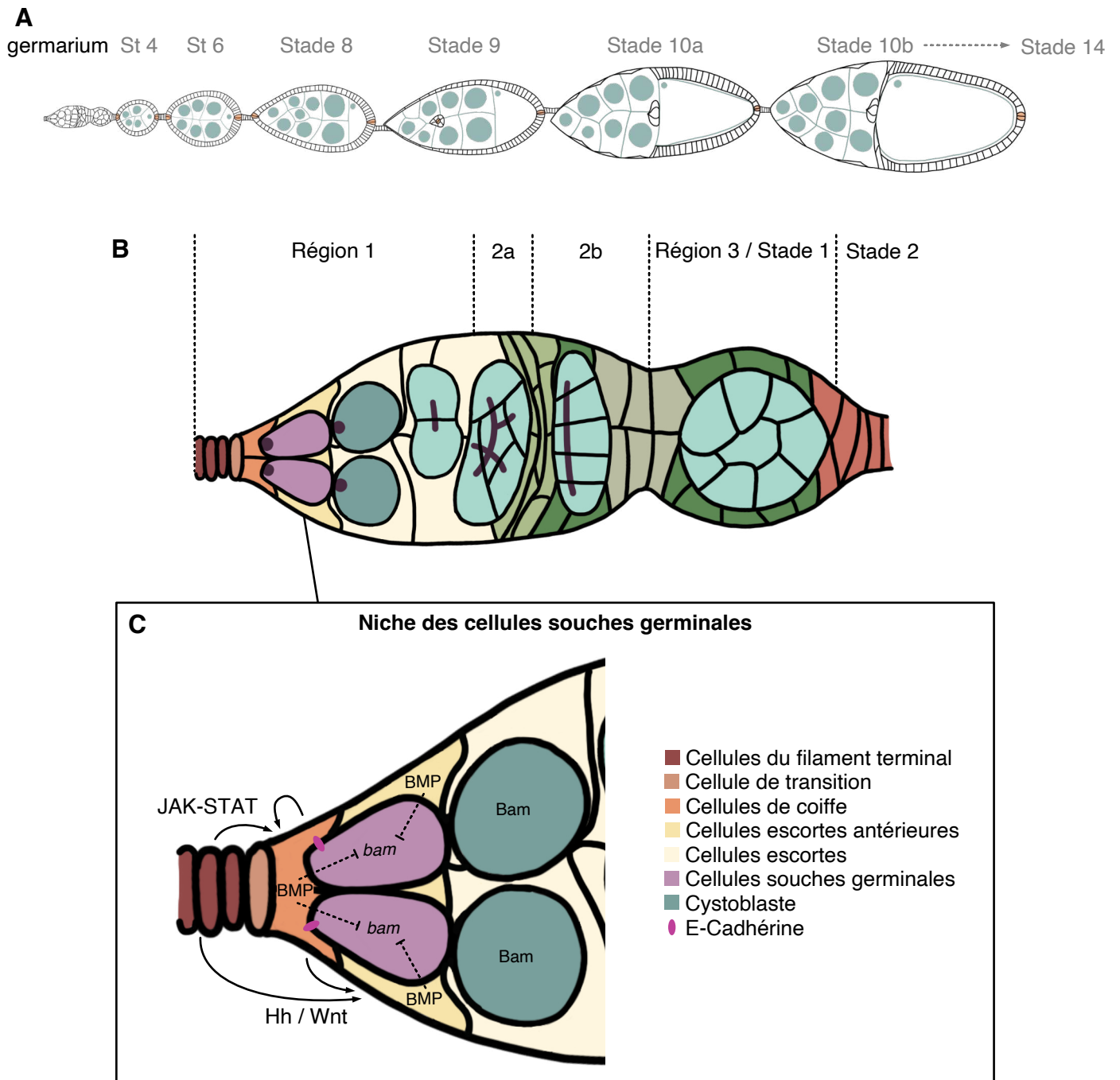


Figure 5 - Organisation du germarium : la niche des cellules souches germinales. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation (les détails histologiques des follicules sont présentés en figure 8). **(B)** Représentation schématique de l'organisation du germarium et de sa division en régions. **(C)** Agrandissement au niveau de la niche des cellules souches germinales, localisée en antérieur de la région 1 du germarium. Le détail des rôles des voies de signalisation indiquées est présenté dans le texte. Hh : Hedgehog.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Hayashi *et al*, 2020 et Eliazer and Buszczak, 2011.

4.1.1. Le germarium, l'origine de l'œuf

Le germarium est divisé en quatre régions correspondant à différents niveaux de maturation et d'organisation du cyste de cellules germinales et des cellules folliculaires somatiques associées (Figure 5).

4.1.1.1. Les cellules souches germinales, nichées en antérieur du germarium

La région 1 contient dans sa partie la plus antérieure la niche contrôlant la prolifération et le maintien de l'état indifférencié de deux à trois cellules souches germinales à la fois par un lien physique via la E-Cadhérine (Song et al., 2002; Wang and Page-McCaw, 2018) et par la répression transcriptionnelle de *bag of marble (bam)* en réponse à la voie de signalisation Bone Morphogenetic Protein (BMP) (Xie and Spradling, 2000; Chen and McKearin, 2003; Song et al., 2004).

La niche est constituée de quatre types de cellules somatiques, organisées comme présenté figure 5C (Eliazar and Buszczak, 2011). Les cellules du filament terminal, la cellule de transition et les cellules de coiffe expriment Upd, Engrailed et Wingless, activant respectivement la voie JAK-STAT dans les cellules de coiffe et les voies Hedgehog et Wingless/Wnt dans les cellules escortes antérieures [21]. Ces trois voies de signalisation induisent l'expression de *decapentaplegic (dpp)* et/ou *glass bottom boat (gbb)* (Xie and Spradling, 2000; Song et al., 2004; López-Onieva et al., 2008; Rojas-Ríos et al., 2012; Wang and Page-McCaw, 2018). Ces ligands de la voie BMP sont sécrétés et maintenus dans la niche par séquestration via la matrice extracellulaire (Wang et al., 2008; Hayashi et al., 2009).

Ainsi, par division asymétrique (voir [22]), les cellules souches germinales produisent deux cellules, dont l'une garde un contact physique avec la niche, et donc son état indifférencié. L'autre, appelée précystoblaste, est plus éloignée donc ne reçoit plus Dpp/Gbb. Elle exprime *bam* et commence à se différencier en cystoblaste (McKearin and Spradling, 1990).

21 – Les cellules escortes sont une population de 30 à 40 cellules en contact avec les cellules de la gaine entourant le germarium, formant des projections cytoplasmiques qui s'intercalent entre les cellules souches germinales dans la région 1 (cellules escortes antérieures) et entre les cystoblastes dans la région 2a du germarium.

4.1.1.2. La formation du cyste, ou l'art de ne pas finir les divisions

Le cystoblaste effectue quatre cycles de divisions incomplètes pour former un cyste de seize cellules interconnectées par des structures appelées canaux en anneaux (Figure 6). Le nombre de canaux par cellule est finement régi par le fusome [22]. Quatorze cellules en contiennent un à trois, et deviendront les cellules nourricières. Les deux autres, appelées pro-ovocytes, ont quatre canaux en anneaux et l'une

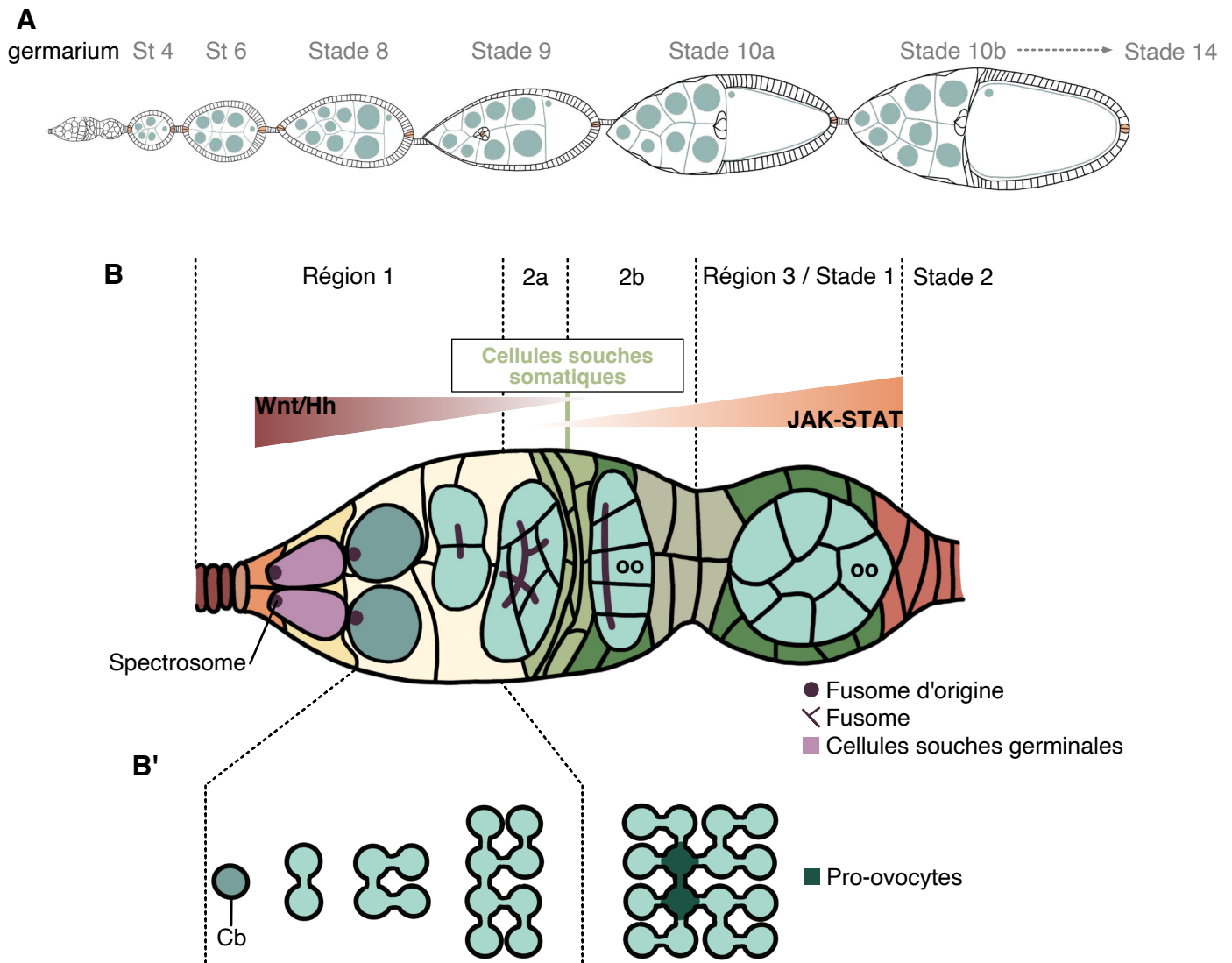


Figure 6 - Organisation du germarium : la formation du cyste et la localisation des cellules souches somatiques. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation (les détails histologiques des follicules sont présentés en figure 8). **(B)** Représentation schématique de l'organisation du germarium. Les cellules souches somatiques sont localisées en trois couches entre les régions 2a et 2b, à la croisée des gradients de diffusion des ligands des voies de signalisation Hedgehog, Wnt et JAK-STAT, permettant le maintien de leur homéostasie. **(B')** Schématisation des quatre cycles de divisions incomplètes permettant la formation d'un cyste de seize cellules, interconnectées par un nombre précis de canaux en anneaux, à partir du cystoblaste (Cb). Le cyste change de morphologie en progressant dans le germarium. En région 2b, il forme un disque d'une cellule de largeur, où l'ovocyte (oo) est définitivement sélectionné. Il devient sphérique en région 3, et l'ovocyte est spécifiquement ancré en postérieur, processus détaillé en figure 16. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Hayashi *et al*, 2020 et Huynh, 2006.

d'entre elles deviendra l'ovocyte (Huynh, 2006). Le cyste ainsi formé entre dans la région 2a du germarium, où les deux pro-ovocytes commencent à accumuler des marqueurs spécifiques de l'ovocyte. Cependant, dès le passage à la région 2b, l'un des deux pro-ovocyte perd ces marqueurs au profit de l'autre et devient une cellule nourricière (voir Introduction-Partie 2, 1.1.1) (Huynh, 2006). Enfin, en région 3, juste avant le bourgeonnement, le cyste prend une forme sphérique dans laquelle l'ovocyte est ancré au pôle postérieur (voir Introduction-Partie 2, 1.1.2).

22 – Le fusome est constitué de vésicules interconnectées issues du réticulum endoplasmique. Il se forme à partir du spectrosome, de composition similaire et localisé en antérieur des cellules souches germinales (Figure 6). Cette structure oriente la division de la cellule souche par ancrage d'un des pôles du fuseau mitotique. Lors de cette mitose, le précystoblaste hérite d'une partie du spectrosome, qui va fusionner avec des vésicules de réticulum nouvellement générées pour former le fusome. Lors des cycles de divisions incomplètes du cyste, il continue de servir d'ancrage à un des pôles du fuseau mitotique et donc d'orienter chaque division. De plus, de nouvelles vésicules de fusome se forment systématiquement au niveau du pont cytoplasmique, tel un bouchon, avec lequel le fusome d'origine fusionne. Les cellules restent ainsi interconnectées par les canaux en anneaux à travers lesquels passe le fusome.

4.1.1.3. La niche de cellules souches somatiques à la croisée des signaux passés et futurs

Les cellules souches somatiques sont localisées sous forme de trois couches de cellules entre les régions 2a et 2b du germarium (Figure 6B) (Reilein et al., 2017). Elles permettent à la fois la production des cellules escortes et des précurseurs des cellules folliculaires, à partir des couches antérieure et postérieure respectivement. Le maintien de leur homéostasie est contrôlé par des gradients opposés de *Engrailed* et *Wingless*, provenant des cellules de coiffe, et *Upd*, provenant du follicule en région 3 (voir 4.1.1.4) (Hayashi et al., 2020; Melamed and Kalderon, 2020). Quand le cyste entre dans la région 2b, environ six précurseurs des cellules folliculaires migrent pour l'envelopper avant d'entreprendre plusieurs séries de mitoses (Forbes et al., 1996). Dans la région 3 du germarium, certains précurseurs gardent leur capacité de division alors que d'autres, localisés en antérieur du cyste (entre les régions 3 et 2b donc), sortent du cycle (TwoRoger et al., 1999). Ces sous-populations correspondent respectivement aux précurseurs des cellules folliculaires et aux précurseurs des cellules polaires et de tige, et cette distinction est nécessaire pour permettre au cyste de quitter le germarium par un processus appelé le bourgeonnement.

4.1.1.4. Déployer sa tige et bourgeonner hors du germarium

En région 3, correspondant au premier stade de maturation du follicule, le bourgeonnement hors du germarium est induit par le cyste qui bourgeonne lui-même,

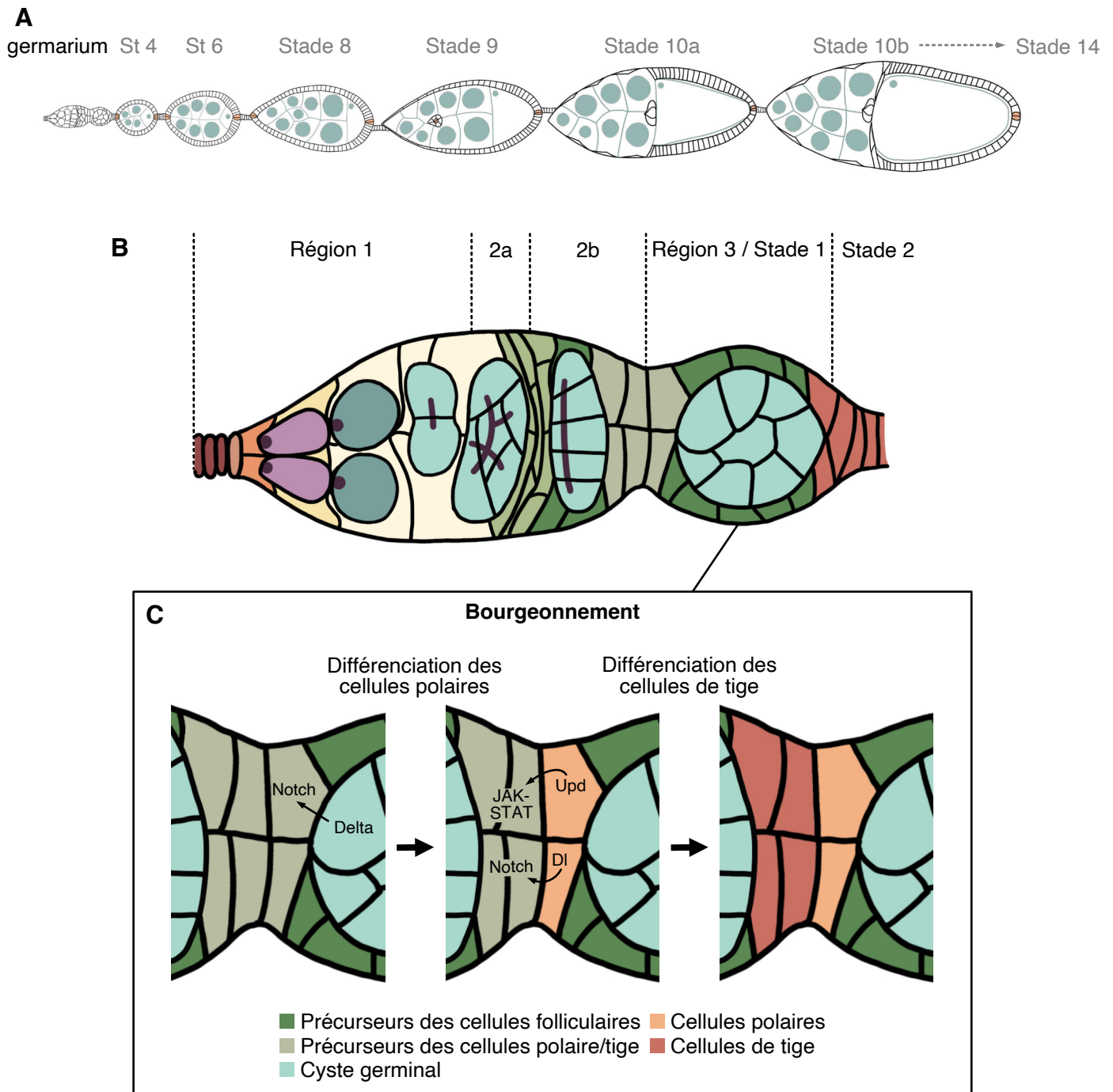


Figure 7 - Organisation du germarium : les étapes du bourgeoisement. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation (les détails histologiques des follicules sont présentés en figure 8). **(B)** Représentation schématique de l'organisation du germarium. **(C)** Représentation schématique des étapes du bourgeoisement d'un follicule en région 3 par la formation de la tige entre lui et le cyste plus jeune en région 2b. Le détail des rôles des voies de signalisation indiquées est présenté dans le texte. DI : Delta.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans la référence Assa-Kunik *et al*, 2007.

par la formation des cellules de tige entre lui et le cyste plus jeune en région 2b (Figure 7). Ce phénomène résulte de premiers évènements de différenciation des précurseurs des cellules folliculaires en réponse à la signalisation Delta/Notch [23]. En effet, outre leur différence en terme de capacité de division, la sous-population de cellules polaire/tige se distingue par l'expression de *fringe*, un potentialisateur de la signalisation Delta/Notch [24] (Grammont and Irvine, 2001).

Au sein de la sous-population de cellules polaire/tige, du fait de la signalisation juxtacrine de Delta et de la présence de Fringe, les cellules directement en contact avec les cellules germinales vont activer fortement Notch, résultant en leur différenciation en cellules polaires (Grammont and Irvine, 2001; López-Schier and St Johnston, 2001; Assa-Kunik et al., 2007). En retour, les cellules polaires commencent à exprimer Upd, conduisant à l'activation de la voie JAK-STAT dans les cellules qui ne sont pas en contact avec les cellules germinales [25]. Combinée à une faible activation de la voie Notch, la voie JAK-STAT va induire leur différenciation en cellules de tige (Baksa et al., 2002; McGregor et al., 2002; Assa-Kunik et al., 2007). Ces cellules adhèrent entre elles par une forte expression de E-Cadhérine (voir [27]) (Assa-Kunik et al., 2007) et sont organisées en deux rangées de cellules qui, après le bourgeonnement terminé, vont s'intercaler pour n'en former plus qu'une.

Ainsi, les cellules polaires et de tige antérieures se forment par un mécanisme de relais du follicule prêt à bourgeonner vers le follicule plus jeune. Après le bourgeonnement, les follicules restent donc associés entre eux par la tige de façon chronologique et forment une chaîne, appelée vitellarium.

23 – Le récepteur Notch peut être activé par deux ligands, Delta et Serrate. Ces deux ligands sont transmembranaires, donc ne peuvent activer Notch que par signalisation juxtacrine. Notch est exprimé par tous les précurseurs des cellules folliculaires, et Delta est exprimé faiblement par les précurseurs des cellules folliculaires et fortement par les cellules germinales (López-Schier and St Johnston, 2001; Torres et al., 2003; Assa-Kunik et al., 2007).

24 – Fringe est une glycosyltransférase qui, en glycosylant Notch, favorise son interaction avec son ligand Delta et au contraire empêche l'association avec Serrate (Panin et al., 1997).

25 – Ces cellules polaires nouvellement différenciées sont la source de ligand Upd et sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie des cellules souches folliculaires présenté plus haut (voir 4.1.1.3).

4.1.2. Le cyste dans le vitellarium : la cellule reine et ses ouvrières

A partir du stade 2 de l'ovogenèse, le cyste de 16 cellules germinales augmente de volume du fait de 10-12 cycles d'endoréplication des cellules nourricières [26] (Dej and Spradling, 1999). Cette énorme augmentation de leur matériel génétique est indispensable car la majorité des ARN, protéines et organelles nécessaires à l'embryogenèse sont produits par les cellules nourricières et transportés dans l'ovocyte

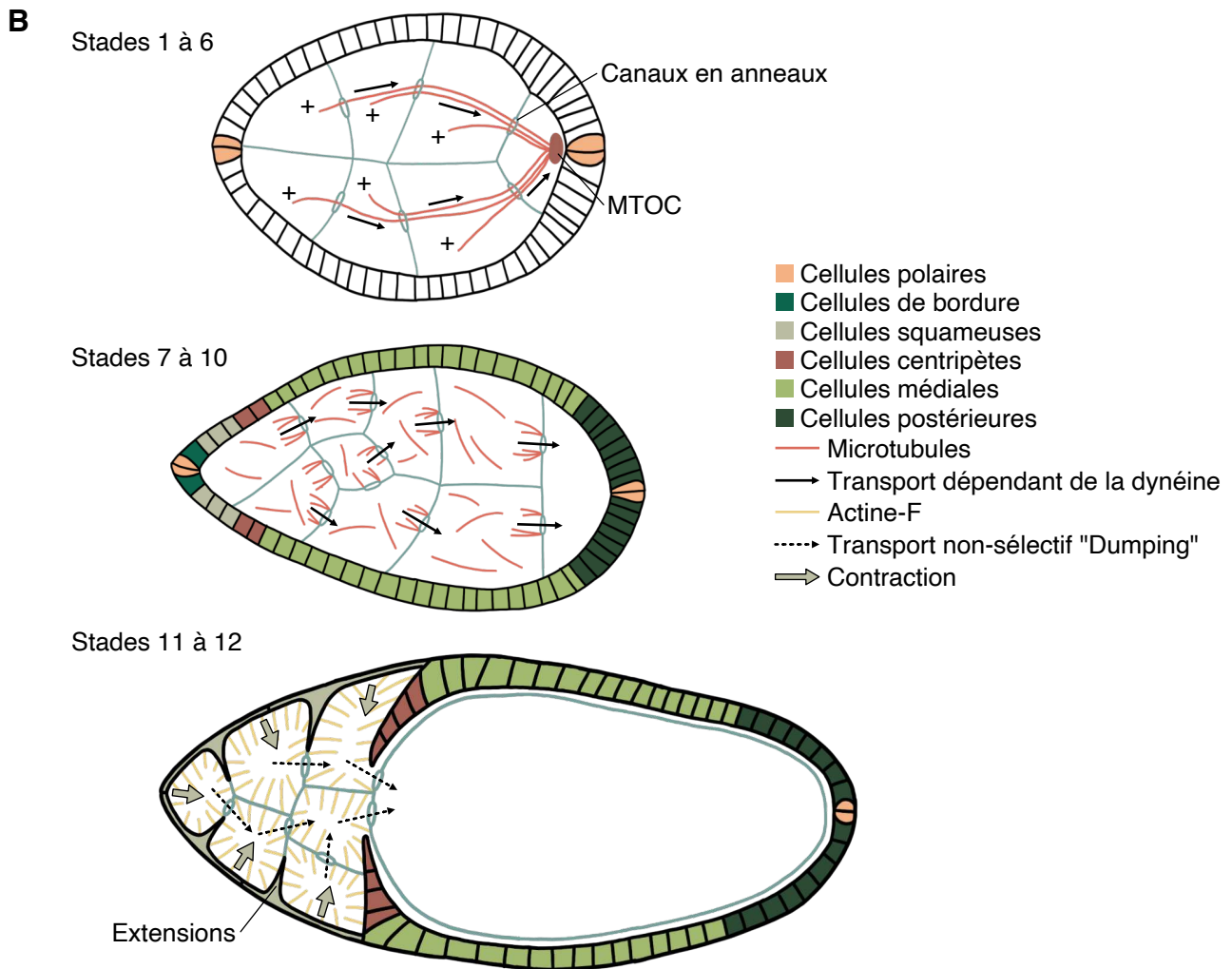
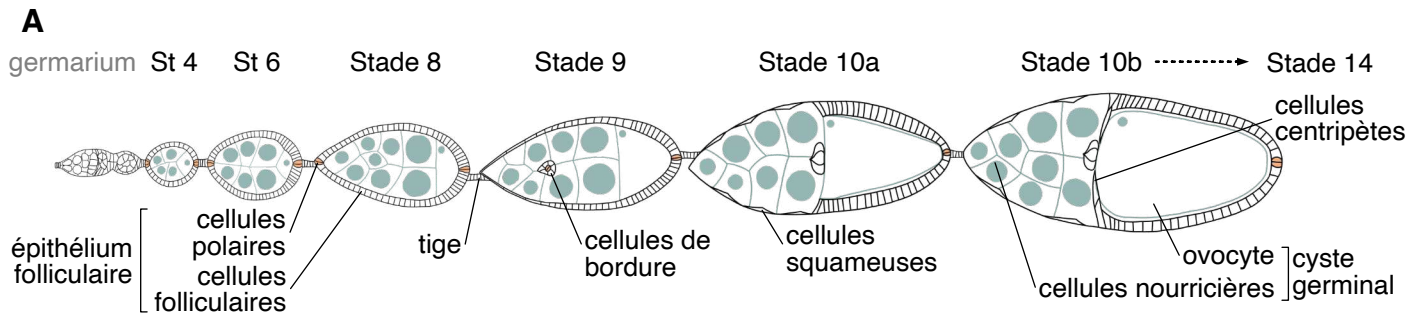


Figure 8 - Les mécanismes de transport d'éléments cytoplasmiques des cellules nourricières vers l'ovocyte. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation pour lesquels sont indiqués les types cellulaires les composant. **(B)** Représentation schématique des trois mécanismes de transport vers l'ovocyte des ARN, protéines et organelles produits dans les cellules nourricières. Le changement de transport au stade 7 est dû à la réorganisation du réseau de microtubules, autant dans l'ovocyte que au niveau des cellules nourricières. Dans ces dernières, des microtubules se nucléent à partir des canaux en anneaux et d'autres sont libres dans le cytoplasme. Ensemble, ils permettent un transport polarisé d'une cellule à l'autre. Lors du "dumping", entre les stades 11 et 12, les cellules squameuses stimulent la contraction dépendante de l'actine-F des cellules nourricières, permettant l'éjection de leur cytoplasme dans l'ovocyte via les canaux en anneau. En parallèle, les cellules squameuses commencent à former des extensions membranaires pour envelopper individuellement chaque cellule nourricière et induire leur mort cellulaire par phagocytose. MTOC : centre organisateur des microtubules. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Timmons *et al*, 2016, Becalska and Gavis, 2009, Saxton, 2001 et Duhart *et al*, 2017.

via les canaux en anneaux (Figure 8). Jusqu'au stade 10 de l'ovogenèse, ce transport est sélectif et dépendant des microtubules et de la dynéine. Du fait de la réorganisation du réseau de microtubules du cyste au stade 7 (voir Introduction-Partie 2, 1.3.2), il se divise en deux phases : d'abord le long d'un réseau commun traversant les canaux en anneaux vers le centre organisateur localisé dans l'ovocyte (Theurkauf et al., 1992; Saxton, 2001) puis via des réseaux indépendants dans chaque cellule nourricière de microtubules libres et nucléés au niveau de chaque canal en anneau (Mische et al., 2007; Becalska and Gavis, 2009). Entre les stades 11 et 12, le transport devient non-sélectif et est appelé « dumping ». Le cytoplasme des cellules nourricières va être transféré dans l'ovocyte grâce à leurs contractions dépendantes de l'actine (Gutzeit, 1986; Timmons et al., 2016). Par ces transports, l'ovocyte grandit en volume par rapport aux cellules nourricières, occupant progressivement une plus grande partie de l'espace disponible dans la chambre à œuf. Au stade 10, l'ovocyte occupe la moitié du follicule en longueur (Kolahi et al., 2009). Au stade 14, le dumping est terminé, les cellules nourricières ont été éliminées par phagocytose (voir 4.1.3.2) et l'ovocyte occupe tout l'espace.

26 – Les cycles d'endoréplication, aussi appelés endocycles, permettent aux cellules de dupliquer leur matériel génétique sans se diviser en alternant des phases S et G, devenant ainsi polyploïdes (Shu et al., 2018). L'ovocyte n'entre pas dans ces cycles car il est engagé en prophase de méiose I depuis sa sélection dans le germarium (Huynh and St Johnston, 2000).

4.1.3. L'épithélium folliculaire dans le vitellarium : monocouche, multifonction

L'épithélium folliculaire est constitué d'une seule couche de cellules somatiques comprenant les cellules folliculaires et les cellules polaires. Il entoure le cyste de cellules germinales et a pour fonction de le protéger mais aussi d'interagir avec lui pour permettre sa maturation.

4.1.3.1. Deux belles paires de cellules polaires

Les deux groupes de cellules polaires, localisés aux pôles antérieur et postérieur de la chambre à œuf respectivement (Figure 9A), se différencient en réponse à la voie Delta/Notch mais de manière asynchrone. Comme présenté ci-dessus (voir 4.1.1.4), le groupe antérieur se forme au moment du bourgeonnement et est impliqué dans la différenciation des cellules de tige. En revanche, le groupe postérieur se forme plus tardivement, au stade 2 de l'ovogenèse (Torres et al., 2003). Elles se distinguent des cellules folliculaires par l'absence de polarité apico-basale malgré une expression élevée de protéines comme la E-Cadhérine et Fascicline 3 (voir [27]), ainsi que par leur forme caractéristique arrondie. Au moment de leur différenciation en réponse à la voie Delta/Notch dans le germarium, entre deux et six cellules polaires sont présentes à chaque pôle (Ruohola et al., 1991; Forbes et al., 1996; Grammont and Irvine, 2001). Cependant, entre les stades 2 et 5 de l'ovogenèse, il a été identifié par mon équipe

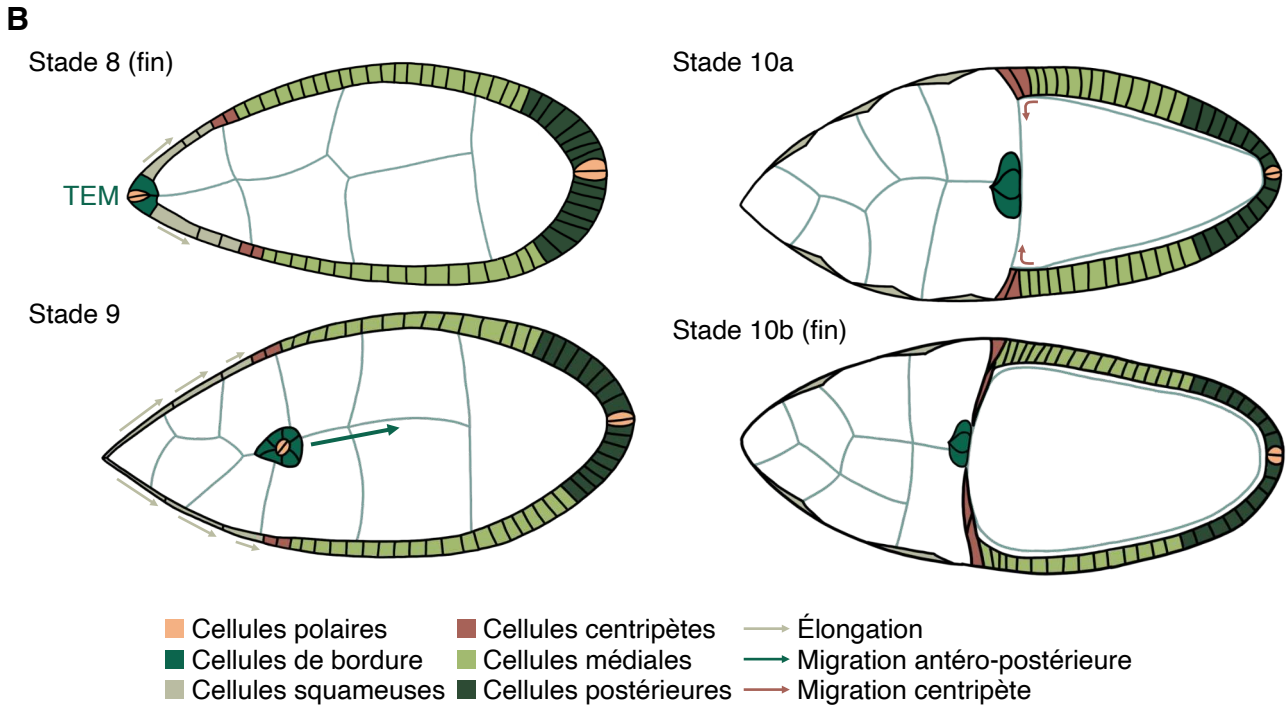
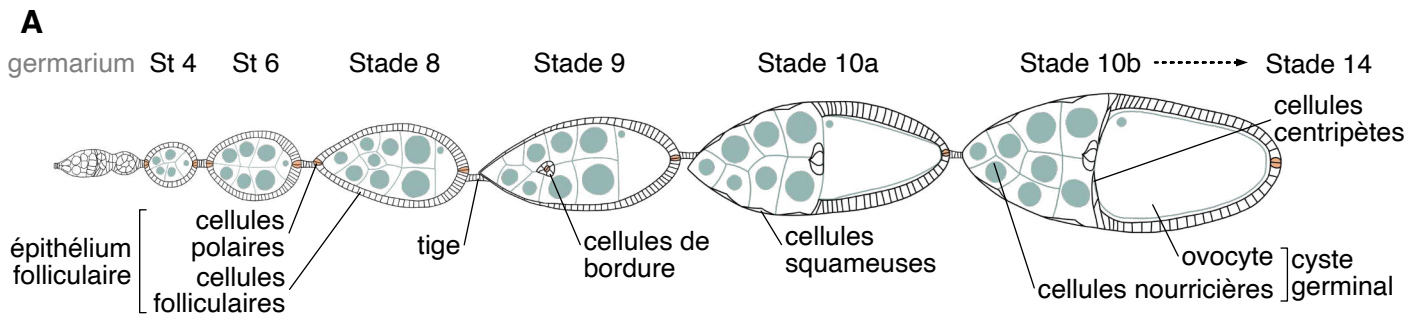


Figure 9 - La morphogenèse des sous-populations antérieures de l'épithélium folliculaire. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Schématisation des évènements de morphogenèse se déroulant entre les stades 8 et 10b dans l'épithélium folliculaire. En parallèle de l'appatissement des cellules squameuses, les cellules de bordure effectuent leur transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) au stade 8 et migrent pendant le stade 9, leur position concordant avec la frontière entre cellules squameuses et centripètes. Le stade 10a est caractérisé par les cellules de bordure ayant atteint leur destination, les cellules squameuses recouvrant les cellules nourricières et l'ovocyte occupant la moitié du follicule en longueur. Les cellules centripètes commencent à migrer vers les cellules de bordure au début du stade 10b. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans la référence Duhart *et al*, 2017.

que ce nombre est systématiquement réduit par apoptose (voir 4.2.1), si bien qu'à partir du stade 6, uniquement deux cellules polaires sont présentes à chaque pôle du follicule (Besse and Pret, 2003; Khammari et al., 2011). Au pôle postérieur, la paire de cellules polaires reste dans l'épithélium folliculaire jusqu'à la fin du processus d'ovogénèse. En revanche, au pôle antérieur, elle est au centre du groupe de cellules de bordure qui délamine hors de l'épithélium et migre en direction de l'ovocyte au stade 9 (voir 2.2, 4.1.3.2 et [30]) (Ruohola et al., 1991).

4.1.3.2. Les cellules folliculaires : rien ne se crée, tout se transforme

Comme toutes cellules épithéliales, les cellules folliculaires sont caractérisées par une polarité apico-basale, leur pôle apical étant en contact avec les cellules germinales et le pôle basal orienté vers l'extérieur du follicule [27]. Elles ont tout de même quelques particularités : leurs jonctions adhérentes ne sont pas restreintes uniquement au pôle apico-latéral, mais se prolongent sur toute la surface latérale, et contiennent à la fois de la E-Cadhérine et de la N-Cadhérine [28] (Tanentzapf et al., 2000). Entre les stades 2 et 6 de l'ovogénèse, les cellules folliculaires sont de forme cuboïde et se divisent par mitoses en réponse à la voie Hedgehog (Forbes et al., 1996; Zhang and Kalderon, 2000). Au stade 6, les cellules folliculaires sont au nombre de 650 et leur prolifération est stoppée par la voie Delta/Notch, en faveur d'un passage à des cycles d'endoréplication [29], ce qui est nécessaire au maintien d'un épithélium monostratifié et à la maturation des cellules folliculaires (Deng et al., 2001; López-Schier and St Johnston, 2001; Sun and Deng, 2007).

En effet, cette transition marque le début de plusieurs événements de différenciation des cellules folliculaires, grâce à un patterning précis mis en place par la voie JAK-STAT (voir 4.2.3). Les différentes sous-populations vont changer de forme et acquérir des fonctions indispensables à la maturation de l'ovocyte (Duhart et al., 2017). On trouve, du pôle antérieur vers le postérieur (Figure 9) :

- Les cellules de bordure, qui effectuent une transition épithélio-mésenchymateuse débutant au stade 8 de l'ovogénèse [30] (voir 2.2). Durant le stade 9, elles migrent entre les cellules nourricières pour atteindre la face antérieure de l'ovocyte, ce qui est indispensable à la fertilité de la mouche car permettant la formation du micropyle, le point d'entrée du spermatozoïde (Zarani and Margaritis, 1986; Montell et al., 1992; Horne-Badovinac, 2020).
- Les cellules squameuses, qui vont s'allonger progressivement entre les stades 8 et 10 de l'ovogénèse en réponse aux voies Notch et BMP pour être *in fine* les seules cellules à recouvrir les cellules nourricières à partir du stade 10 (Grammont, 2007; Brigaud et al., 2015). Elles sont impliquées de façon non autonome cellulaire dans le dumping des cellules nourricières (voir 4.1.2) et dans leur mort programmée par phagocytose en fin d'ovogénèse (Timmons et al., 2016).
- Les cellules centripètes, émergeant des deux rangs de cellules folliculaires localisés au niveau de la frontière entre cellules nourricières et ovocyte au stade

10 en réponse la voie BMP (Dobens et al., 2000). Entre les stades 10 et 11, elles migrent le long de la face antérieure de l'ovocyte pour se rejoindre au niveau des cellules de bordure et permettre de former l'operculum, la partie antérieure de l'œuf nécessaire à la sortie de la larve. Elles participent également à la formation du micropyle (Waring, 2000).

- Les cellules médiales, les seules cellules folliculaires non actives pour la voie JAK-STAT. Elles vont recouvrir les faces latérales de l'ovocyte à partir du stade 10. Au contact de ce dernier, elles adoptent une morphologie cylindrique et se différencient en cellules sécrétrices, permettant la formation de la membrane vitelline puis du chorion entre les cellules folliculaires et l'ovocyte, ce qui induit la création d'un espace entre leurs membranes (Mahowald, 1972; Margaritis et al., 1980; Cavaliere et al., 2008). Elles forment également des microvillosités sur leur surface apicale, nécessaires à l'organisation correcte de ces couches protectrices du futur œuf (D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006). De plus, du fait de la relocalisation de la signalisation Gurken/EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) par déplacement du noyau de l'ovocyte, ce qui initie la formation de l'axe dorso-ventral (voir Introduction-Partie 2, 1.3.1), les cellules folliculaires adjacentes se différencient en une nouvelle sous-population de cellules qui est à l'origine de la formation des appendices dorsaux (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995). Ces structures permettent les échanges gazeux lors du développement embryonnaire.
- Les cellules postérieures, couvrant la partie la plus postérieure de l'ovocyte, qui adoptent elles-aussi une forme cylindrique et participent à la sécrétion de la membrane vitelline. Elles jouent un rôle primordial dans la polarisation de l'ovocyte (voir Introduction-Partie 2, 2).

27 – Chez les vertébrés, l'intégrité et la fonction de barrière des épithéliums sont assurées par deux types de jonctions médiées par des protéines transmembranaires situées en région apico-latérale :

- Les jonctions adhérentes, formant une ceinture appelée Zonula Adherens. Riches en E-Cadhérine, elles permettent un ancrage au cytosquelette d'actine via des protéines adaptatrices telles que l' α et la β -caténine.
- Les jonctions serrées, plus apicales, formant la Zonula Occludens, constituées notamment de Claudine, Occludine et CRB1. De même, elles sont associées au cytosquelette d'actine via des adaptateurs comme PAR-3.

Chez la drosophile, il n'y a pas de Zonula Occludens. Cependant, des homologues de constituants de ces jonctions, comme Crumb (Crb) et Bazooka (Baz/Par-3), homologues de CRB1 et PAR-3 respectivement, sont détectés en apical des jonctions adhérentes dans une zone appelée région subapicale. En basal des jonctions adhérentes, des complexes composés des protéines transmembranaires Neurexin IV et Fascicline 3 et de protéines adaptatrices forment les jonctions septées (Knust and Bossinger, 2002).

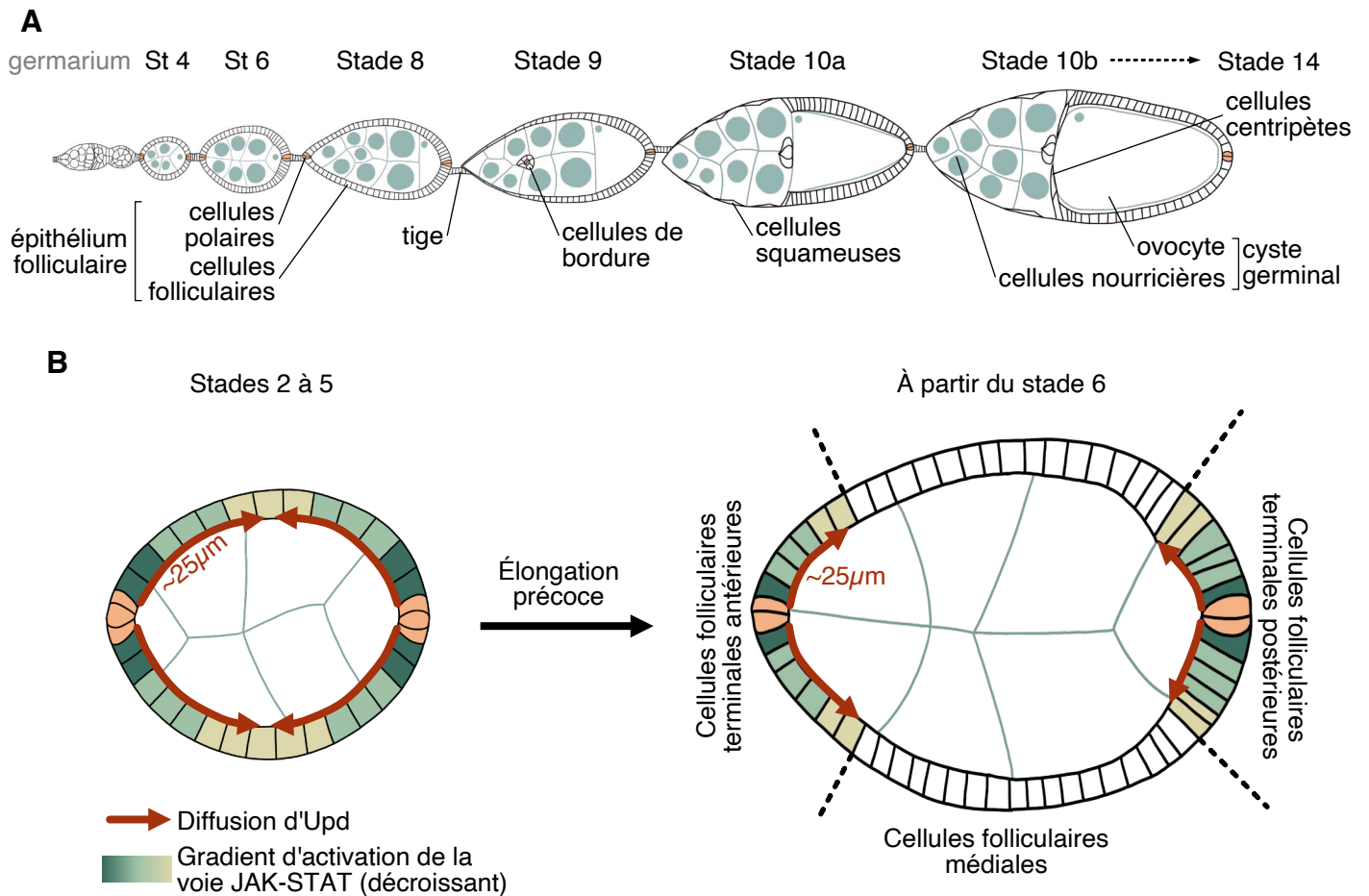


Figure 10 - Le patron d'activation de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Schématisation de la formation du gradient d'activation de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires par diffusion d'Upd, produit par les cellules polaires, entre le cyste et l'épithélium folliculaire. L'élongation précoce du follicule (voir figure 12) fait que seules les cellules les plus proches des cellules polaires restent dans le rayon de diffusion d'Upd, définissant les populations terminales et médiale, respectivement actives et inactive pour la voie JAK-STAT.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Xi *et al*, 2003 et Starz-Gaiano *et al*, 2009.

28 – La E-Cadhérine et la N-cadhérine sont deux types de cadhérines dites classiques. E et N signifient épithéliale et neurale respectivement. De fait, le plus souvent, la E-Cadhérine est trouvée dans les cellules épithéliales et la N-Cadhérine dans les cellules neurales et endothéliales. La présence de N-Cadhérine dans les jonctions adhérentes des cellules folliculaires est donc une caractéristique très particulière de ce tissu.

29 – Les cellules folliculaires effectuent trois endocycles entre les stades 7 et 10a et passent donc d'une ploïdie de $2n$ à $16n$. L'activation correcte de la voie Delta/Notch, et donc la maturation des cellules folliculaires, est dépendante d'une autre voie de signalisation, la voie Salvador-Warts-Hippo (Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007; Yu et al., 2008).

30 – La transition épithélio-mésenchymateuse de cellules se manifeste par une perte de leur polarité apico-basale au profit d'une polarité antéro-postérieure, par l'acquisition d'un caractère migratoire et un changement de répertoire de protéines d'adhérence. Notamment se produit un « switch » des Cadhérines : une diminution de la E-Cadhérine par baisse d'expression et/ou dégradation au profit de la N-Cadhérine. Ce changement peut être total ou partiel, menant à une migration isolée ou en groupe respectivement, le but principal étant de faire perdre l'affinité de ces cellules avec les cellules épithéliales au profit d'une affinité avec les cellules mésenchymateuses. La transition épithélio-mésenchymateuse des cellules de bordure est un cas particulier. Juste avant leur délamination, elles se mettent au contraire à fortement exprimer la E-Cadhérine qui est nécessaire à leur migration (Niewiadomska et al., 1999; Cai et al., 2014). Cette particularité s'explique par le fait que les cellules de bordure ne migrent pas dans un environnement contenant des cellules mésenchymateuses, mais entre les cellules nourricières qui n'expriment pas la N-Cadhérine (Niewiadomska et al., 1999; Tanentzapf et al., 2000). En effet, l'interaction entre les cellules de bordure et les cellules nourricières via E-Cadhérine est nécessaire pour guider le groupe de cellules en migration (Cai et al., 2014). De plus, la E-Cadhérine est également impliquée dans la cohésion du groupe. Les cellules polaires antérieures, qui expriment également la E-Cadhérine à des niveaux élevés à tous les stades de l'ovogenèse, n'acquièrent pas de capacités migratoires en elles-mêmes mais sont systématiquement retrouvées au centre du groupe de cellules de bordure en migration (Niewiadomska et al., 1999). L'adhérence entre les cellules polaires et les cellules de bordure est requise pour maintenir un groupe intègre (Cai et al., 2014).

4.2. Les rôles de la voie JAK-STAT, maniaque de l'auto-contrôle

Dans l'épithélium folliculaire, toutes les cellules sont compétentes à répondre au ligand de la voie JAK-STAT (Ghiglione et al., 2002; McGregor et al., 2002) mais les cellules polaires sont les seules à exprimer *upd* (McGregor et al., 2002). Une fois sécrété, Upd diffuse entre l'épithélium et les cellules germinales, créant un gradient d'accumulation du ligand dans la matrice extracellulaire (voir 3.2) et donc d'activation de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires aux pôles antérieur et postérieur des chambres à œuf (Figure 10) (Xi et al., 2003). De plus, en mûrissant, les follicules grandissent et s'allongent (voir 4.2.2), si bien que les cellules au centre de l'épithélium ne reçoivent plus de ligand Upd, donc ne sont plus actives pour la voie JAK-STAT. Se définissent

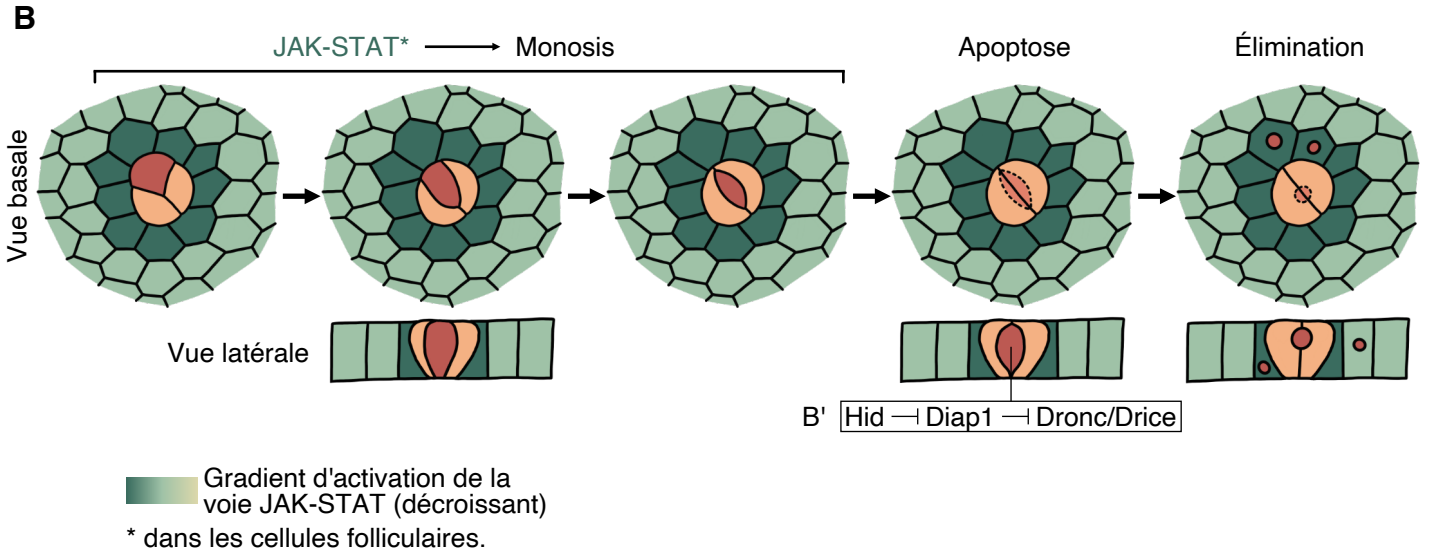
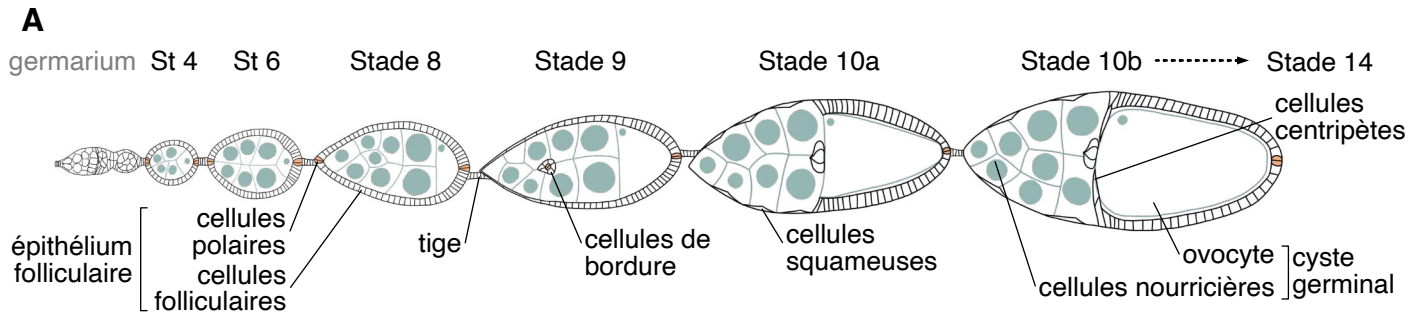


Figure 11 - Le processus de monosis : premier rôle de la voie JAK-STAT dans le vitellarium. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique en vue basale et latérale des étapes du processus de monosis des cellules polaires, induit de façon non-autonome cellulaire par la voie JAK-STAT active dans les cellules folliculaires. Ce processus entraîne l'enveloppement total (latéral, apical et basal) de la cellule polaire destinée à mourir (marron) par les autres cellules du groupe (beige). Cet isolement induit la transcription de *hid*, activant la cascade apoptotique (B'). Les corps apoptotiques sont expulsés latéralement hors du groupe de cellules polaires et internalisés par les cellules folliculaires voisines pour élimination. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Torres *et al*, 2017 et Khammari *et al*, 2011.

ainsi deux populations de cellules folliculaires actives ou non pour la voie JAK-STAT, appelées terminale et médiale respectivement.

4.2.1. L'apoptose des cellules polaires : à la fin, il n'en restera que deux

Après bourgeonnement hors du germarium, le premier processus impliquant la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire est l'apoptose des cellules polaires surnuméraires, découvert et caractérisé par mon équipe. Progressivement, entre les stades 2 et 5 de l'ovogenèse, seules deux cellules polaires de chaque groupe, sélectionnées en réponse à la voie Delta/Notch, sont maintenues aux pôles antérieur et postérieur (Besse and Pret, 2003; Vachias et al., 2010). L'élimination d'une cellule polaire passe d'abord par un long processus de remodelage appelé monosis, où elle va être enveloppée par les cellules polaires voisines, l'isolant de tout contact avec les cellules folliculaires et menant à son extrusion apicale et basale (Torres et al., 2017) (Figure 11). Rapidement après, une cascade apoptotique est activée dans la cellule extrudée, conduisant à sa mort [31] (Figure 11B'). Elle implique le couple caspase initiateur/effectrice Dronc/Drice, l'inhibiteur de caspases Diap1 et son antagoniste Hid, dont l'expression est spécifiquement induite dans la cellule polaire destinée à mourir (Khammari et al., 2011). Lors de cette série d'évènements, la voie JAK-STAT est à la fois nécessaire dans les cellules folliculaires terminales pour le processus de monosis (Torres et al., 2017) et dans les cellules polaires et de tige pour l'activation de la cascade apoptotique (Borensztein et al., 2013), exerçant ainsi un auto-contrôle du nombre de cellules produisant son ligand activateur Upd.

31 – L'apoptose est un processus d'élimination cellulaire très conservé, activé en contexte pathologique mais aussi de façon génétiquement programmée, notamment au cours du développement où elle joue un rôle capital (Baehrecke, 2002). Elle est médiée par les caspases initiateurs et effectrices, une famille de protéases qui, par clivage de protéines vitales, va induire la mort cellulaire. Les caspases sont maintenues à l'état inactif par des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), elles-mêmes ubiquitinylées et envoyées en dégradation par des antagonistes. Chez les vertébrés, ces antagonistes sont exprimés de façon ubiquitaire et activés en réponse à une induction de l'apoptose, alors que chez la drosophile, leur expression dépend de cette induction (Mignotte et al., 2005).

4.2.2. Élongation : deux astuces pour passer d'une sphère à une ellipsoïde

Au cours de leur maturation, le volume des follicules augmente du fait de l'endoréplication des cellules germinales. Pour éviter une rupture de l'épithélium folliculaire, cette croissance se fait de façon coordonnée entre les cellules somatiques et germinales (Vachias et al., 2014). Initialement sphériques au moment du bourgeonnement hors du germarium, les follicules s'allongent au cours de deux phases selon un axe antéro-postérieur défini par la voie JAK-STAT (Crest et al., 2017; Alégot et al., 2018; Popkova et al., 2021). En effet, l'orientation de l'axe d'élongation

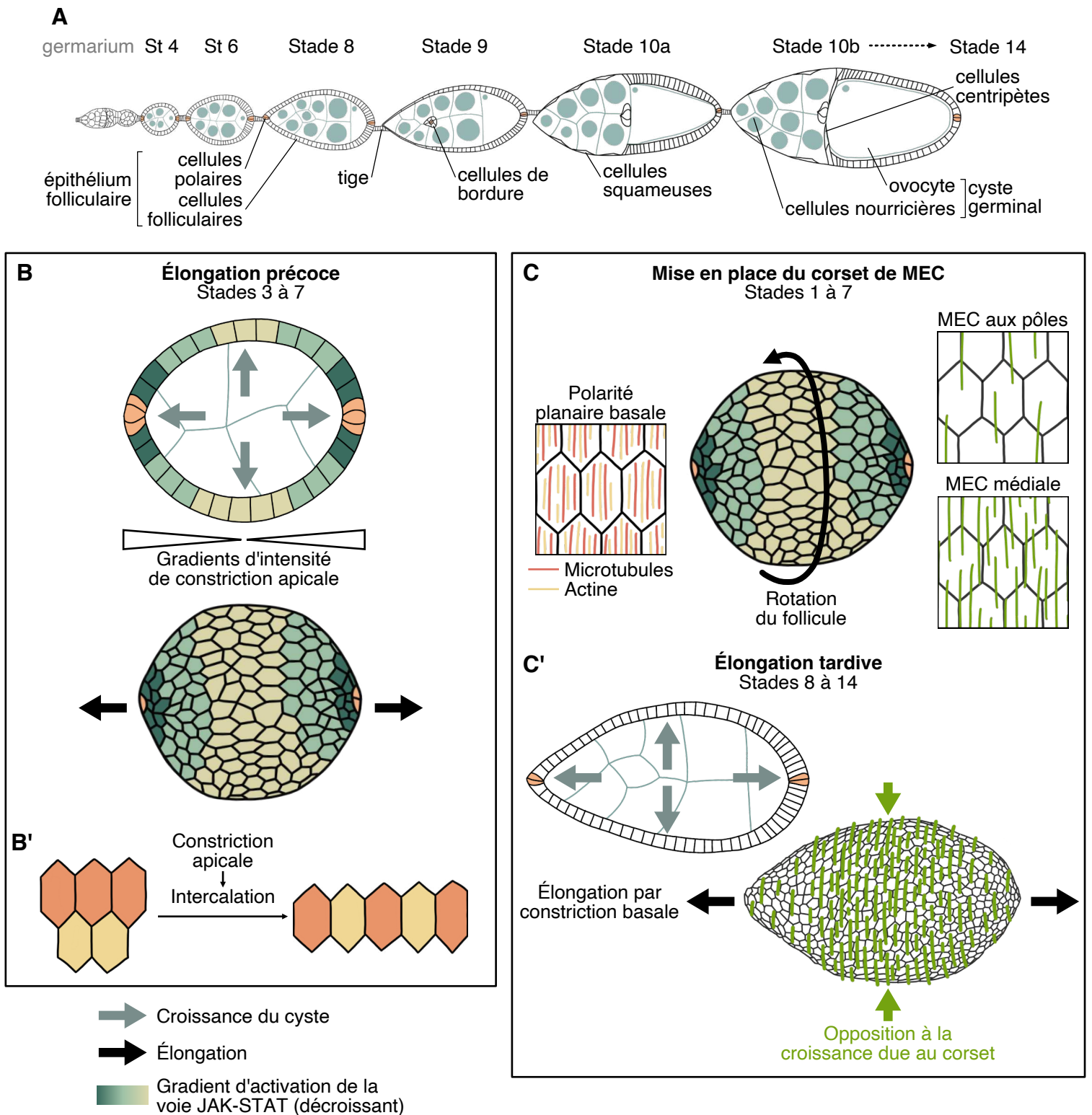


Figure 12 - L'élongation du follicule selon l'axe antéro-postérieur par deux processus successifs impliquant le patron d'activation de la voie JAK-STAT. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Schématisation du premier processus d'élongation en réponse à la croissance du cyste. Les cellules folliculaires effectuent des constriction de leur domaine apical d'intensité proportionnelle à leur niveau d'activation de la voie JAK-STAT, induisant une intercalation cellulaire orientée selon l'axe antéro-postérieur (B') et ainsi l'élongation du follicule selon cet axe. **(C)** Représentation schématique de la formation du corset de matrice extracellulaire (MEC). Les cellules folliculaires sont caractérisées par une polarité planaire basale, avec une organisation parallèle des microtubules et microfilaments d'actine, orientés perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur, induisant un mouvement de rotation du follicule. Les fibres de la MEC sont déposées en quantité inversement proportionnelle au gradient d'activation de la voie JAK-STAT par les cellules folliculaires, formant un réseau plus dense en région médiale qu'aux pôles, dont les fibres sont orientées par le mouvement de rotation du follicule. **(C')** En réponse à la croissance du cyste, les cellules folliculaires effectuent des mouvements de constriction basale de façon isotropique, mais le corset de MEC, s'opposant à la croissance en largeur, force l'élongation selon l'axe antéro-postérieur. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Alégot *et al*, 2018 et Popkova *et al*, 2021.

est instruite par le positionnement des cellules polaires et de l'activation graduée résultante de la voie JAK-STAT depuis les pôles vers la région médiale.

La première phase a lieu entre les stades 3 et 7, lorsque l'activation de la voie JAK-STAT induit une constriction apicale au niveau des cellules terminales, menant à une intercalation des cellules folliculaires orientée selon l'axe antéro-postérieur (Alégot et al., 2018) (Figure 12B). Entre les stades 8 et 14, lors de la seconde phase, les cellules de l'épithélium croissent de façon isotropique par un mécanisme de constriction basale (He et al., 2010) (Figure 12C). Cependant, un corset de matrice extracellulaire présentant une résistance plus faible aux pôles qu'en région médiale empêche la croissance en largeur du follicule et favorise l'élongation (Crest et al., 2017). La formation de ce corset a lieu avant le stade 8 et dépend de la polarité planaire des cellules folliculaires [32]. Cette polarité permet aux follicules d'initier un mouvement de rotation autour de l'axe antéro-postérieur dès leur bourgeonnement hors du germarium (Haigo and Bilder, 2011). Simultanément, les cellules folliculaires sécrètent les fibres de la matrice extracellulaire basale, dont le collagène IV qui va se déposer en plus grande quantité en région médiale qu'aux pôles en réponse à la voie JAK-STAT et s'orienter selon le sens de rotation du follicule, formant le corset (Chen et al., 2016; Isabella and Horne-Badovinac, 2016; Crest et al., 2017; Cerqueira Campos et al., 2020). En retour, ce corset polarisé permet une maintenance de la polarité planaire basale des cellules folliculaires durant les stades tardifs de l'ovogenèse, notamment via un complexe protéique transmembranaire composé des protéines Dystrophin (Dys) et Dystroglycan (Dg), liant les fibres de la matrice extracellulaire au réseau d'actine-F (Cerqueira Campos et al., 2020).

Ainsi, telle une boucle de rétrocontrôle, le gradient d'activité de la signalisation JAK-STAT induit l'élongation du follicule, et en retour cette élongation influence le patron d'activation de la voie JAK-STAT, puisque qu'elle va induire la distinction entre régions terminales et médiales de l'épithélium folliculaire.

32 – La polarité planaire est une caractéristique de certains épithéliums, où les cellules ont une orientation orthogonale à la polarité apico-basale. Dans les cellules folliculaires, cette polarité est mise en place progressivement dès le germarium et est caractérisée par des structures parallèles de microtubules et de microfilaments d'actine basaux, orientées perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur du follicule grâce à la cadhérine atypique Fat2 (Gutzeit et al., 1991; Viktorinová and Dahmann, 2013; Cetera et al., 2014; Chen et al., 2016).

4.2.3. Qui a cassé la symétrie de la voie JAK-STAT ?

Comme présenté précédemment, l'activation ou non de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires permet de distinguer les populations terminale et médiale. Or différents types de cellules folliculaires se forment aux pôles antérieur et postérieur malgré cette apparente symétrie d'activité. Cette distinction est due à l'ancrage de l'ovocyte au pôle postérieur (Figure 13).

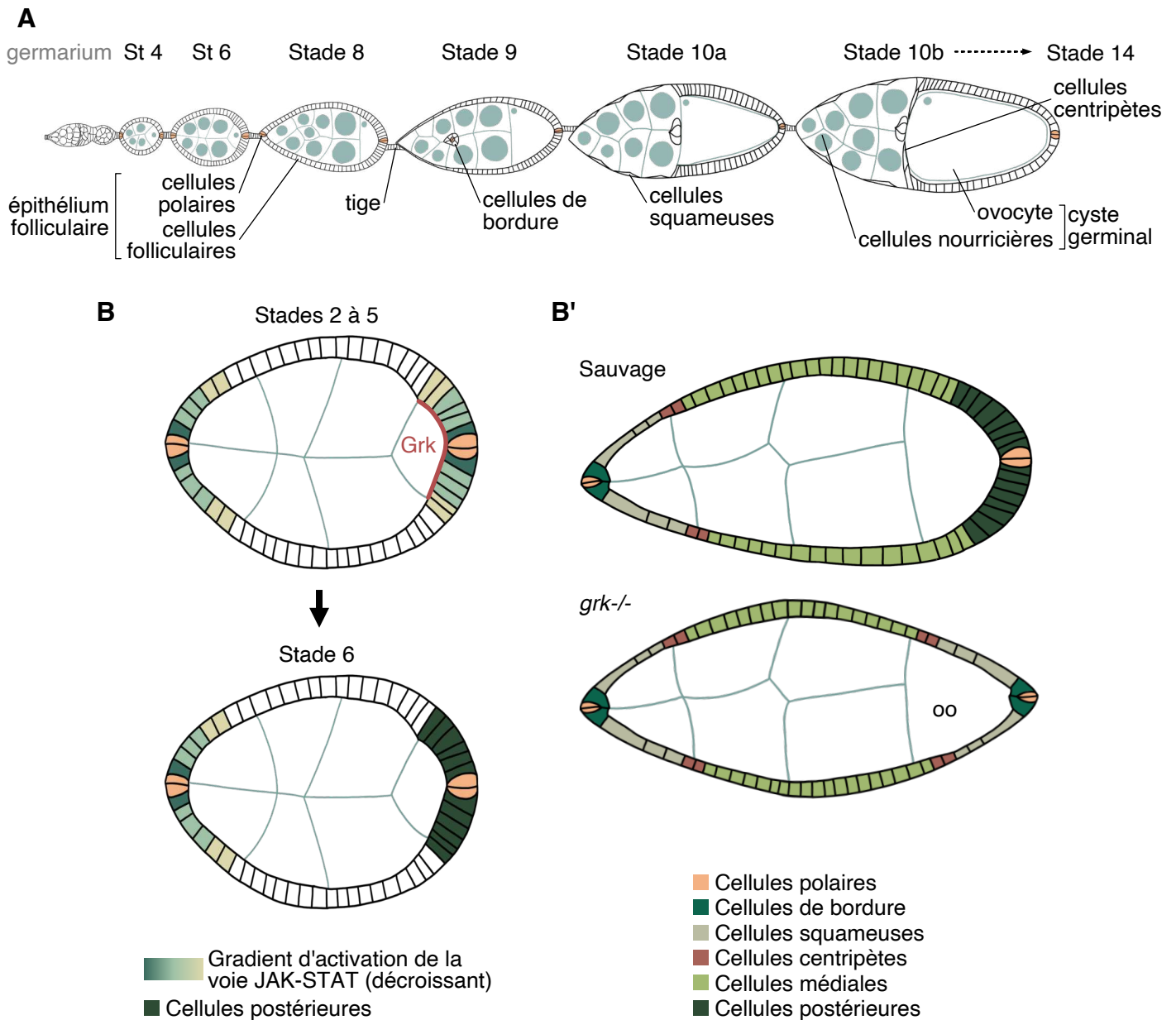


Figure 13 - L'asymétrie antéro-postérieure de différenciation des cellules folliculaires. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique de la différenciation des cellules folliculaires en fonction de leur distance par rapport aux cellules polaires au pôle antérieur et par l'activation combinée de la voie JAK-STAT et de la voie EGFR, via Gurken (Grk) sécrété par l'ovocyte (oo), au pôle postérieur. **(B')** Illustration du phénotype observé en absence de signalisation Grk/EGFR : les cellules folliculaires postérieures adoptent des destins antérieurs, formant un follicule symétrique.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Xi *et al*, 2003, Gonzalez-Reyes *et al*, 1995 et Roth *et al*, 1995.

Par défaut, l'activation en gradient de la voie JAK-STAT va initier la différenciation de trois destins cellulaires en fonction de la quantité de ligand Upd reçu, lui conférant ainsi un rôle de morphogène. C'est ce qui est observé au pôle antérieur, où les cellules folliculaires les plus proches des cellules polaires deviendront les cellules de bordure, les suivantes les cellules squameuses et les plus éloignées les cellules centripètes (voir 4.1.3.2 pour les fonctions de ces différents types cellulaires) (Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002; Xi et al., 2003). En revanche, au pôle postérieur, entre les stades 2 et 5, l'ovocyte sécrète Gurken, le ligand TGF α -like de la voie EGFR, dont le récepteur Torpedo/EGFR est exprimé par toutes les cellules folliculaires (Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993; Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995; Cáceres and Nilson, 2005). Du fait de l'ancrage de l'ovocyte au pôle postérieur et de la traduction polarisée de *gurken*, seules les cellules folliculaires terminales adjacentes reçoivent ce signal (Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993). La combinaison des voies EGFR et JAK-STAT dans ces cellules est suffisante pour réprimer les destins antérieurs en faveur d'une différenciation en cellules folliculaires postérieures (CFP) (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998a; Xi et al., 2003). La formation de cette sous-population est indispensable car elle va transmettre en retour une information, dont la nature reste à ce jour inconnue, à l'ovocyte et qui est l'un des chaînons de la série d'évènements permettant la mise en place de l'axe antéro-postérieur du futur embryon (voir Introduction-partie 2).

4.3. On ne perturbe pas la voie JAK-STAT sans casser des œufs

L'étendue de la zone d'activité de la voie JAK-STAT doit être finement régulée car elle influence la taille des populations terminales, donc par complémentarité, de la population médiale, régissant ainsi la morphologie globale du follicule (élongation, nombre de cellules médiales entourant l'ovocyte). De plus, au sein même de la population terminale antérieure, le nombre de cellules de chaque sous-population est dépendant d'un gradient correct de la voie JAK-STAT. Par exemple, le nombre de cellules de bordure, entre 4 et 6 sans compter la paire de cellules polaires, est précisément spécifié par la voie JAK-STAT puisqu'une perturbation de son activité par la perte d'un de ses acteurs réduit ce nombre (Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002; Ghiglione et al., 2002; Xi et al., 2003).

Un premier niveau de régulation a lieu au niveau du ligand Upd (Figure 14B). D'abord, sa diffusion dans la matrice extracellulaire est limitée, couvrant un rayon de 25 μ m environ autour des cellules polaires (Starz-Gaiano et al., 2009; Hayashi et al., 2012). En parallèle, son expression est contrôlée car, malgré l'influence de la matrice extracellulaire, une surexpression d'Upd suffit à étendre le gradient d'activation de la voie JAK-STAT (Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002). Cette régulation passe notamment par la réduction par apoptose du nombre de cellules polaires sécrétrices (Besse and Pret, 2003). En effet, elles sont générées en nombre supérieur à leur nombre final, possiblement pour assurer une production d'Upd suffisante à la formation

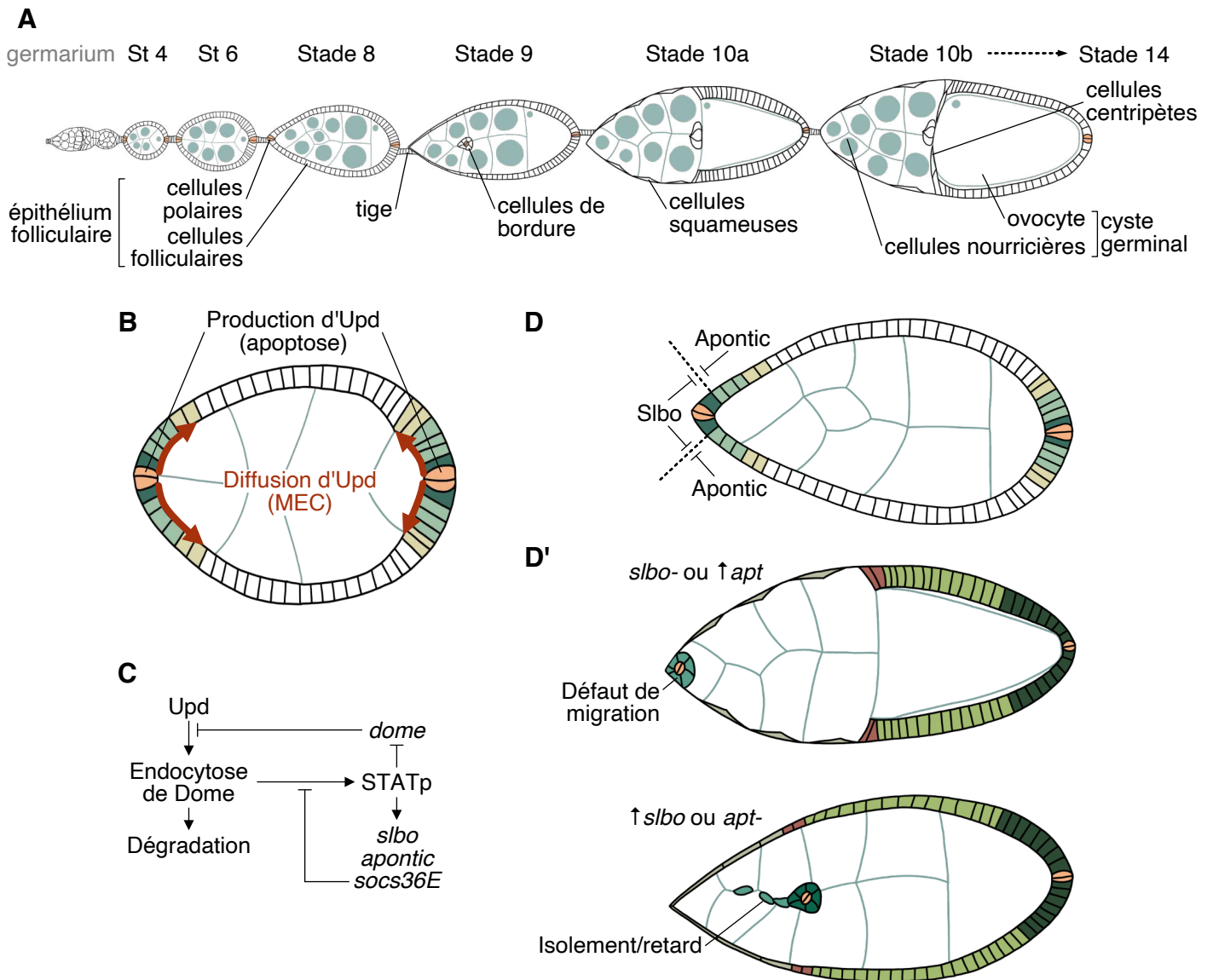


Figure 14 - Les différents niveaux de régulation du gradient d'activité de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B-C)** Schématisation des mécanismes de régulation de l'activité de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire, combinant des modulations de la production/diffusion du ligand (B) et des systèmes de retrocontrôle négatif intracellulaires (C). **(D)** Le gradient est affiné par la formation d'une frontière nette entre haute et moyenne activité de la voie JAK-STAT via ses cibles *slow border cells* (*slbo*) et *apontic* (*apt*). Cette frontière est nécessaire au recrutement d'un nombre adéquat de cellules de bordure et à leur migration correcte. **(D')** Illustration des phénotypes de défaut de migration (haut) ou de différenciation (bas) des cellules de bordure observés en contexte de perte (-) ou de gain (↑) de fonction de *slbo* et d'*apontic*.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Besse and Pret, 2003, Hayashi *et al*, 2012, Ghglione *et al*, 2002, Devergne *et al*, 2007, Starz-Gaiano *et al*, 2008 et Silver *et al*, 2005.

des tiges (McGregor et al., 2002; Borensztejn et al., 2013), mais le maintien de ce surnombre par inhibition de la cascade apoptotique entraîne les mêmes défauts de gradient, dont la surproduction de cellules de bordure et l'absence de cellules squameuses (Besse and Pret, 2003).

Il a été observé que la simple surexpression des acteurs de la transduction de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires sans augmentation de la production du ligand suffit à induire une augmentation du nombre de cellules de bordure recrutées (Silver and Montell, 2001) démontrant que le contrôle de la production et de la diffusion d'Upd n'est pas suffisant à la mise en place du gradient. Ainsi, un second niveau de régulation est assuré par des systèmes de rétrocontrôles, requis pour moduler l'intensité de la réponse dans les cellules folliculaires recevant Upd (Figure 14C). Ces mécanismes sont assurés notamment par l'endocytose du récepteur Dome activé, résultant en sa dégradation (Devergne et al., 2007), ainsi que par sa répression transcriptionnelle par Stat92E (Ghiglione et al., 2002). S'ajoute à cela l'inhibiteur SOCS36E, exprimé dans les cellules terminales et impliqué dans cette régulation, puisqu'une perte ou un gain de ce dernier entraîne respectivement une augmentation ou une diminution du nombre de cellules de bordure (Silver et al., 2005; Monahan and Starz-Gaiano, 2013, 2015).

La notion de gradient permettant la différenciation de trois sous-population de cellules indique l'existence de trois degrés d'activation séparés par des niveaux d'activité intermédiaire. Or, dans les cellules folliculaires, le niveau d'expression de *slbo* est proportionnel à l'activité de la voie JAK-STAT et sa diminution dans la population de cellules de bordure entraîne un ralentissement de la vitesse de migration du groupe [33] (Montell et al., 1992). Ainsi, au sein de la population terminale antérieure, la formation de cellules intermédiaires exprimant plus faiblement *slbo* entre les populations de cellules de bordure et squameuses doit être empêchée car elles présenteraient un phénotype de retard, caractérisé par un isolement par rapport au groupe de cellules de bordure correctement spécifiées et une migration ralentie (Starz-Gaiano et al., 2008). Un autre niveau de contrôle est donc nécessaire pour définir une frontière nette, ce qui est permis grâce à *apontic*, exprimé en réponse à de faibles niveaux de JAK-STAT pour réprimer la signalisation hors du domaine de formation des cellules de bordure (Starz-Gaiano et al., 2008) (Figure 14D).

33 – D'où son nom ! *Slbo* est un facteur de transcription, dont l'une des cibles est *shotgun*, le gène codant la E-Cadhérine chez la drosophile (Niewiadomska et al., 1999). Cette dernière est nécessaire à la processivité et au guidage de groupe de cellules de bordure lors de leur migration (voir [30]) (Niewiadomska et al., 1999; Cai et al., 2014).

CONCLUSION

L'ovogenèse chez la drosophile est un concentré de processus impliquant la voie JAK-STAT, offrant ainsi autant de mécanismes à étudier : induction de l'apoptose, de la différenciation et de la migration cellulaire, mais également dans la morphogenèse tissulaire pour la délamination de cellules épithéliales et l'élongation tissulaire. Pour nombre d'entre eux, les cibles ou conséquences moléculaires exactes de l'activation de la voie JAK-STAT ne sont pas connues et les mécanismes précis de sa modulation restent encore à identifier. Notamment, elle est impliquée dans la différenciation des CFP, mais à ce jour, peu d'éléments sont connus sur les cibles responsables de ce destin. De plus, des zones d'ombres persistent quant aux conséquences de cette différenciation, en particulier sur son influence non autonome cellulaire sur la polarité de l'ovocyte.

Au cours de ma thèse, des observations fortuites m'ont poussée à m'intéresser à cette relation entre les CFP et l'ovocyte. Ainsi, afin d'introduire au mieux mes recherches, dans la partie suivante de mon introduction, je laisse temporairement de côté la fascinante voie JAK-STAT pour présenter la mise en place de la polarité antéro-postérieure au cours de l'ovogenèse.

INTRODUCTION – PARTIE 2

1. La polarisation antéro-postérieure : la course d'orientation de l'ovocyte

Au cours de l'ovogenèse, la polarisation antéro-postérieure a lieu à deux échelles. La première, que j'ai abordée précédemment, concerne le follicule entier par l'ancrage de l'ovocyte au pôle postérieur, entraînant une asymétrie de l'épithélium folliculaire suite à la différenciation des CFP (voir Introduction-Partie 1, 4.2.3). De cette polarisation dépend la seconde : une asymétrie au sein de l'ovocyte lui-même. La mise en place de cette polarité de l'ovocyte est cruciale car elle est maintenue jusque dans l'œuf fécondé et régit la polarité du futur embryon. Dans l'ovocyte, elle prend la forme d'une accumulation de déterminants cytoplasmiques distincts aux pôles antérieur et postérieur, dont les premiers représentants sont respectivement les ARNm *bicoid* (*bcd*) (Berleth et al., 1988; St Johnston et al., 1989; Ephrussi and Johnston, 2004) et *oskar* (*osk*) [34] (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991; St Johnston et al., 1991). Leur ségrégation n'a lieu qu'en milieu d'ovogenèse mais le processus y menant commence dès la première division du futur cyste, dans le germarium. Reprenons du début.

34 – Les déterminants cytoplasmiques sont des molécules, souvent ARNm et protéines, localisés dans des régions distinctes du cytoplasme de l'ovocyte avant fécondation, puis de l'embryon mais aussi dans certaines cellules au stade adulte. Ces déterminants affectent le destin des cellules dans lesquelles ils vont ségréger par la suite. Pour la mise en place de l'axe-antéro-postérieur de la drosophile, les déterminants principaux sont Bicoid au pôle antérieur ainsi que Oskar et Nanos au pôle postérieur. L'ARNm *bicoid* est accumulé au pôle antérieur de l'ovocyte et ne sera traduit qu'après la fécondation, permettant de créer une source localisée à partir de laquelle la protéine Bicoid diffuse pour former un gradient couvrant la moitié antérieure de l'embryon, ce qui conduira à la formation de la tête et du thorax (Berleth et al., 1988; Ephrussi and Johnston, 2004). Du côté postérieur, l'ARNm *oskar* est le premier à s'accumuler dans l'ovocyte, où il va être directement traduit et permettre le recrutement d'autres composants du plasmé germinatif, dont l'ARNm *nanos* (Mahowald, 2001; Forrest and Gavis, 2003). Le plasmé germinatif est un domaine cytoplasmique se formant au cours de l'ovogénèse et maintenu après la fécondation qui regroupe des centaines d'ARNm organisés en complexes ribonucléoprotéiques appelés granules. Il va permettre à la fois la formation des cellules de la lignée germinale, aussi appelées cellules polaires, et la formation de l'abdomen (Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1986). En effet, le recrutement de l'ARNm *nanos* dans le plasmé germinatif au cours de l'ovogenèse génère une source localisée de ce déterminant, qui similairement à Bicoid, va être traduit localement et diffuser pour former un gradient couvrant la moitié postérieure de l'embryon après la fécondation et permettant la formation des segments abdominaux (Gavis and Lehmann, 1992; Forrest et al., 2004).

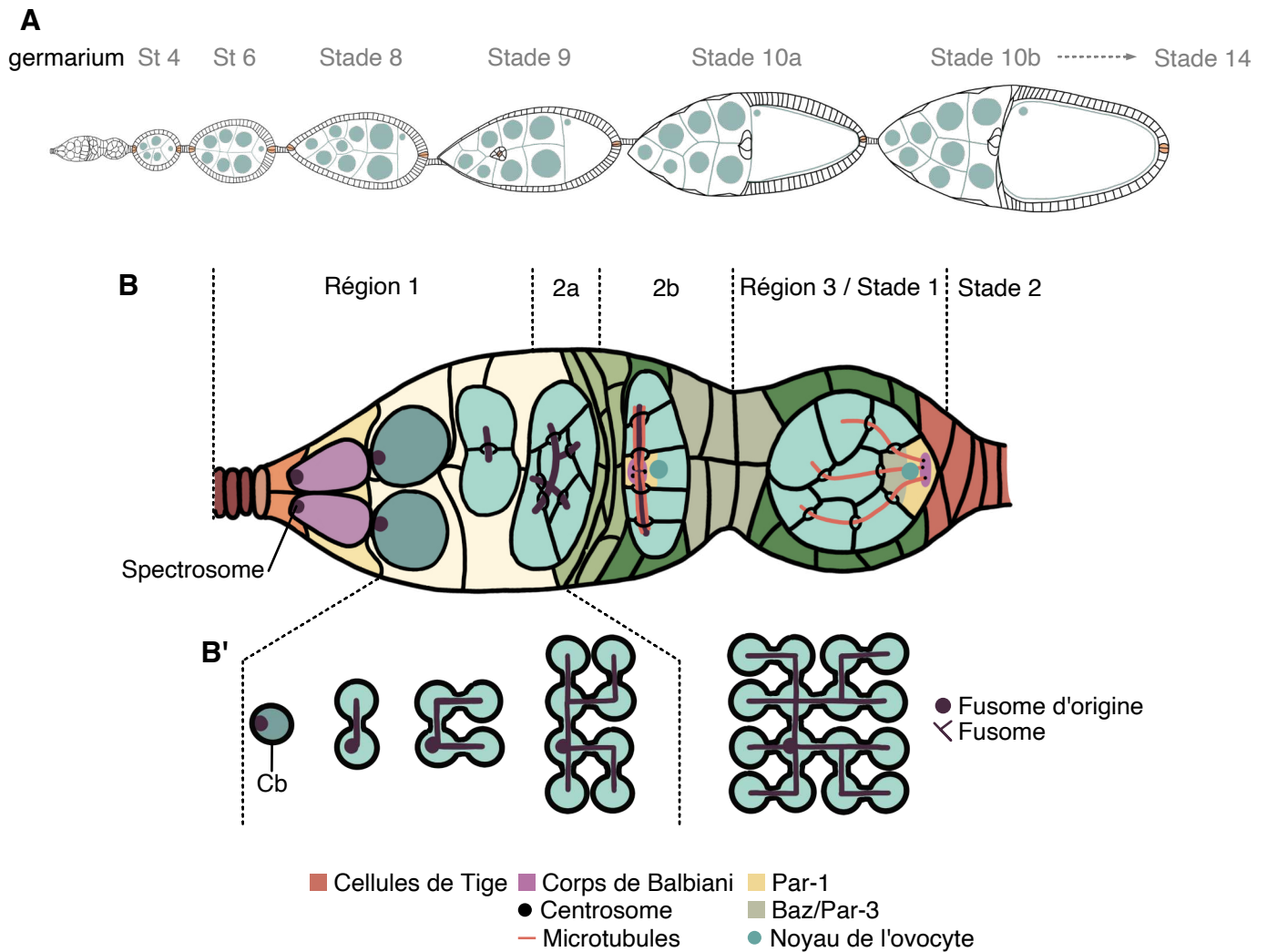


Figure 15 - La sélection de l'ovocyte dans le germarium. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique de l'organisation du germarium. Le code couleur des différents type de cellules somatiques est indiqué en figures 5, 6 et 7. **(B')** Schéma de la répartition du fusome lors des quatre cycles de divisions incomplètes permettant la formation d'un cyste de seize cellules, interconnectées par un nombre précis de canaux en anneaux, à partir du cystoblaste (Cb). Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans la référence Huynh, 2006.

1.1. Retour aux sources : initiation de la polarisation dans le germarium

1.1.1. La sélection de l'ovocyte : un match gagné d'avance

À première vue, en fin de division du cyste, il ne semble pas y avoir de différence entre les deux pro-ovocytes : tous deux ont le nombre maximum de canaux en anneaux et commencent à accumuler des marqueurs spécifiques tels que Bicaudal-D, Egalitarian, Orb et les ARNm *bicoid* (*bcd*), *oskar* (*osk*) et *gurken* (*grk*) (Ephrussi et al., 1991; Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993; Lantz et al., 1994; Mach and Lehmann, 1997) [35]. Cependant, dès la première division du cystoblaste, le choix du futur ovocyte est déjà fait, et ce grâce au fusome (voir [22]).

À chaque division, les deux cellules filles héritent de la moitié du bouchon de fusome nouvellement formé mais une seule contient le fusome d'origine, du fait que celui-ci sert d'ancrage à un des pôles du fuseau mitotique (Figure 15). Ce mécanisme induit une asymétrie qui s'accroît de la première à la dernière division : la première cellule fille (1) à hériter du fusome d'origine contient plus de fusome que toutes les autres cellules du cyste (de Cuevas and Spradling, 1998) et sa sœur (2) arrive deuxième (Huynh, 2006). Cette différence est importante car le fusome est associé à la protéine Short stop (Shot), permettant le recrutement et la stabilisation de microtubules grâce à l'interaction avec Patronin, une protéine associée aux extrémités moins des microtubules (Röper and Brown, 2004; Nashchekin et al., 2021). Du fait du biais de fusome entre les cellules (1) et (2), une plus grande portion d'extrémités moins va s'accumuler dans (1), permettant la formation d'un réseau orienté (Grieder et al., 2000). Ces microtubules permettent à la fois le transport par des moteurs moléculaires, les dynéines, des marqueurs spécifiques de l'ovocyte vers (1) et (2), mais aussi de centrosomes et de Patronin, créant une boucle d'amplification de l'accumulation d'extrémités moins des microtubules dans (1) et sa sélection comme ovocyte (Grieder et al., 2000; Bolívar et al., 2001; Nashchekin et al., 2021). Au passage en région 2b, le fusome dégénère, seul reste le réseau de microtubules, traversant les canaux en anneaux vers le centre organisateur des microtubules (MTOC) de l'ovocyte, localisé entre le noyau et le cortex antérieur de l'ovocyte [36] (Theurkauf et al., 1992). Autour de ce MTOC, les marqueurs spécifiques de l'ovocyte ainsi que des organelles (golgi, mitochondries) continuent de s'accumuler formant une structure appelée corps de Balbiani (Cox and Spradling, 2003).

35 – Le complexe Bicaudal-D/Egalitarian est un marqueur spécifique de l'ovocyte. Initialement détecté dans toutes les cellules du cyste, il s'accumule uniquement dans l'ovocyte lors du passage en région 2a. Cependant, il est aussi impliqué dans le processus de sélection de l'ovocyte car il permet le chargement de cargos sur le moteur moléculaire dynéine et donc le transport des marqueurs de sélection vers l'ovocyte (Mach and Lehmann, 1997; Navarro et al., 2004). Comme son nom l'indique, Orb, pour oo18 RNA binding, s'associe à des ARNm pour réguler leur traduction. Au cours de l'ovogenèse, en plus de son rôle dans la sélection de l'ovocyte (Lantz et al., 1994), Orb autocontrôle la traduction de son propre transcrit, afin qu'elle

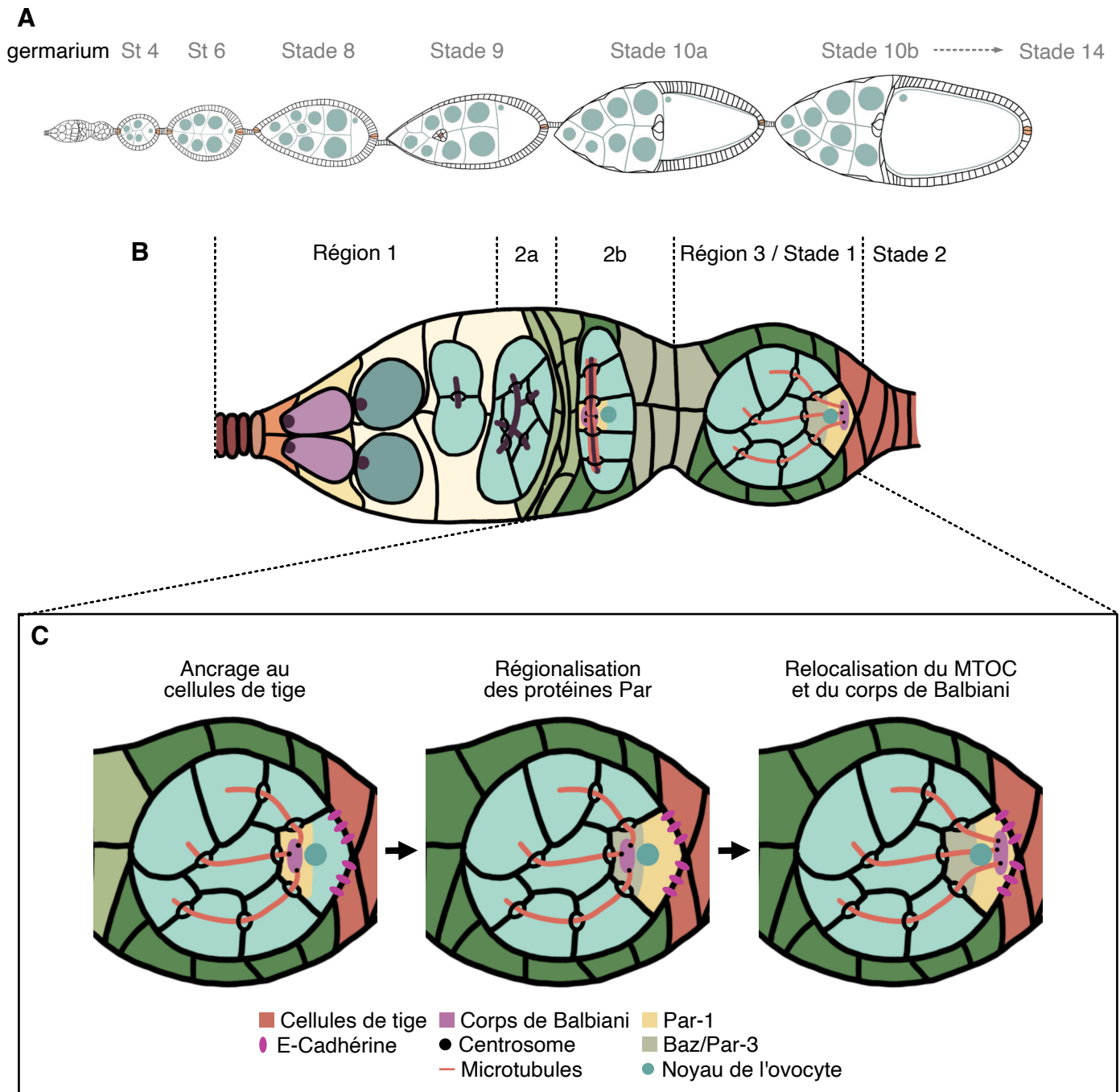


Figure 16 - La polarisation antéro-postérieure de l'ovocyte dans le germarium. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique de l'organisation du germarium. Le code couleur des différents type de cellules somatiques est indiqué en figure 5, 6 et 7. **(C)** Schématisation des étapes de la polarisation de l'ovocyte en région 2b induite par les cellules de tige nouvellement formées en postérieur. MTOC : centre organisateur des microtubules. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Huynh and St Johnston, 2004, Godt and Tepass, 1998, Gonzalez and St Johnston, 1998 et Vaccari and Ephrussi, 2002.

ait lieu de manière localisée dans l'ovocyte (Tan et al., 2001). Orb est ainsi restreinte à la membrane de l'ovocyte en contact avec les CFP, où elle permet la traduction localisée des ARNm *oskar* et *gurken* pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur (Chang et al., 1999, 2001).

36 – MTOC (pour MicroTubule Organizing Center) est un nom général donné à une structure permettant la polymérisation des microtubules soit par nucléation, grâce à des anneaux de γ -tubuline qui servent de base, soit par recrutement d'extrémités moins de microtubules déjà existantes. Les MTOC peuvent contenir ou non des centrioles. Afin de les distinguer, les noms de centrosome et MTOC non-centrosomal (nc-MTOC) sont donnés respectivement (Goodson and Jonasson, 2018).

1.1.2. La transmission de savoir entre cystes pour l'ancrage de l'ovocyte

À la transition entre les régions 2b et 3 et de façon simultanée, l'ovocyte s'ancree au pôle postérieur du follicule (Godt and Tepass, 1998; Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998b) et les composants du corps de Balbiani se désassemblent et se relocalisent en croissant entre le noyau et le cortex postérieur de l'ovocyte (Grieder et al., 2000), marquant respectivement la polarité antéro-postérieure du follicule et de l'ovocyte (Huynh and St Johnston, 2004) (Figure 16).

L'ancrage de l'ovocyte au pôle postérieur est transmis par le bourgeonnement du cyste plus âgé en région 3. En plus des autres marqueurs, l'ovocyte en région 2b accumule de fort niveaux de E-Cadhérine, et, par adhérence préférentielle, se positionne en contact avec les cellules de tige nouvellement formées, exprimant elles aussi fortement la E-Cadhérine (Godt and Tepass, 1998; Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998b; Assa-Kunik et al., 2007). Du fait de cette interaction, le réseau d'actine-F corticale de l'ovocyte se réorganise (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998b; Deng et al., 2003), entraînant l'accumulation dans des régions distinctes des protéines de la famille Par [37]. En réponse, le MTOC, et donc les composants du corps de Balbiani, se relocalisent entre le noyau et le cortex postérieur de l'ovocyte (Cox et al., 2001a, 2001b; Huynh et al., 2001b, 2001a; Vaccari and Ephrussi, 2002). Ainsi, le réseau de microtubules polarisé traversant les canaux en anneaux est maintenu, permettant de poursuivre le transport de composants des cellules nourricières vers l'ovocyte (voir Introduction-Partie 1, 4.1.2).

37 – Les PAR sont des protéines de polarité découvertes chez *Caenorhabditis elegans*. Elles ont été nommées ainsi en référence aux défauts de ségrégation de composants cytoplasmiques, « partitioning » en anglais, au stade embryonnaire observés chez des mutants (Guo and Kemphues, 1995; Goldstein and Macara, 2007). Elles sont au nombre de six chez *C. elegans* (PAR-1 à 6) : PAR-1/4 sont des serine/thréonine kinases, PAR-3/6 des protéines d'échafaudage et PAR-5 appartient à la famille des 14-3-3, interagissant avec des sérines et thréonines phosphorylées. PAR-3/6 forment un complexe avec la Protéine-Kinase atypique C (aPKC) et la petite protéine G CDC42 (pour Cell Division Control). Lors de la polarisation de l'embryon induite par la fécondation, elles sont recrutées au cortex cellulaire et

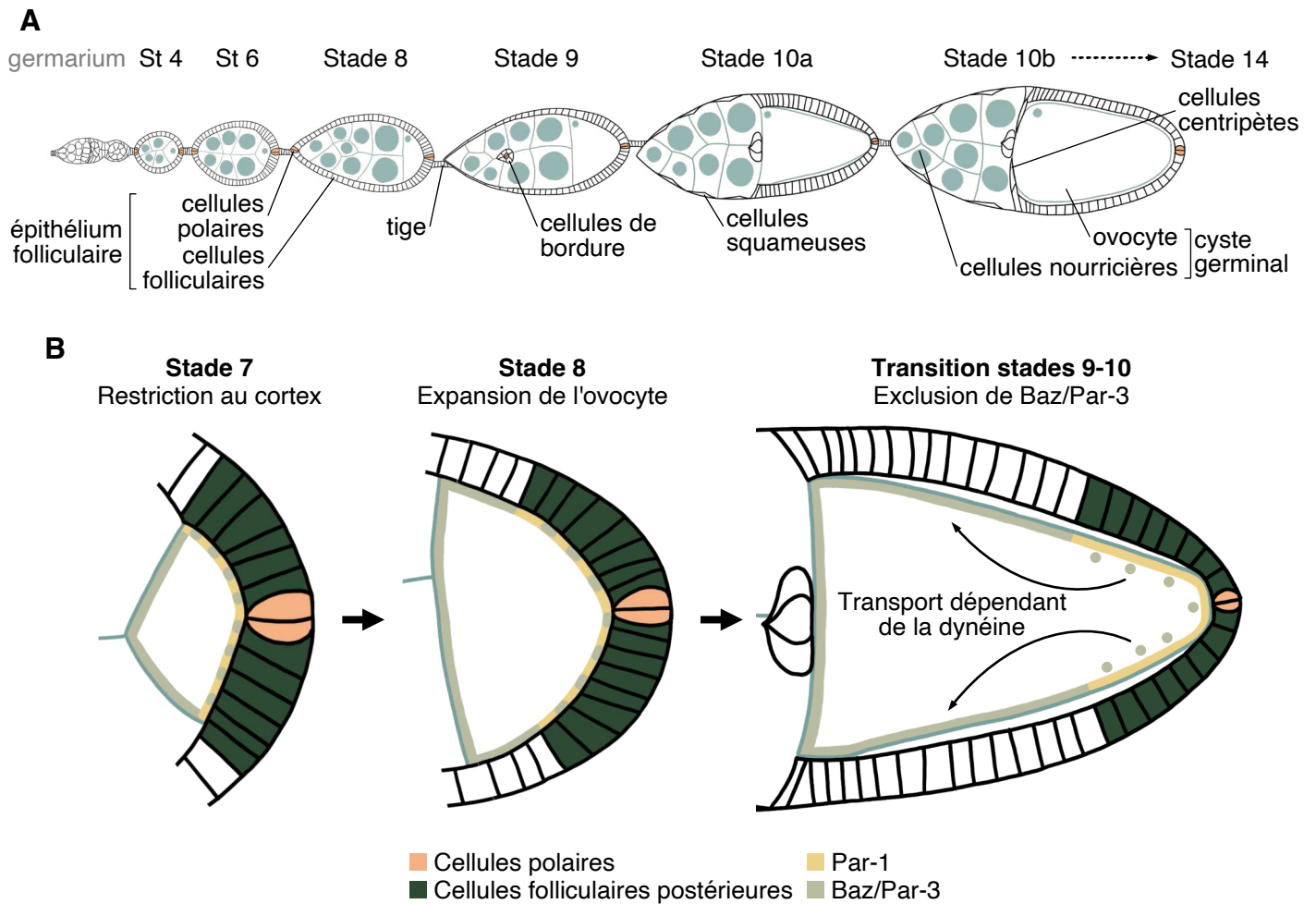


Figure 17 - La régionalisation des protéines Par au cortex de l'ovocyte. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique de la maintenance de la régionalisation après différenciation des cellules folliculaires postérieures. Au stade 7, Baz/Par-3 est présent sur tout le cortex de l'ovocyte, colocalisant avec Par-1 en postérieur. A partir du stade 8, une zone de membrane antéro-latérale en contact avec des cellules folliculaires médiales (blanches) est générée par l'expansion de l'ovocyte. À la transition entre les stades 9 et 10, Baz/Par-3 est exclu du cortex postérieur par antagonisme avec Par-1 et par endocytose, et est transporté vers la région antéro-latérale de façon dépendante des microtubules et de la dynéine. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Doerflinger *et al*, 2006 et 2010 et Jouette *et al*, 2019.

ségréguées de façon dépendante de l'actine dans des zones distinctes du cortex car elles se répriment mutuellement : PAR-1/2 au pôle postérieur et le complexe PAR-3/6/aPKC/CDC42 au pôle antérieur. Similairement, chez la drosophile, les protéines Par sont impliquées dans la polarisation de l'ovocyte, donc du futur embryon, et seule PAR-2 n'est pas conservée. Ces protéines sont transportées dans l'ovocyte dès le germarium par le fusome et son réseau de microtubules associé (Shulman et al., 2000; Cox et al., 2001a, 2001b; Huynh et al., 2001b, 2001a), Par-1 et Cdc42/aPKC/Par-6/Bazooka (Baz, homologue de PAR-3) s'accumulent respectivement aux régions postérieure et antérieure par rapport au noyau central, avec un enrichissement au niveau cortical (Benton et al., 2002; Vaccari and Ephrussi, 2002; Benton and Johnston, 2003; Leibfried et al., 2013). Le maintien de cet antagonisme se fait également par phosphorylations inhibitrices mutuelles limitant leur association à la membrane : Par-1 phosphoryle Baz/Par-3 (Benton et al., 2002; Benton and Johnston, 2003) et aPKC phosphoryle Par-1 (Doerflinger et al., 2010).

1.2. Maintenance de Par ici et de Par là

Après le bourgeonnement, l'ARNm *gurken*, qui a été déplacé au cortex postérieur lors de la relocalisation des composants des corps de Balbiani, est traduit, permettant la différenciation des cellules folliculaires adjacentes en CFP (Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993; Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995). En parallèle, la localisation des protéines Par dans des régions antérieure et postérieure distinctes est maintenue (Vaccari and Ephrussi, 2002; Leibfried et al., 2013) puis, au stade 7, Par-1 est uniquement détectée au cortex postérieur, c'est-à-dire à la membrane de l'ovocyte en contact avec les cellules folliculaires (Shulman et al., 2000; Tomancak et al., 2000; Doerflinger et al., 2006) (Figure 17). Cet ancrage a lieu en réponse à la bi-phosphorylation activatrice de la myosine II sur sa chaîne légère régulatrice (MRLC pour Myosin Regulatory Light Chain). Cette phosphorylation coïncide temporellement avec la fin de la différenciation des CFP et l'envoi de l'information inconnue à l'ovocyte, suggérant que le message envoyé induit cette activation de la Myosine II (Doerflinger et al., 2006, 2022). Malgré leur antagonisme (voir [37]), Bazooka (Baz/Par-3) colocalise avec Par-1 dans cette zone, bien qu'à des niveaux très inférieurs à ceux détectés au cortex antérieur, c'est-à-dire à la membrane de l'ovocyte en contact avec les cellules nourricières (Doerflinger et al., 2010; Jouette et al., 2019). À partir du stade 8, l'expansion de l'ovocyte génère une zone de membrane antéro-latérale, en contact avec les cellules folliculaires médiales, restant positive pour Baz/Par-3 mais où Par-1 n'est pas détectée, devenant ainsi restreinte à un croissant faisant uniquement face aux CFP (Shulman et al., 2000; Doerflinger et al., 2010; Jouette et al., 2019). Finalement, au cours du stade 9, Baz/Par-3 va être progressivement exclu de cette zone du cortex postérieur à la fois par Par-1 et par endocytose puis transporté de façon dépendante des microtubules et de la dynéine vers le cortex antéro-latéral, créant ainsi deux zones totalement distinctes (Doerflinger et al., 2010; Jouette et al., 2019). Cette régionalisation est cruciale car elle permet à la fois la mise en place d'un réseau de

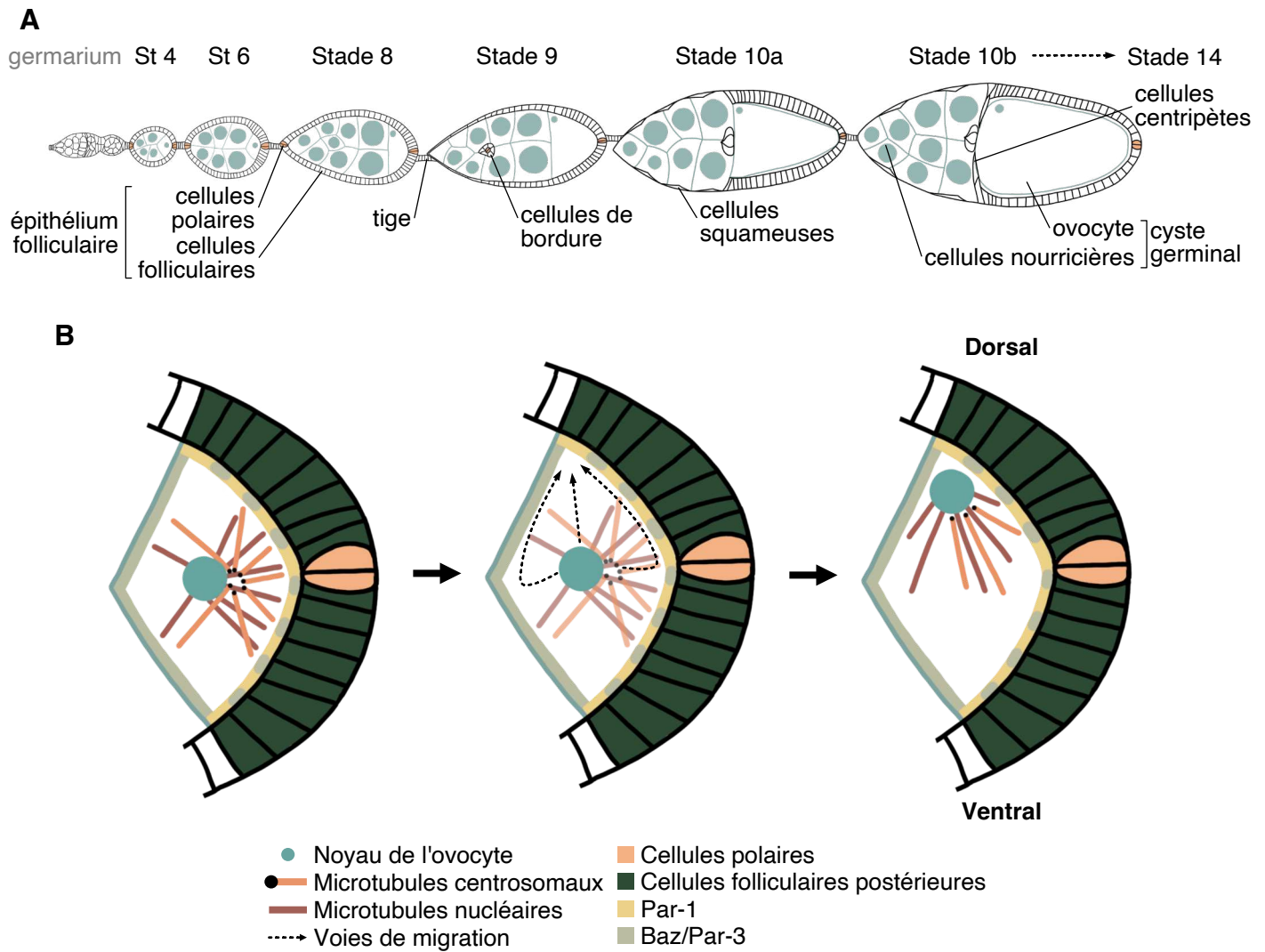


Figure 18 - Les voies de migration du noyau de l'ovocyte au stade 6. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique des réseaux de microtubules responsables de la migration du noyau de l'ovocyte au stade 6. Ce déplacement peut se faire selon trois voies : le long des membranes antérieure ou postérieure, voies favorisées par la poussée des microtubules centrosomaux ou nucléaires respectivement, ou à travers le cytoplasme, voie générée par un équilibre entre les deux types de poussées. La zone d'ancrage du noyau après migration définit l'axe dorso-ventral.

Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans la référence Bernard *et al*, 2018.

microtubules adéquat pour le transport des déterminants cytoplasmiques mais aussi pour l'ancrage de ces derniers au cortex.

1.3. Et attendez, c'est pas fini, combien de réseaux de microtubules ?

Suite à l'envoi de l'information inconnue par les cellules folliculaires et la concomitante mise en place de la régionalisation des Par s'enchaîne une série d'évènements majeurs pour la polarisation de l'ovocyte tournant autour d'une réorganisation totale du réseau de microtubules. En effet, le réseau traversant les canaux en anneaux est désintégré au profit de réseaux indépendants mis en place dans les cellules nourricières et dans l'ovocyte (Theurkauf et al., 1992; Mische et al., 2007). Les réseaux des cellules nourricières maintiennent le transport sélectif vers l'ovocyte (voir Introduction-Partie 1, 4.1.2), alors que ceux de l'ovocyte lui permettent de poursuivre sa polarisation antéro-postérieure (Pokrywka and Stephenson, 1991; Clark et al., 1994) et d'initier la mise en place de sa polarité dorso-ventrale (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995).

1.3.1. Un noyau pour gouverner l'axe dorso-ventral

Dans l'ovocyte, deux premiers réseaux sont organisés autour de son noyau, permettant la migration de ce dernier depuis sa localisation centrale définie dans le germarium vers la jonction entre les membranes antérieure et latérale de l'ovocyte au stade 6. En trois dimensions, cette jonction correspond à un anneau et, si le choix de la zone d'ancrage dans sa circonférence est aléatoire (Roth et al., 1999), il dicte la position des futures structures dorsales de l'œuf et induit la formation de l'axe dorso-ventral du futur embryon (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995; Guichet et al., 2001).

Un des deux réseaux est constitué de microtubules nucléés à partir du MTOC localisé postérieurement par rapport au noyau et l'autre de microtubules nucléés directement depuis l'enveloppe nucléaire [38] (Januschke et al., 2006; Zhao et al., 2012; Tissot et al., 2017). Ces deux réseaux sont complémentaires et induisent le déplacement du noyau par une force de poussée selon trois voies possibles, assurant ainsi qu'il atteigne toujours la jonction antéro-latérale (Figure 18) (Zhao et al., 2012; Tissot et al., 2017; Bernard et al., 2018).

Bien que le réseau nucléé à partir du MTOC soit présent dès le stade 1, il ne permet pas le déplacement du noyau avant le stade 6 car ce dernier doit être libéré de sa position centrale par un mécanisme encore inconnu (Zhao et al., 2012). En effet, dans sa position centrale, le noyau de l'ovocyte est maintenu par ce qui semble être un point d'équilibre entre poussée et traction exercées par les microtubules (Tissot et al., 2017). Au stade 6, l'information provenant des CFP est proposée comme cassant cet équilibre, libérant le noyau, mais de façon indépendante de la relocalisation de Par-1 au cortex de l'ovocyte (Zhao et al., 2012; Tissot et al., 2017). En se déplaçant, le noyau

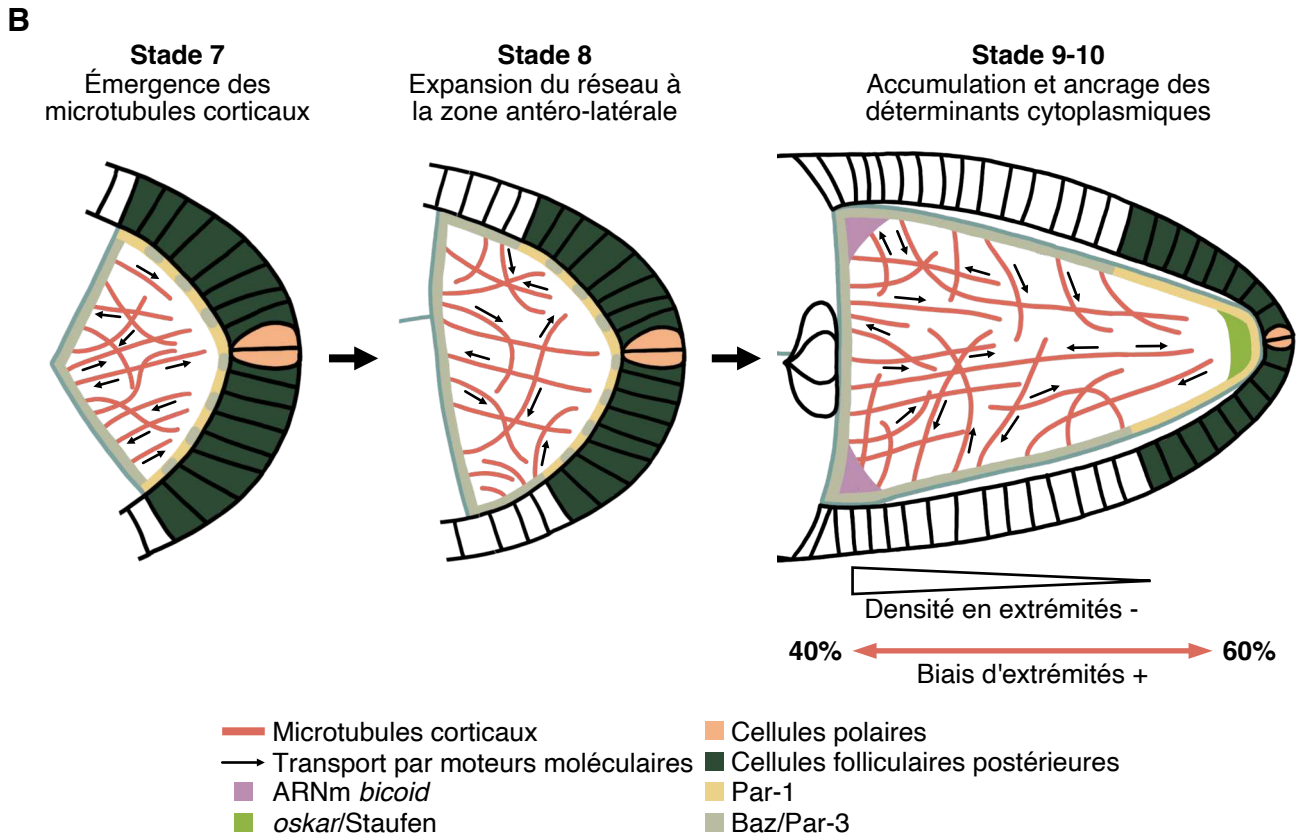
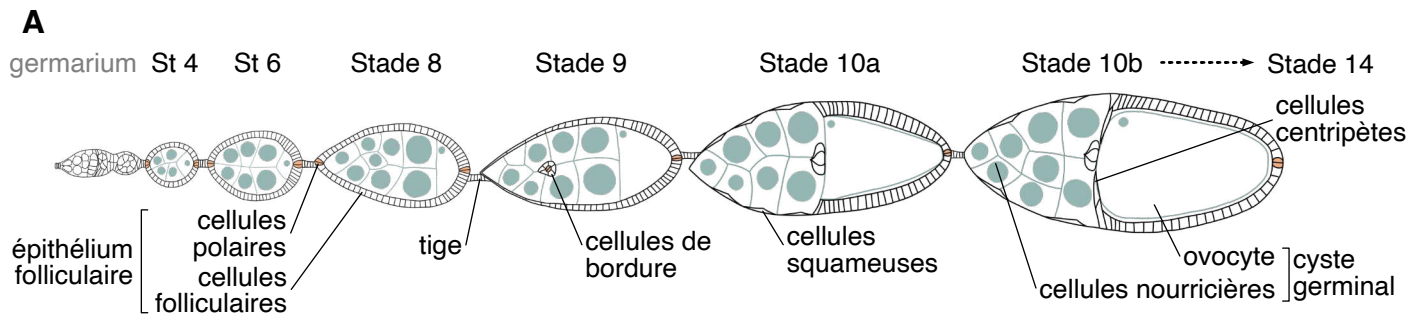


Figure 19 - La mise en place du réseau de microtubules cortical et du transport des déterminants cytoplasmiques dans l'ovocyte. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. **(A)** Schéma d'une ovariole, avec le germarium en antérieur suivi de follicules à différents stades de maturation, pour repère chronologique. **(B)** Représentation schématique de la mise en place du réseau de microtubules cortical. D'abord émergeant du cortex antérieur au stade 7, il s'étend en antéro-latéral à partir du stade 8 avec un gradient de densité, et donc d'extrémités moins, décroissant vers le postérieur. Les extrémités plus présentent un biais d'orientation, 60% pointant vers le postérieur. Transportés aléatoirement mais de façon polarisée via leurs moteurs moléculaires, l'ARNm *bicoid* s'accumule en antérieur et *oskar*/Staufen en postérieur car associés à la dynéine et à la kinésine respectivement. Les informations nécessaires à la réalisation de cette figure ont été recueillies dans les références Parton *et al*, 2011, Theurkauf *et al*, 1992.

transporte avec lui l'ARNm *gurken* (Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993), ce qui va libérer le ligand Gurken localement en région antéro-latérale de l'ovocyte et permettre ainsi la différenciation d'une nouvelle sous-population de cellules folliculaires par la voie Gurken/EGFR qui va définir la région dorsale (voir Introduction-Partie 1, 4.1.3.2).

38 – Le noyau de l'ovocyte est caractérisé par la présence de matériel péricentriolaire à sa périphérie, telle que la γ -tubuline, si bien qu'il est considéré comme un nc-MTOC (Januschke et al., 2006) et permet une nucléation orientée de microtubules, plus fortement accumulé sur sa face postérieure, via le complexe Mud/Asp (Tissot et al., 2017).

1.3.2. Le réseau cortical : difficile de ne pas être biaisé

Un autre réseau de l'ovocyte, appelé cortical, permet le transport polarisé dépendant des moteurs moléculaires des premiers déterminants cytoplasmiques antérieur et postérieur : l'ARNm *bicoid* grâce à la dynéine (Duncan and Warrior, 2002; Januschke et al., 2002) et l'ARNm *oskar*, associé à la protéine Staufén, grâce à la kinésine (*oskar/Staufen*, [39]) (Brendza et al., 2000; Palacios and St Johnston, 2002) (Figure 19).

La mise en place du réseau de microtubules cortical de l'ovocyte repose sur le patron des protéines Par au cortex de l'ovocyte. Au stade 7, juste après la réception de l'information émise par les CFP, un réseau de microtubules émanant du cortex antérieur commence à être observé (Theurkauf et al., 1992). À partir du stade 8, lorsqu'apparaît la zone antéro-latérale dépourvue de Par-1, le réseau s'étend sur cette région (Theurkauf et al., 1992; Parton et al., 2011). Ces microtubules sont générés à partir de sites de nucléation ancrés au cortex (Parton et al., 2011) composés des protéines Shot, interagissant avec l'actine-F corticale de l'ovocyte, en complexe avec Patronin, qui recrute les extrémités moins de microtubules existants (Nashchekin et al., 2016). Ces nc-MTOC sont exclus de la zone postérieure du cortex du fait de la présence de Par-1 (Shulman et al., 2000; Parton et al., 2011) qui empêche le recrutement de Shot (Nashchekin et al., 2016). Ainsi, les microtubules présentent un gradient de densité, et donc d'extrémités moins, décroissant depuis le côté antérieur et sont orientés dans toutes les directions, avec un léger biais d'extrémités plus pointant vers le pôle postérieur (60% contre 40% vers l'antérieur) (Parton et al., 2011). Les cargos provenant des cellules nourricières, y compris ceux qui transportent les déterminants cytoplasmiques, sont pris en charge par les moteurs moléculaires et subissent un transport aléatoire sur ce réseau (Zimyanin et al., 2008; Parton et al., 2011). *In fine*, le gradient de densité du réseau permet l'accumulation de l'ARNm *bicoid* au pôle antérieur alors que le léger biais de polarité induit le transport d'*oskar/Staufen* au pôle postérieur (Cha et al., 2001; Zimyanin et al., 2008; Parton et al., 2011; Trovisco et al., 2016).

39 – L'ARNm *oskar* est en fait associé à de nombreux facteurs, dont Mago nashi et Staufén, nécessaires à son transport au pôle postérieur de l'ovocyte (St Johnston, 2005). Staufén est

la seule protéine à rester associée à l'ARNm *oskar* une fois arrivé au pôle postérieur et sa détection est très souvent utilisée pour attester de la localisation de l'ARNm *oskar*.

1.4. Pas de transport, pas d'ancrage ...

1.4.1. ... pas d'ancrage, pas de déterminants...

D'après des modélisations, au stade 9, le transport via le réseau de microtubules légèrement biaisé est suffisant à polariser précisément l'ARNm *bicoid* et *oskar/Staufen* et à les concentrer à la jonction antéro-latérale et en croissant au pôle postérieur respectivement (Khuc Trong et al., 2015). Cependant, un autre niveau de régulation de la localisation de l'ARNm *bicoid* et d'*oskar/Staufen* s'ajoute à ce transport par un ancrage stable au cortex d'actine-F dont les mécanismes précis, présentés ci-dessous, présentent encore des zones d'ombre.

La nécessité de cet ancrage repose sur deux éléments interconnectés. D'abord, le réseau de microtubules permettant le transport des déterminants est à nouveau modifié au stade 10, si bien que l'état d'équilibre démontré par les travaux de modélisation de Khuc-Trong *et al* au stade 9 ne peut pas être maintenu (Theurkauf et al., 1992; Khuc Trong et al., 2015; Monteith et al., 2016; Quinlan, 2016). Ensuite, le cytoplasme de l'ovocyte est très dynamique, créant une instabilité suffisante à emporter les déterminants accumulés aux pôles s'ils ne sont pas ancrés [40] (Vanzo and Ephrussi, 2002; Forrest and Gavis, 2003; Weil et al., 2006; Hurd et al., 2016).

De façon intéressante, l'ancrage en lui-même ne semble pas polarisé et la polarité ne serait due qu'au transport. En effet, lorsqu'un transport anormal de l'ARNm *bicoid* ou d'*oskar/Staufen* est induit, tous deux peuvent s'ancrer ectopiquement dans n'importe quelle zone de la membrane de l'ovocyte (Ephrussi and Lehmann, 1992; Brendza et al., 2000; Benton et al., 2002; Cha et al., 2002; Vanzo and Ephrussi, 2002; Riechmann and Ephrussi, 2004; Trovisco et al., 2016). De même, certaines protéines associées au réseau d'actine-F et impliquées dans l'ancrage d'*oskar/Staufen*, comme la Myosine V, sont distribuées de manière homogène sur tout le cortex de l'ovocyte (Babu et al., 2004; Krauss et al., 2009; Suyama et al., 2009; Lu et al., 2020).

40 – Dès la mise en place du réseau cortical de microtubules, des courants cytoplasmiques sont générés dans l'ovocyte par le déplacement des moteurs moléculaires (Theurkauf et al., 1992; Palacios and St Johnston, 2002) et s'intensifient à mesure que l'ovocyte mature. Cette dynamique est indispensable au mélange des nouveaux éléments apportés depuis les cellules nourricières avec ceux du cytoplasme de l'ovocyte (Quinlan, 2016).

1.4.2. ... pas de déterminants ... pas de déterminants

L'ARNm *bicoid* subit une relocalisation pour passer d'une accumulation sous forme d'un anneau couvrant la jonction antéro-latérale du stade 9 au stade 10a à un disque à partir du stade 10b (St Johnston et al., 1989; Weil et al., 2006). Lors de ces deux

phases, l'ARNm est stable à la membrane, suggérant qu'il y soit maintenu physiquement (Trovisco et al., 2016). Si les intermédiaires impliqués dans la première phase ancrage n'ont pas été identifiés, la seconde requiert le réseau d'actine-F corticale, formant des projections près desquelles *bicoid* s'accumule (Weil et al., 2010).

Pour l'ARNm *oskar*, les modalités d'ancrage sont un peu mieux connues et impliquent aussi un réseau d'actine-F corticale intègre (Cha et al., 2002; Jankovics et al., 2002). Dès son arrivée au pôle postérieur, il est traduit en deux isoformes à partir du même ARNm (Markussen et al., 1995). La forme longue d'Oskar s'associe au cortex, possiblement via son interaction directe avec le réseau d'actine-F (Hurd et al., 2016), et est nécessaire à l'ancrage de son propre ARNm et de son autre isoforme, plus courte, impliquée dans le recrutement des autres composants du plasme germinatif (voir [34]) (Vanzo and Ephrussi, 2002).

Bien que non polarisé comme expliqué ci-dessus (voir 1.4.1), l'ancrage de l'ARNm *oskar* présente un autre niveau de contrôle uniquement possible au pôle postérieur car dépendant de Par-1. En plus de son rôle dans la mise en place d'un réseau correct de microtubules et dans le transport polarisé de l'ARNm *oskar* présenté plus haut (voir 1.3.2), il a été démontré que Par-1 phosphoryle Oskar (Riechmann et al., 2002; Morais-de-Sá et al., 2013). Dans un premier temps décrite comme stabilisatrice (Riechmann et al., 2002), il semblerait au contraire que cette modification induise l'adressage de l'isoforme courte dans une voie de dégradation (Morais-de-Sá et al., 2013). Étant donné que cette forme d'Oskar est traduite en plus grande quantité que la forme longue (Markussen et al., 1995), cette régulation pourrait être importante pour maintenir un ratio équilibré des deux isoformes et éviter des défauts d'ancrage (Morais-de-Sá et al., 2013).

En accord avec cette hypothèse, la zone d'ancrage d'*oskar* est une structure dynamique s'adaptant à la quantité de déterminant par une boucle d'amplification impliquant Par-1, Oskar et l'actine-F. Par-1 est accumulé de façon dépendante du cortex d'actine-F au pôle postérieur, permettant la polarisation du réseau de microtubules et le transport du déterminant. En retour, Oskar induit un nouveau recrutement de Par-1 (Shulman et al., 2000; Riechmann et al., 2002; Zimyanin et al., 2007) ainsi que la formation de projections d'actine-F corticale, sur lesquels il s'accumule par ancrage (Vanzo et al., 2007; Tanaka and Nakamura, 2011; Hurd et al., 2016). Ceci a été proposé comme permettant la formation d'une structure suffisante à ancrer assez d'ARNm *oskar* et de composants du plasme germinatif pour le développement correct de l'embryon (Ephrussi and Lehmann, 1992). Dans ce modèle, une inconnue persiste sur les conséquences du recrutement de Par-1 supplémentaire par Oskar. Au moment de ces études, Par-1 était pensé comme recrutant et stabilisant les extrémités plus des microtubules pour polariser le réseau cortical (Shulman et al., 2000; Tomancak et al., 2000). Ainsi, cette seconde accumulation de Par-1 était proposée comme augmentant la polarisation du réseau, ce qui permettait à Oskar de stimuler son propre transport (Zimyanin et al., 2007). Or les dernières avancées ont

démontré que Par-1 empêchait en fait l'ancrage des extrémités moins au cortex (Nashchekin et al., 2016), remettant en question ce modèle et laissant ouverte des hypothèses d'un rôle de ce recrutement supplémentaire de Par-1 dans l'ancrage d'Oskar ou dans l'organisation de la zone.

2. Le lien mystérieux entre les CFP et l'ovocyte

Au cœur de cette série d'évènements persiste un grand mystère : la nature de l'information envoyée par les CFP à l'ovocyte et ses conséquences exactes. Coïncidant temporellement avec la fin de leur différenciation, le premier effet identifié de ce signal dans l'ovocyte est la bi-phosphorylation activatrice de la Myosine II induisant l'ancrage de Par-1 au cortex (Doerflinger et al., 2006, 2022). Ce réarrangement est responsable de la mise en place du réseau cortical de microtubules mais pas de la libération du noyau pour la mise en place de l'axe dorso-ventral (Zhao et al., 2012).

Initiée par les signalisations Salvador-Warts-Hippo et Delta/Notch, la différenciation correcte des CFP en réponse aux voies JAK-STAT et Gurken/EGFR est nécessaire à la polarisation de l'ovocyte (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998a; Xi et al., 2003; Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007). Mais à ce jour, les études menées dans le but de trouver une cible transcriptionnelle commune aux voies JAK-STAT et Gurken/EGFR n'ont pas permis de mettre en avant un acteur unique impliqué dans cette communication. Elles ont cependant révélé des indices pointant l'importance de la polarisation des CFP puisqu'une perturbation du réseau d'actine-F corticale (Sun et al., 2011) ou de l'interaction des cellules folliculaires avec leur matrice extracellulaire (Deng and Ruohola-Baker, 2000; Frydman and Spradling, 2001; Poulton and Deng, 2006) mènent à des défauts de localisation d'*oskar*/Staufen. Il a été proposé que cette polarisation serait requise pour orienter la sécrétion d'un signal encore inconnu vers l'ovocyte.

De façon intéressante, ces études suggèrent que chaque cellule folliculaire postérieure stimule l'accumulation et l'ancrage d'*oskar*/Staufen juste en face d'elle dans l'ovocyte par l'observation de pôles postérieurs mosaïques présentant à la fois des cellules sauvages, en face desquelles *oskar*/Staufen est présent, et des cellules affectées dans leur polarité et incapable de le recruter (Frydman and Spradling, 2001; Poulton and Deng, 2006; Sun et al., 2011). Indépendamment, ce type de phénotype a aussi été observé en face de CFP mutantes pour des acteurs de la voie JAK-STAT sans qu'un lien avec leur polarisation n'ait été démontré (Xi et al., 2003). Si ces observations laissent penser que chaque cellule folliculaire postérieure stimulerait, en face d'elle, l'accumulation d'un intermédiaire, comme la Myosine II bi-phosphorylée et Par-1, ou la formation d'une structure à la membrane de l'ovocyte, impliquant l'actine-F par exemple, le lien direct reste encore à démontrer.

CONCLUSION

Commençant dès la sélection de l'ovocyte dans le germarium, la mise en place de la polarité antéro-postérieure du futur embryon est un processus long et complexe dont la séquence d'évènements est de mieux en mieux connue, même si persistent des zones d'ombre. En particulier, la nature du lien entre les CFP et l'ovocyte reste un mystère particulièrement attrayant. Dépendante de la différenciation des CFP en réponse aux voies Gurken/EGFR et JAK-STAT, cette communication est difficile à étudier car la perturbation de ces voies modifie la nature de ces cellules folliculaires par de nombreux aspects (polarité, morphologie ...). Ainsi, il est compliqué d'identifier des cibles directement impliquées dans la polarisation de l'ovocyte.

De même, la temporalité de cette communication reste incertaine : la contribution des CFP est-elle uniquement l'envoi d'un signal ponctuel au stade 6 de l'ovogenèse, marquant le point de départ d'une série de processus dans l'ovocyte nécessaire à la mise en place du transport et de l'ancrage d'*oskar*/Staufen ? Ou l'interaction de ces cellules folliculaires avec l'ovocyte jouerait-elle encore un rôle après ce stade pour la mise en place ou le maintien de la polarité antéro-postérieure ?

PROJET DE THÈSE

La précédente introduction a permis d'aborder dans un premier temps l'importance de poursuivre l'étude de la voie de signalisation JAK-STAT pour approfondir les connaissances actuelles sur les conséquences et régulations de son activité. De plus, j'espère vous avoir convaincu de la pertinence de l'utilisation du modèle drosophile pour investiguer cette signalisation, du fait de sa conservation moléculaire et fonctionnelle.

Mon projet de thèse avait pour but d'étudier la régulation de la voie JAK-STAT en utilisant comme système l'ovaire de drosophile et les multiples processus qu'elle y contrôle.

Mon équipe d'accueil est à l'origine de la majorité des recherches sur l'apoptose des cellules polaires, de son identification jusqu'aux implications de la voie JAK-STAT dans ce processus (Besse and Pret, 2003; Khammari et al., 2011; Borensztein et al., 2013; Torres et al., 2017). À mon arrivée en thèse, l'équipe venait de décrire le processus de monosis et avait poursuivi cette étude en réalisant un crible afin d'identifier des cibles et/ou des régulateurs de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire impliqués dans ce processus.

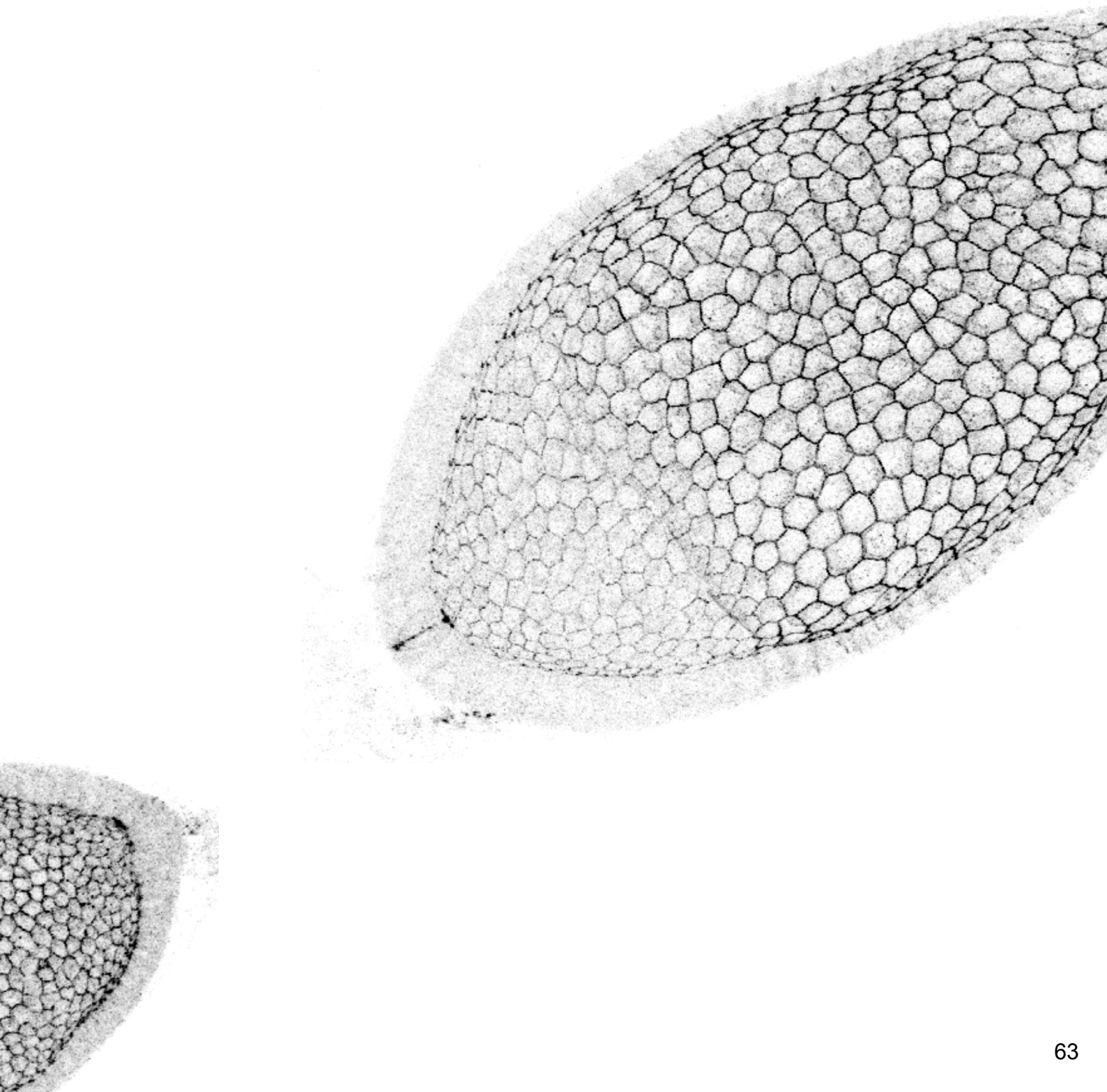
J'ai rejoint l'équipe avec pour objectif de confirmer un des candidats régulateurs, la E-Cadhérine. Ce choix était motivé par la conservation moléculaire et fonctionnelle de cette protéine entre vertébrés et drosophile, suggérant que les résultats de cette étude pourrait trouver un écho dans d'autres modèles (Halbleib and Nelson, 2006). J'ai pour cela commencé par confirmer le rôle de régulateur de la E-Cadhérine sur la voie JAK-STAT puis, avec l'aide d'autres membres de l'équipe, Fabienne Chalvet et Sophie Netter, j'ai poursuivi cette étude en caractérisant son mode d'action. Au cours de ce projet, je me suis efforcée de caractériser le plus précisément possible l'évolution du patron d'activation de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire au cours de l'ovogenèse en contexte sauvage afin d'interpréter au mieux les phénotypes observés lors d'une perturbation de l'expression de *shotgun*, le gène codant la E-Cadhérine chez la drosophile. D'après la littérature, le patron d'activation de la voie JAK-STAT, gouverné par la position des cellules polaires et l'élongation du follicule, serait symétrique entre les pôles antérieur et postérieur (Xi et al., 2003). Mes études m'ont permis d'observer que ce modèle proposé ne reflète pas la réalité et qu'une asymétrie d'activité de la voie JAK-STAT se met progressivement en place entre les deux pôles au cours de l'ovogenèse. De plus, j'ai pu démontrer que cette dynamique est un exemple physiologique de la régulation de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine que nous avons décrite. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article qui est publié, constituant la première partie de mes résultats présentés dans ce manuscrit.

Ces précisions quant au patron d'activation de la voie JAK-STAT m'ont permis d'identifier que la mise en place de l'asymétrie coïncide temporellement avec la fin de la différenciation des CFP, suggérant que ces deux évènements pourraient être liés. Or, comme présenté en introduction, le rôle précis de ces cellules dans la mise en place de la polarité antéro-postérieure de l'ovocyte reste encore à déterminer, et ces observations m'ont poussée à développer un second projet en parallèle.

En me concentrant sur le pôle postérieur, j'ai poursuivi l'étude de la modification du gradient d'activité de la voie JAK-STAT et identifié le mécanisme précis menant à cette dynamique. J'ai également nouvellement identifié un rôle de la voie JAK-STAT dans la différenciation d'une population de cellules qui n'avait encore jamais été décrite. En parallèle, j'ai effectué une analyse spatio-temporelle précise de la taille et de la morphologie de la zone d'accumulation du déterminant *oskar* au pôle postérieur de l'ovocyte en contexte sauvage, via la détection de Staufén. J'ai ainsi pu démontrer un lien direct entre la nouvelle population de cellules folliculaires identifiées et l'ancrage d'*oskar*/Staufén dans l'ovocyte, notamment par l'identification de nouvelles cibles de la voie JAK-STAT. Agrémentées par les données de la littérature actuelle, ces conclusions m'ont permis de proposer un nouveau modèle des évènements se déroulant entre la différenciation des CFP au stade 6 et l'ancrage d'*oskar*/Staufén au pôle postérieur entre les stades 8 et 10. Ce travail va faire l'objet d'une autre publication, dont le manuscrit constitue la seconde partie des résultats ci-après, complété par quelques résultats préliminaires présentés à la suite.

RÉSULTATS

PARTIE 1



E-Cadhérine (immunomarquage) dans l'épithélium folliculaire.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Jose Maria Carvajal-Gonzalez,
University of Extremadura, Spain

REVIEWED BY

Michelle Starz-Gaiano,
University of Maryland, United States
Eyal Schejter,
Weizmann Institute of Science, Israel

*CORRESPONDENCE

Marianne Malartre,
marianne.malartre@universite-paris-
saclay.fr

†PRESENT ADDRESS

Alba Yurani Torres,
Molecular, Cellular, and Developmental
Biology Department, University of
California, Santa Barbara, CA,
United States

†These authors have contributed equally
to this work

‡These authors share the last authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Signaling,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

RECEIVED 28 February 2022

ACCEPTED 14 July 2022

PUBLISHED 23 August 2022

CITATION

Mallart C, Chalvet F, Netter S, Torres AY,
Poidevin M, Montagne J, Pret A-M and
Malartre M (2022), E-cadherin acts as a
positive regulator of the JAK-STAT
signaling pathway during
Drosophila oogenesis.
Front. Cell Dev. Biol. 10:886312.
doi: 10.3389/fcell.2022.886312

COPYRIGHT

© 2022 Mallart, Chalvet, Netter, Torres,
Poidevin, Montagne, Pret and Malartre.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

E-cadherin acts as a positive regulator of the JAK-STAT signaling pathway during *Drosophila* oogenesis

Charlotte Mallart¹, Fabienne Chalvet^{1†}, Sophie Netter^{2‡},
Alba Yurani Torres^{1†}, Mickael Poidevin¹, Jacques Montagne¹,
Anne-Marie Pret^{2‡} and Marianne Malartre^{1*‡}

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France, ²Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UVSQ, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

The JAK-STAT pathway is evolutionary conserved. The simplicity of this signaling in *Drosophila*, due to the limited redundancy between pathway components, makes it an ideal model for investigation. In the *Drosophila* follicular epithelium, highly stereotyped functions of JAK-STAT signaling have been well characterized, but how signaling activity is regulated precisely to allow the different outcomes is not well understood. In this tissue, the ligand is secreted by the polar cells positioned at each follicle extremity, thus generating a gradient of JAK-STAT activity in adjacent cells. One way to control the delivered quantity of ligand is by regulating the number of polar cells, which is reduced by apoptosis to exactly two at each pole by mid-oogenesis. Hence, JAK-STAT activity is described as symmetrical between follicle anterior and posterior regions. Here, we show that JAK-STAT signaling activity is actually highly dynamic, resulting in asymmetry between poles by mid-oogenesis. Interestingly, we found similar temporal dynamics at follicle poles in the accumulation of the adherens junction E-cadherin protein. Remarkably, E-cadherin and JAK-STAT signaling not only display patterning overlaps but also share functions during oogenesis. In particular, we show that E-cadherin, like JAK-STAT signaling, regulates polar cell apoptosis non-cell-autonomously from follicle cells. Finally, our work reveals that E-cadherin is required for optimal JAK-STAT activity throughout oogenesis and that E-cadherin and Stat92E, the transcription factor of the pathway, form part of a physical complex in follicle cells. Taken together, our study establishes E-cadherin as a new positive regulator of JAK-STAT signaling during oogenesis.

KEYWORDS

JAK-STAT, signaling, oogenesis, E-cadherin, morphogenesis, apoptosis

Abbreviations: AJ, adherens junction; BC, border cell; GC, germ cell; FC, follicle cell; PC, polar cell; *shg*, *shotgun*; *upd*, *unpaired*; *hop*, *hopscotch*; *fru*, *fruitless*; *nos*, *nanos*; *tj*, *traffic jam*; *mirr*, *mirror*; *baz*, *bazooka*.

Introduction

JAK/STAT signaling has been highly conserved throughout evolution both structurally and functionally (Arbouzova and Zeidler, 2006). In *Drosophila*, the JAK-STAT pathway is activated upon binding of one of the three Unpaired ligands (Upd1, 2, or 3) to the unique Domeless (Dome) receptor. Following activation of the dimerized receptor, its associated kinase JAK (encoded by *hopscotch*, *hop*) phosphorylates the only STAT member (encoded by *Stat92E*), which is translocated to the nucleus to regulate target gene expression (Chen et al., 2014). Throughout oogenesis, JAK-STAT signaling plays multiple roles, requiring strict spatial and temporal regulation of its activity (Baksa et al., 2002; Beccari et al., 2002; Xi et al., 2003; Borensztein et al., 2013). Ovarian follicles consist of a germline cyst made up of one oocyte and 15 nurse cells surrounded by a follicular monolayered epithelium. They are organized into ovarioles, which are strings of follicles progressively maturing from anterior to posterior, each connected by interfollicular stalks (Figure 1A). *upd1* (or *upd*) expression is restricted to a select group of somatic cells, polar cells (PCs), present within the follicular epithelium at anterior–posterior follicle poles (McGregor et al., 2002). Strict control of PC number, and, thus, the amount of Upd ligand, is important for JAK-STAT signaling regulation. Poles of young follicles contain groups of 3–6 PCs, and apoptosis of the supernumerary cells reduces this number to exactly 2 by stage 5 of oogenesis (Besse and Pret, 2003; Khammari et al., 2011). In this way, there is sufficient Upd early on to fulfill the JAK-STAT signaling role in interfollicular stalk formation, while by stage 7, the amount of Upd is calibrated to generate a morphogen gradient at both poles (Besse and Pret, 2003; Borensztein et al., 2013). Consequently, three adjacent somatic cell types, border cells (BCs), stretch cells, and centripetal cells, are specified at the anterior pole, while posterior cells adopt a different fate due to the combined outputs of JAK-STAT and EGFR signaling (Xi et al., 2003; Fregoso Lomas et al., 2016; Stevens et al., 2020).

Several other processes participate in the regulation of JAK-STAT signaling in follicle cells (FCs), including Upd exocytosis and glypican-mediated diffusion between follicle and germ cells (Hayashi et al., 2012; Saadin and Starz-Gaiano, 2016), and receptor endocytosis (Devergne et al., 2007). However, only few JAK-STAT signaling regulators have been identified so far. For instance, the known repressor Socs36E, together with two transcriptional regulators (apontic and slow border cells) and *mir279* participate in the precise specification of the anterior FC fates by setting up a complex genetic circuitry acting on *Stat92E* and *Dome* (Starz-Gaiano et al., 2008; Yoon et al., 2011; Monahan and Starz-Gaiano, 2013).

As there are exactly two PCs at each follicle pole from stage 5 (Besse and Pret, 2003), these being the only source of the Upd ligand, it is understandable that JAK-STAT activity has been considered to be symmetric between anterior and posterior poles

(Denef and Schüpbach, 2003; Xi et al., 2003; Hayashi et al., 2012). Some asymmetry in JAK-STAT activity has been observed between FCs located around anterior PC groups at the cell level (Manning et al., 2015), but no asymmetry has been reported at the tissue level. Here, we revisited JAK-STAT signaling pathway activity and regulation during oogenesis by using a *Stat92E* transcriptional reporter, and we observed that signaling was more dynamic than previously described. In particular, we report that JAK-STAT signaling becomes asymmetric by mid-oogenesis, with a higher activity being detected at the anterior compared to posterior poles. Interestingly, we show that the adherens junction (AJ) component Epithelial Cadherin (E-cadherin), which is involved in the formation and maintenance of epithelial structures, is also found with higher levels at the anterior follicles, leading to an asymmetry between anterior and posterior poles becoming visible at mid-oogenesis. This, together with the fact that both E-cadherin and JAK-STAT signaling are required for several morphogenesis events, including PC apoptosis as we show here, prompted us to investigate whether E-cadherin could be a regulator of JAK-STAT signaling. A key feature of AJs is their plasticity, which enables tissue remodeling. Hence, the role of E-cadherin in morphogenesis has been extensively studied in numerous tissues and models (Pannekoek et al., 2019). However, much less is known about E-cadherin acting as a regulator of cell signaling. Our novel findings demonstrate that E-cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling throughout oogenesis. Finally, we found that E-cadherin and *Stat92E* form part of the same complex in FCs, which suggests that the regulation exerted by E-cadherin on JAK-STAT signaling could be achieved by localizing *Stat92E* in a permissive sub-membrane domain for efficient signaling.

Materials and methods

Fly stocks and genetics

The following stocks were used: *10XSTAT92E-GFP* (gift from E. Bach, Bach et al., 2007), *UAS-dome-GFP* (gift from C. Ghigliione), *shg-lacZ* (gift from JP. Vincent), *UAS-Stat92E-GFP* (gift from C. Janke); *fru-Gal4* (Borensztein et al., 2013), *tj-Gal4* (gift from V. Mirouse), *nos-Gal4* (gift from A. Boivin), *upd-Gal4* (Khammari et al., 2011), *shg::GFP* (gift from Yang Hong); RNAi strains are from BDSC: *UAS-shgRNAi* (#38207, #32904, named #2 and #3, respectively, in the text), and VDRC: *UAS-shgRNAi* (#27082, named #1 in the text), *UAS-updRNAi* (#3282), *UAS-hopRNAi* (#102830); and *w¹¹¹⁸* (#3605), Canton S (#1), *UAS-shgS* (#65589) and *tub-Gal80^{TS}* (#7016) are from BDSC. *10XSTAT92E-GFP* and *shg-lacZ* were maintained at 25°C. All crosses using the Gal4-UAS system were performed at 25°C, or at 18°C when *tub-Gal80^{TS}* was used (with *fru-Gal4* and *tj-Gal4* lines),

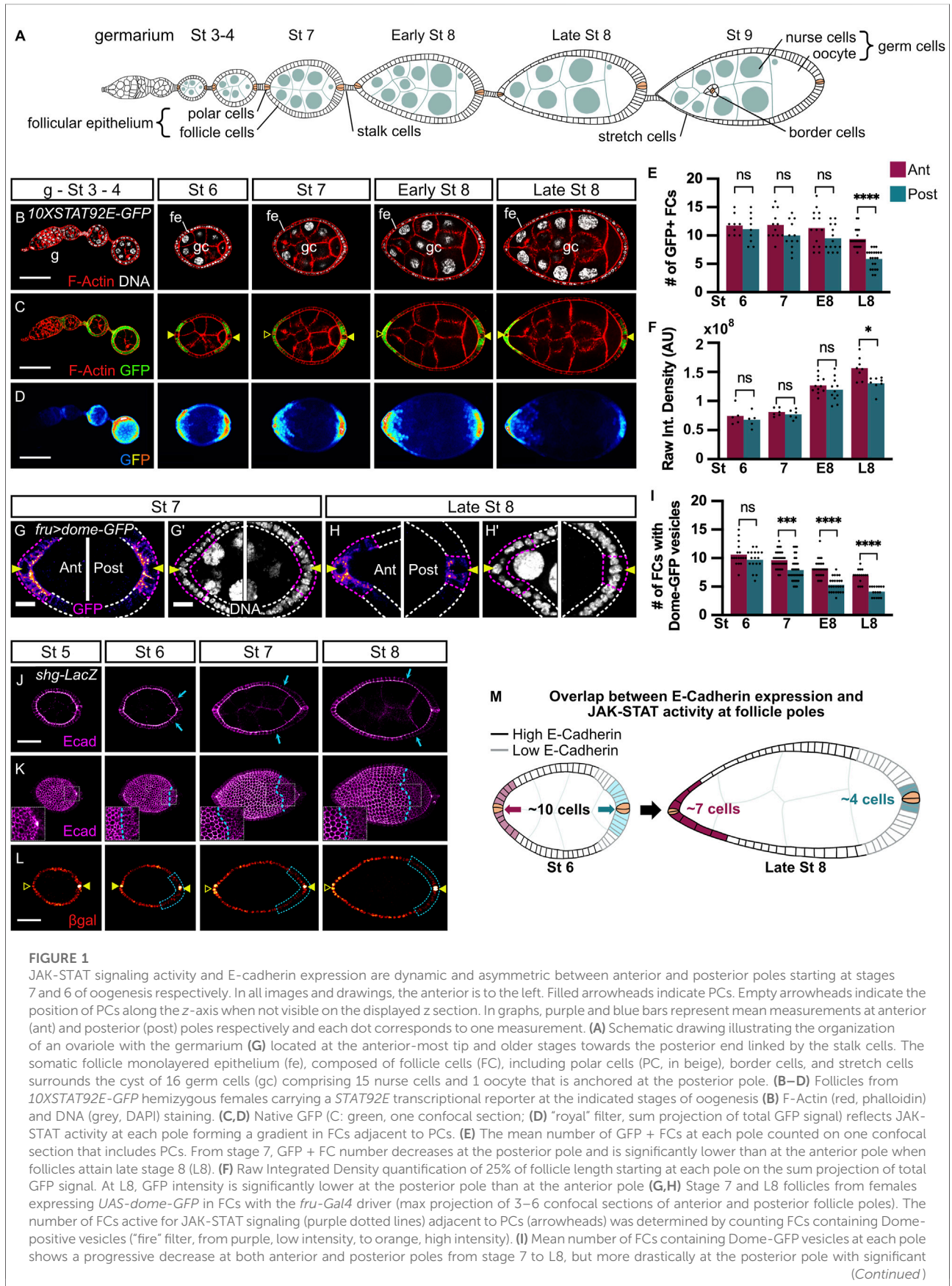


FIGURE 1

JAK-STAT signaling activity and E-cadherin expression are dynamic and asymmetric between anterior and posterior poles starting at stages 7 and 6 of oogenesis respectively. In all images and drawings, the anterior is to the left. Filled arrowheads indicate PCs. Empty arrowheads indicate the position of PCs along the z-axis when not visible on the displayed z section. In graphs, purple and blue bars represent mean measurements at anterior (ant) and posterior (post) poles respectively and each dot corresponds to one measurement. **(A)** Schematic drawing illustrating the organization of an ovariole with the germarium (**G**) located at the anterior-most tip and older stages towards the posterior end linked by the stalk cells. The somatic follicle monolayered epithelium (fe), composed of follicle cells (FC), including polar cells (PC, in beige), border cells, and stretch cells surrounds the cyst of 16 germ cells (gc) comprising 15 nurse cells and 1 oocyte that is anchored at the posterior pole. **(B–D)** Follicles from *10XSTAT92E-GFP* hemizygous females carrying a *STAT92E* transcriptional reporter at the indicated stages of oogenesis **(B)** F-Actin (red, phalloidin) and DNA (grey, DAPI) staining. **(C,D)** Native GFP **(C: green, one confocal section; (D) "royal" filter, sum projection of total GFP signal** reflects JAK-STAT activity at each pole forming a gradient in FCs adjacent to PCs. **(E)** The mean number of GFP + FCs at each pole counted on one confocal section that includes PCs. From stage 7, GFP + FC number decreases at the posterior pole and is significantly lower than at the anterior pole when follicles attain late stage 8 (L8). **(F)** Raw Integrated Density quantification of 25% of follicle length starting at each pole on the sum projection of total GFP signal. At L8, GFP intensity is significantly lower at the posterior pole than at the anterior pole **(G,H)** Stage 7 and L8 follicles from females expressing *UAS-dome-GFP* in FCs with the *fru-Gal4* driver (max projection of 3–6 confocal sections of anterior and posterior follicle poles). The number of FCs active for JAK-STAT signaling (purple dotted lines) adjacent to PCs (arrowheads) was determined by counting FCs containing Dome-positive vesicles ("fire" filter, from purple, low intensity, to orange, high intensity). **(I)** Mean number of FCs containing Dome-GFP vesicles at each pole shows a progressive decrease at both anterior and posterior poles from stage 7 to L8, but more drastically at the posterior pole with significant *(Continued)*

FIGURE 1

differences with the anterior pole at all stages. **(J–L)** Follicles at the indicated stages of oogenesis from *shotgun-LacZ* (*shg-LacZ*) homozygous females carrying a *shg* transcriptional reporter. **(J)** E-cadherin immunostaining (“magenta hot” filter, from magenta, low intensity, to white, high intensity) on a max projection of 3 confocal sections shows E-cadherin apico-lateral localization within the follicular epithelium, with a weaker intensity at the posterior pole from stage 6 (blue arrows show the border between high and low E-cadherin intensity). **(K)** 3D projections of E-cadherin immunostaining (“magenta hot” filter) of the same follicles as in **(J)** highlight the alveolus-like organization of E-cadherin in the follicular epithelium. E-cadherin protein is homogeneously distributed along the anterior–posterior axis up to stage 5 of oogenesis and then decreases at the posterior pole compared to the anterior pole from stage 6 (blue dotted lines indicate the border between high and low E-cadherin intensity). Insets on the posterior follicle poles are magnifications of the white dotted area. **(L)** Beta-galactosidase (β gal) immunostaining (“red hot” filter, from red, low intensity, to yellow, high intensity) on the same projection as in **(J)** shows FCs that express the *shg-LacZ* reporter reflecting the *shg* expression pattern at the transcriptional level. Like the E-cadherin protein, *shg* transcriptional activity between poles changes from homogeneous at stage 5 to lower at the posterior pole than at the anterior pole from stages 6–8 (blue dotted lines) in 100% of observed cases ($n = 70$). **(M)** Schematic drawing of stage 6 and late stage 8 follicles representing JAK-STAT signaling dynamics together with E-cadherin expression pattern in the follicular epithelium. Simplified JAK-STAT signaling dynamics at anterior (pink) and posterior (blue) poles (paler colors for lower signaling and darker colors to reflect high signaling) based on the observations shown in graph F for JAK-STAT signaling intensity, and in the graph I for the number of JAK-STAT active FCs. p Cs are indicated in beige. St: stage. E8: Early stage 8. L8: Late stage 8. ns: non-significative. Int.: Integrated. AU: Arbitrary Units. #: Number. Statistical tests: ordinary one-way ANOVAs. Stars indicate statistically significant differences. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Scale: **(B–D)** 50 μ m **(G–H)** 10 μ m. **(J–L)** 30 μ m n : number of stage 6, 7, and 8 follicles analyzed.

until transfer of pharate pupae to 29°C. Females were dissected at 3–4 days of age.

Immunostaining and native fluorescence

Ovary dissection and immunostaining were performed according to the work of Torres et al. (2017). For native GFP observation of *10XSTAT92E-GFP* females, ovaries were fixed in 4% formaldehyde, washed briefly 3x in PBS, 15 min in PBS-Triton 0.3%, incubated with DAPI and phalloidin for 30 min with agitation and rinsed 3x in PBS. Mounting was performed in Dabco (Sigma), and observations were carried out straightaway.

The following primary antibodies were used: rabbit anti-GFP (1:200, Interchim), rabbit anti-Stat92E (1:1000, D. Montell, used for PLA), rabbit anti-Stat92E (1:1000 S. Hou, used for immunostaining), and from DSHB: rat anti-E-cadherin (1:200), mouse anti- β -galactosidase (1:200), mouse anti-GFP (1:50), mouse anti-N-cadherin (1:200), and mouse anti-Fasciclin 3 (1:20). Secondary antibodies were all used at 1:200: anti-mouse Cy3 and anti-rat Alexa 647 (Jackson Laboratories), anti-rabbit Alexa 488, and anti-rat Alexa 647 (Thermo Fisher Scientific). Phalloidin (Sigma) and DAPI were used at 1:200 to label F-Actin and DNA, respectively.

Image processing and analysis

PC counting and BC migration were assessed using a Leica DMRB epifluorescence microscope. Confocal images were acquired with a Leica SP8 inverted microscope driven by Las-X software, using 63x or 40x oil immersion lenses. Quantifications on confocal stacks were performed using FIJI and annotated with Affinity Designer. For GFP + FC number, we used only one confocal section passing through the middle of each follicle (visible PCs) to have consistent data regarding cell

positions. For GFP quantification, total GFP signal sum projections were done. In Figure 1, measures correspond to “Raw Integrated Density” quantification of 25% follicle length at poles, whereas in Figure 3 and Supplementary Figure S4, they correspond to “Mean Grey Value” quantification of the entire follicle. All statistical analyses were performed using GraphPad PRISM.

RT-qPCR

RT-qPCR was performed on 20 pairs of ovaries, as previously described (Parvy et al., 2012), using the following primers:

Mirror—5′-GAACACCGAGGATAACGATCTG-3′/5′-CGGTCATCATGTGCGCCAA-3′

H15—5′-GGTGAAGTTGACAAACAACGAG-3′/5′-TTGGGACTGCCGGGTAT-3′

mRNA amounts were normalized with RPL49 mRNA values, used as a reference.

Proximity ligation assay (PLA)

The Duolink PLA was performed according to the manufacturer’s instructions (Sigma-Aldrich), using mouse anti-GFP and rabbit anti-Stat92E (D. Montell) antibodies. During dissection, the muscular sheath was removed manually to allow penetration of the components in FCs, and Tween 0.1% was used instead of Triton 0.3% that we normally use for regular immunostaining.

Co-immunoprecipitation assays

Proteins were chemically cross-linked with DSP (Thermo Fisher Scientific) prior to cell lysis. Co-immunoprecipitation

assays were performed on ovary extracts from 50 females according to the manufacturer's procedure, using GFP magnetic agarose beads (Chromotek) or Dynabeads™ protein G (Invitrogen) coated with an anti-E-cadherin antibody with 10 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 0.05% NP40 and 0.5 mM EDTA or PBS-Triton 0.02% wash buffer respectively. Proteins were resolved on NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris gels (Invitrogen) and visualized by immunoblotting using mouse anti-GFP (1:1000; Roche) or rat anti-E-cadherin (1:250, DSHB) primary antibodies, and HRP anti-mouse (1:1000; Invitrogen) or anti-rat (1:5000; Sigma) secondary antibodies.

All experiments have been conducted between two and three times independently, and similar results were obtained in all cases.

Results

JAK-STAT signaling activity pattern is dynamic through oogenesis and becomes asymmetric between anterior and posterior follicle poles from stage 7 onward

In order to study JAK-STAT signaling regulation during oogenesis, we made use of a *10XSTAT92E-GFP* reporter, which drives the expression of GFP-encoding sequences in cells where the pathway is physiologically active (Bach et al., 2007). We observed that JAK-STAT activity presents a gradient in FCs with the highest activity at each follicle pole as expected, but activity did not seem identical at all stages, with a striking difference between anterior and posterior poles from mid-oogenesis, suggesting that signaling activity is finely regulated (Figures 1B–D). It is of note that we only analyzed follicles up to stage 8 since, after this stage, the anterior JAK-STAT active BCs delaminate from the follicular epithelium and migrate through nurse cells towards the oocyte, rendering analyses more difficult. We quantified the reporter activity at each pole between stages 4 and 8 using two complementary approaches: the first by determining the mean numbers of GFP-positive (GFP+) cells (Figure 1E), and the second by quantifying GFP intensities (Figure 1F). During follicle maturation, the mean GFP + FC number indicates a small reduction of the JAK-STAT gradient size at the anterior pole over time. The same tendency of fewer GFP + FCs is observed at the posterior pole from stage 7, which becomes statistically significant and more important than at the anterior pole at late stage 8, thus establishing an asymmetry in JAK-STAT signaling between poles (Figure 1E). In addition, while the gradient size decreases, there is an increase in signaling intensity at both poles between stages 7 and 8, but signaling intensity was significantly lower at the posterior pole (Figure 1F). Both techniques thus confirmed that JAK-STAT signaling activity is symmetrical at both poles up to stage 7 but

becomes asymmetrical at stage 8. Our results, therefore, uncover an asymmetry of JAK-STAT signaling in the number and intensity of active cells between anterior and posterior poles.

To verify this result, we tested another readout for JAK-STAT signaling. While in some cases the JAK-STAT receptor is active when it is localized at the plasma membrane (Blouin et al., 2016), receptor endocytosis can sometimes be a requirement for signaling activity (Marchetti et al., 2006). In all cases, receptor endocytosis reflects active transduction. In the follicular epithelium, the accumulation of Dome-GFP vesicles has been described as an indicator of efficient endocytosis, thus being an indicator of JAK-STAT activity (Silver et al., 2005; Devergne et al., 2007; Sahu et al., 2017). We expressed a GFP-fused form of Dome in all FCs with the *fruitless-Gal4* (*fru-Gal4*) driver (Supplementary Figure S1A for driver pattern) and assessed JAK-STAT signaling by counting the number of cells containing Dome-positive vesicles (Figures 1G–I). A progressive decrease in mean numbers of FCs containing Dome vesicles is observed at both poles, confirming that JAK-STAT gradient size decreases with time. Consistently with our previous results, the decrease is smaller at the anterior pole than at the posterior pole, creating an asymmetry in JAK-STAT signaling between poles. There is a slight lag between the translation of the signaling asymmetry into a visible output between the two reporters, the asymmetry being visible with Dome endocytosis from stage 7 and with *10XSTAT92E-GFP* from stage 8, reflecting an expected difference in the kinetics between these two types of reporters.

Taken together, and as schematized in Figure 1M, our findings demonstrate that, although anterior and posterior follicle poles display similar levels of JAK-STAT signaling activity up to stage 6, fewer posterior than anterior FCs are active as of stage 7. This creates an asymmetry between poles in the JAK-STAT signaling gradient size and intensity that must be precisely regulated.

E-cadherin expression pattern is dynamic through oogenesis and becomes asymmetric between anterior and posterior follicle poles from stage 6 onward

Upd, secreted from PCs at each follicle pole, activates the JAK-STAT pathway in surrounding FCs. At stage 7, when we showed signaling becomes asymmetric, PCs have reached their final number of two at each pole. Hence, the asymmetry in JAK-STAT signaling activity cannot be explained by a difference in the number of ligand secreting cells. Rather, we hypothesized that a regulator could be acting within the follicular epithelium to control JAK-STAT signaling activity. In that case, the regulator should display similar dynamics in its expression, with an asymmetry between poles from stage 7 or slightly

earlier to allow time for the JAK-STAT pathway to become asymmetric in response to its regulation. We tested several proteins that might respond to such criteria and found E-cadherin as a good candidate. During oogenesis, as reported previously (Godt and Tepass, 1998), E-cadherin is present in all follicle and germline cells, which can be observed with an E-cadherin immunostaining (Figures 1J,K). At the subcellular level, E-cadherin is detected differentially along the apico-basal axis: strong levels are observed at the apical membrane, where FCs not only interact together but also with germ cells (GCs), which represents an unusual E-Cadherin-mediated kind of adhesion as it occurs between different cell types (Godt and Tepass, 1998; González-Reyes and St Johnston, 1998), whereas lower levels are detected at the lateral AJs where FCs only interact with other FCs (Figure 1J). At the tissue level, although E-cadherin is distributed homogeneously along the anterior-posterior axis until stage 5, stronger accumulation is observed in anterior compared to posterior FCs, the difference being accentuated at stages 7 and 8, while follicle size is increasing (Figures 1J,K). This result shows that E-cadherin distribution in FCs becomes asymmetric between anterior and posterior follicle regions from stage 6.

To determine whether the asymmetric distribution of E-cadherin in FCs along the anterior-posterior axis is due to post-translational modifications, affecting for instance protein stability or recycling, or if asymmetry is rather regulated at the transcriptional level, we used a transcriptional reporter (*shotgun-lacZ*). In this line, β -galactosidase detection reflects the activity of regulatory sequences of *shotgun* (*shg*), the gene encoding the E-cadherin protein in *Drosophila*. We found homogenous expression of the *shg-lacZ* reporter in FCs until stage 5, which becomes differential between anterior and posterior regions at stage 6, except for expression in PCs that are maintained high at all stages (Figure 1L). This demonstrates that the E-cadherin asymmetry in FCs between anterior and posterior follicle regions being set at stage 6 is regulated at the transcriptional level.

Altogether our findings show that JAK-STAT activity and *shg* expression display similarities in their spatial and temporal dynamics in the follicular epithelium during oogenesis. Notably, by mid-oogenesis, both E-cadherin levels and JAK-STAT activity are high in the anterior follicles, while they are significantly lower in the posterior (Figure 1M), raising the hypothesis that they could be involved in similar processes.

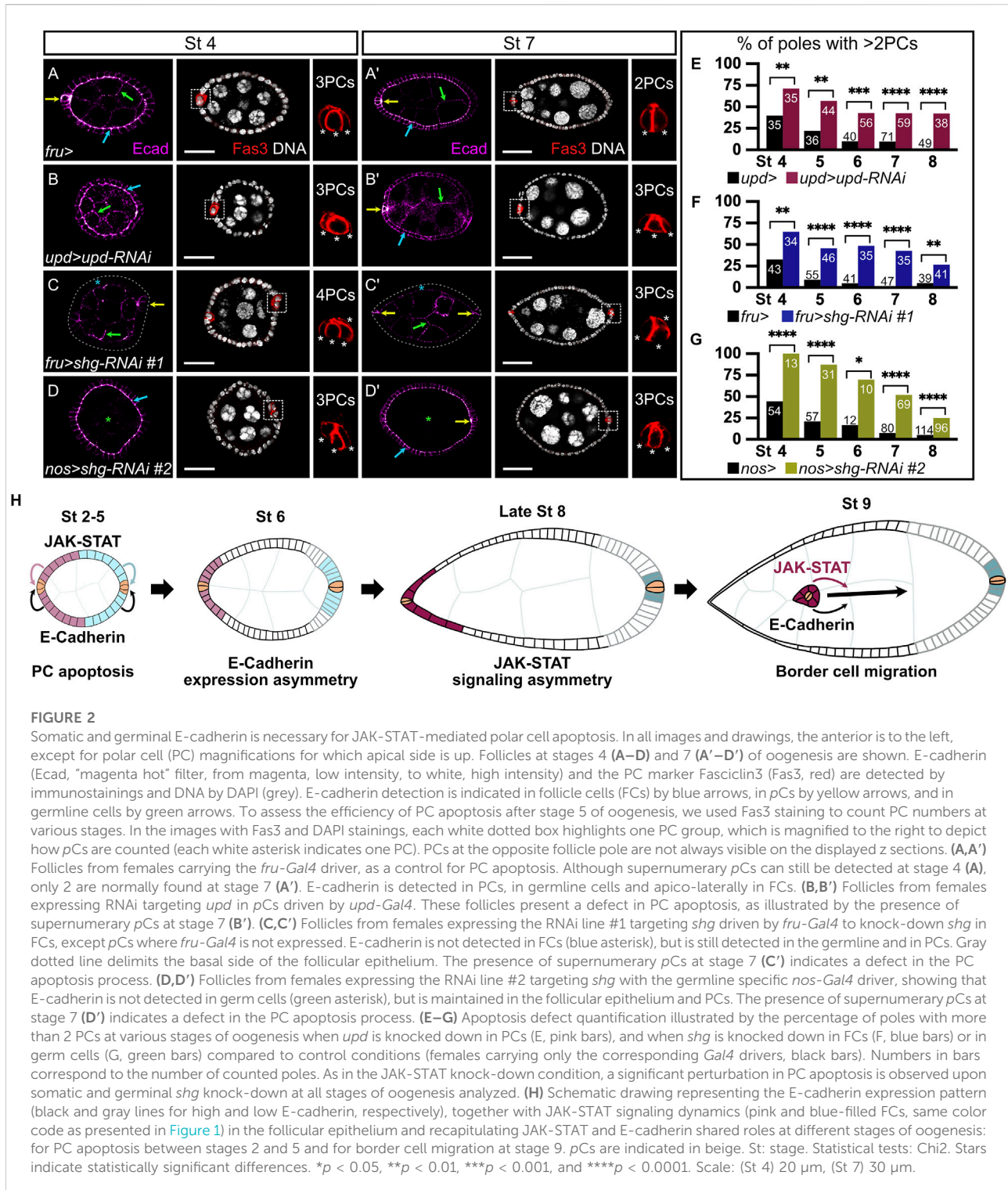
E-cadherin, like JAK-STAT signaling, is necessary for PC apoptosis

We, thus, wondered if E-cadherin and JAK-STAT signaling correlate in function during oogenesis. We investigated this hypothesis by using RNAi lines targeting *shg* and *upd*. To assess whether our tools were efficient, we first tested if we could observe known phenotypes associated with *shg* and *upd*

knock-downs with these RNAi lines. It has been independently shown that E-cadherin (Niewiadomska et al., 1999; Pacquelet and Rorth, 2005) and JAK-STAT signaling (Beccari et al., 2002; Silver et al., 2005) are involved in BC migration, a cellular process occurring between stage 9 and 10. In addition, a genetic interaction between *stat92E* and *shg* was reported in BC migration (Silver and Montell, 2001). We used the *upd-Gal4* driver to target RNAi against *upd* specifically in PCs (Supplementary Figure S1B for driver pattern), thus decreasing JAK-STAT signaling in FCs from stage 2 onward. We assessed BC migration in the resulting follicles at stage 10, when the migration process is complete in controls. 97% of follicles exhibit BC migration delay in an *upd* knock-down context (Supplementary Figure S2B,E). We next used two RNAi lines against *shg*, which we showed were efficient at decreasing E-cadherin levels in FCs (#1) or in GCs (#2) when driven with the *fru-Gal4* or the *nos-Gal4* lines respectively (Supplementary Figure S1A,B for driver patterns), as revealed by the absence of E-cadherin signal detection in the corresponding tissue (Supplementary Figure S2C,D). In both cases, we observed BC migration defects in more than 90% of stage 10 follicles (Supplementary Figure S2C–E). The RNAi tools with the Gal4 lines used are therefore efficient to affect JAK-STAT signaling and E-cadherin functions, leading to the expected BC migration delay phenotypes.

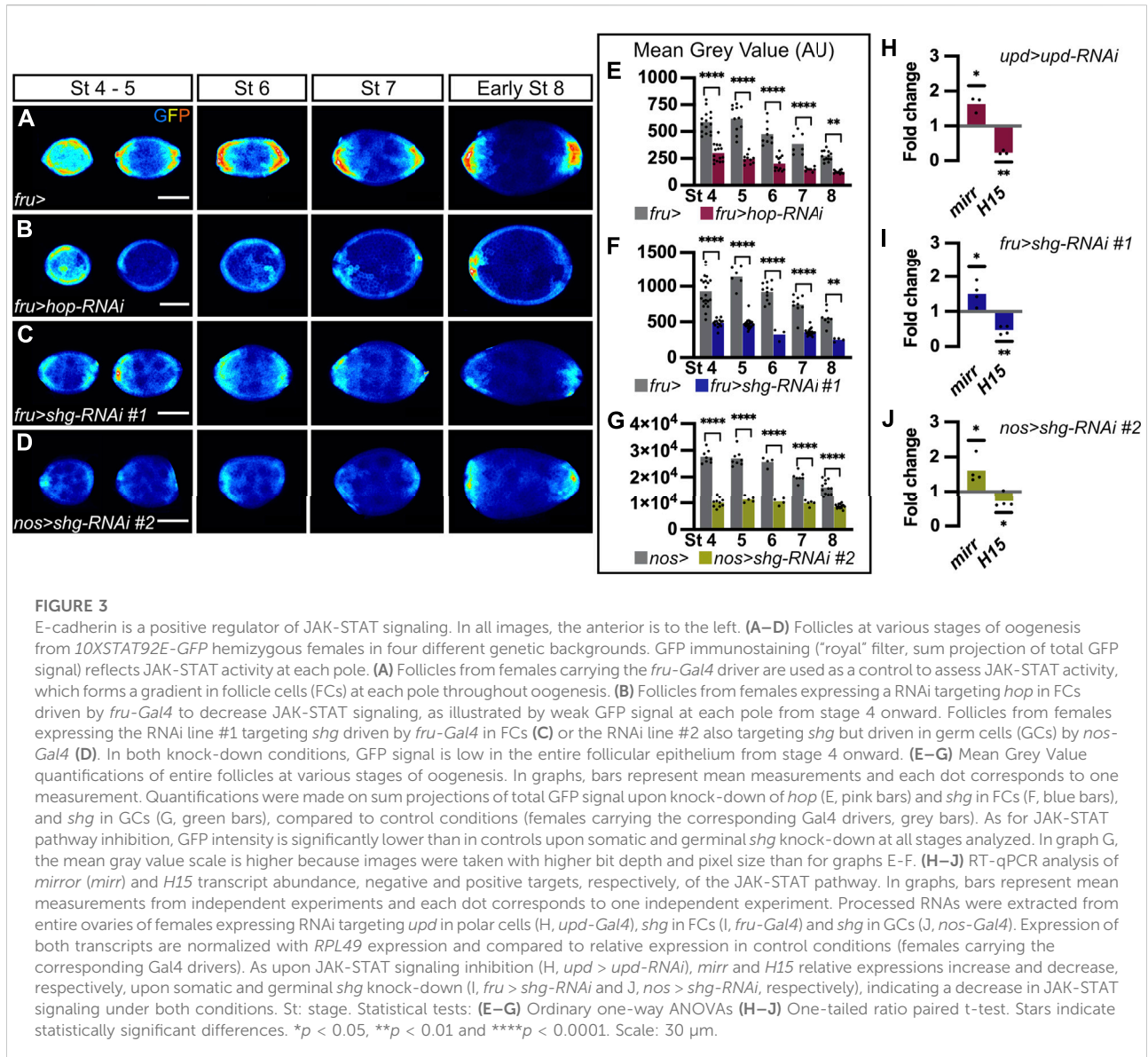
We, thus, used the same tools to investigate whether E-cadherin expression and JAK-STAT signaling are also involved in another common process during oogenesis. PC apoptosis takes place between stages 2 and 5 of oogenesis, resulting in only two PCs at each pole (Besse and Pret, 2003, Figure 2A). JAK-STAT signaling has been shown to regulate morphogenesis leading to PC apoptosis by monosis in a non-cell-autonomous manner (Borensztein et al., 2013; Torres et al., 2017, Figures 2B,E). We knocked down *shg* using the *fru-Gal4* driver, which results in the absence of E-cadherin staining in FCs, without disturbing epithelial integrity as N-cadherin is also expressed in FCs thereby ensuring the maintenance of the follicular epithelium even in the absence of E-cadherin (Supplementary Figure S3A,B). We then assessed whether completion of PC apoptosis occurred by counting the number of PCs at each pole from stages 4–8. An excess of PCs (>2 per group at stage 7) was observed in the *shg* knock-down, with a significant difference from the control at all stages, reflecting a defect in the apoptotic process (Figures 2C,F). Similar results were obtained using yet another RNAi line against *shg* (#3) with a second FC driver (*traffic jam-Gal4*, *tj-Gal4*) (Supplementary Figure S1D for driver pattern and Supplementary Figure S4A). E-Cadherin, like the JAK-STAT pathway, is therefore required non-cell-autonomously in FCs for correct PC apoptosis.

E-cadherin can be found apically in FCs, at the interface with GCs (FC-GC contact) and laterally, at the interface between FCs (at FC-FC AJs only). To gain more insight as to which FC interface is involved in PC apoptotic extrusion, we decreased



E-cadherin levels in GCs by knocking down *shg* from the germline with the RNAi line #2 driven by the *nos-Gal4* driver, which is expected to disturb junctions at the FC-GC interface. As with the somatic *shg* knock-down, epithelial integrity is maintained in the germline knock-down (Supplementary

Figure S3C), and extra PCs, indicative of apoptosis defects, are observed with significant differences at all stages compared to controls (Figures 2D,G). Our data thus show that decreasing E-cadherin in FCs or in GCs disturbs PC apoptosis in a non-cell-autonomous manner, similarly to decreasing JAK-STAT



pathway activity in the follicular epithelium. Hence, E-cadherin and JAK-STAT signaling are both involved in two distinct morphogenesis processes that occur at different stages of oogenesis, namely PC apoptotic extrusion and BC migration, as schematized in Figure 2H. Altogether, our data demonstrate that E-cadherin accumulation and JAK-STAT signaling partially overlap in dynamics and share functions during oogenesis.

E-cadherin regulates JAK-STAT activity positively in the follicular epithelium during oogenesis

As E-cadherin is distributed in a larger domain than the one covered by JAK-STAT activity, and given that E-cadherin

asymmetry between poles starts at stage 6, just before the asymmetry in JAK-STAT activity is visible, at stage 7, we wondered whether E-cadherin could be a general regulator of JAK-STAT signaling in the follicular epithelium. To test this hypothesis, we decreased E-cadherin levels by knocking down *shg* in FCs, in flies carrying the *10XSTAT92E-GFP* transcriptional reporter, which allows for the assessment of JAK-STAT activity levels. As a control, we first decreased JAK-STAT activity by targeting RNAi against *hop*, encoding the kinase of the pathway, in FCs. As expected, when *hop* was knocked down, the JAK-STAT pathway activity reporter was strongly reduced at all stages, compared to controls (Figures 3A,B). Mean GFP intensity was quantified on sum projections of total GFP in the whole follicular epithelium, and, accordingly, a significant decrease was found at all stages considered (Figure 3E). When

E-cadherin levels were decreased in FCs by knocking down *shg* (RNAi line #1), similar results were obtained, with the *10XSTAT92E-GFP* reporter activity being reduced in the whole epithelium and mean GFP intensity being significantly decreased at all stages analyzed as compared to controls (Figures 3C,F). We confirmed that knocking down *shg* in FCs results in reduced JAK-STAT activity by expressing the *shg* RNA line #3 with *tj-Gal4* (Supplementary Figure S1D for driver pattern and Supplementary Figures S4B–D).

As we found that E-cadherin is required in FCs and GCs to regulate PC apoptosis, we wondered if both FC and GC E-cadherin were also involved in the regulation of JAK-STAT signaling. We thus knocked down *shg* in the germline with the *nos-Gal4* driver. Again, we found the JAK-STAT transcriptional reporter activity reduced in the whole follicular epithelium, with mean GFP intensity being significantly decreased at all stages compared to control (Figures 3D,G). This suggests that E-cadherin is required at FC-FC and FC-GC interfaces to regulate JAK-STAT activity in the follicular epithelium. In summary, our findings, which were confirmed with three different RNAi lines and three different Gal4 drivers, demonstrate that *shg* expression is required in FCs and in GCs for proper JAK-STAT activity in the follicular epithelium, suggesting that E-cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling during oogenesis.

To confirm these findings by monitoring JAK-STAT pathway activity in a different way, we quantified the expression of JAK-STAT known target genes by RT-qPCR. *mirr* (*mirr*) is negatively regulated in response to JAK-STAT signaling (Xi et al., 2003), whereas *H15* is positively activated by the pathway (Fregoso Lomas et al., 2016). Accordingly, we found that *mirr* was upregulated and *H15* downregulated in ovarioles in which RNAi was used to knock-down *upd* in PCs, thus decreasing JAK-STAT signaling in the follicular epithelium (Figure 3H). When E-cadherin levels were decreased by knocking down *shg* in FCs or in GCs, similar *mirr* upregulation and *H15* downregulation were obtained (Figures 3I,J). Given that similar changes in the expression of JAK-STAT target genes are detected upon decreasing JAK-STAT signaling and E-cadherin levels, this further confirm that E-cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling during oogenesis.

E-cadherin and Stat92E are part of a physical complex in the follicular epithelium during oogenesis

The importance of Stat92E localization for efficient signaling activity has been shown in the embryo ectoderm epithelium, where its apical localization is ensured by interaction with the polarity protein Bazooka (Baz), a *Drosophila* Par3 homolog (Sotillos et al., 2008). To find out if the apical localization of Stat92E is conserved in ovaries, we

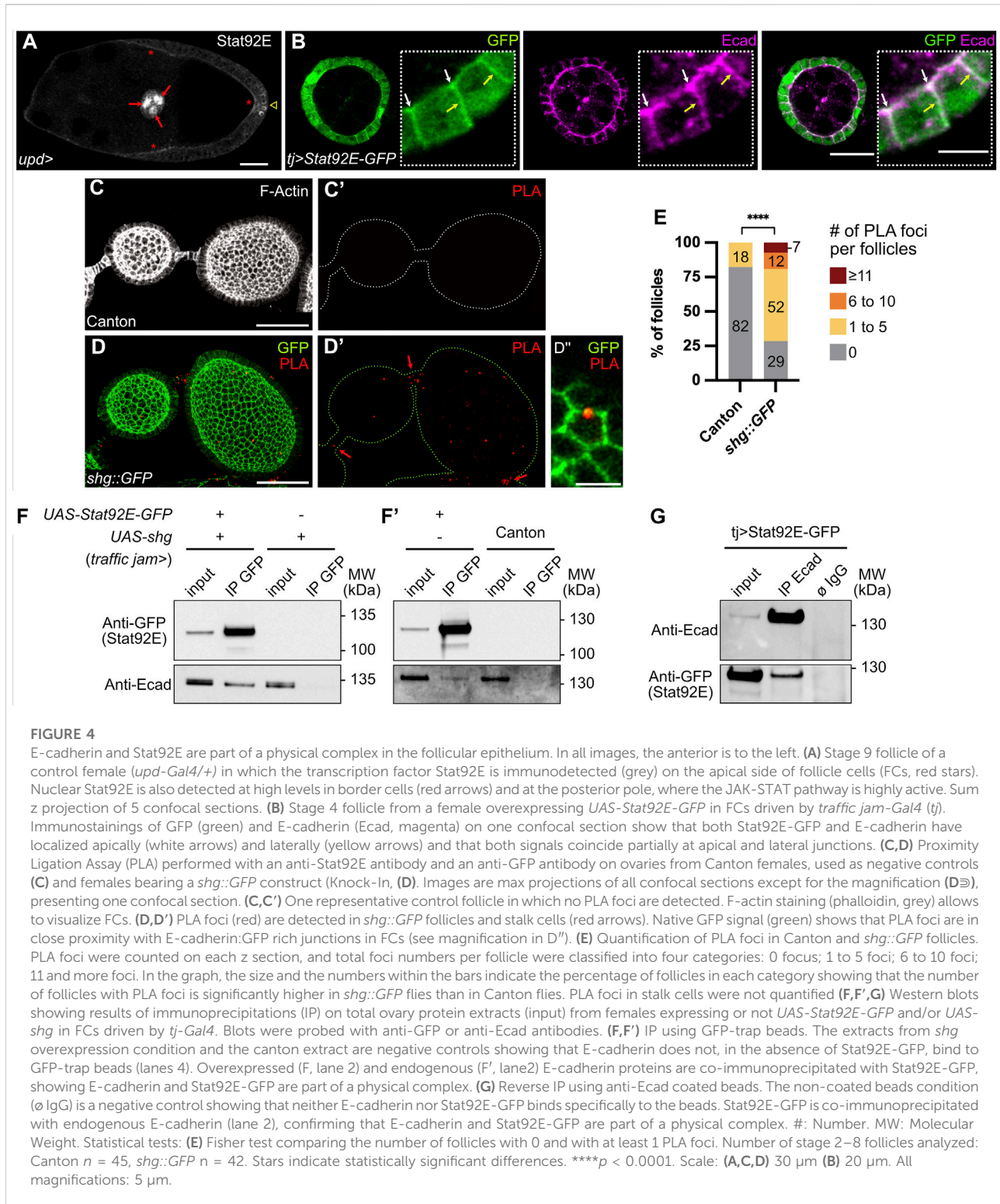
looked at control follicles stained with an anti-Stat92E antibody. Besides the expected nuclear staining at follicle poles and in border cells at stage 9, where JAK-STAT activity is the highest, we also detected endogenous Stat92E apically in FCs (Figure 4A). Similarly, when we overexpressed a GFP-tagged version of Stat92E, besides the enrichment in nuclei at follicle poles, Stat92E was also localized apically and laterally in FCs from stage 3 to stage 9, partially overlapping with E-cadherin (Figure 4B). To gain more insight into the molecular mechanism by which E-cadherin could regulate JAK-STAT activity in follicles, we tested whether E-cadherin and Stat92E were in close proximity in FCs by performing a proximity ligation assay (PLA). For this, we used anti-Stat92E and anti-GFP antibodies on ovaries from *shg::GFP* Knock-In flies to test for E-cadherin-GFP/Stat92E proximity. Although it is not easy to detect PLA signals in ovaries due to penetration issues (Mannix et al., 2019), we found a significantly higher number of follicles with PLA foci in *shg::GFP* ovaries, as compared to the negative control that was nearly devoid of PLA signal (Figures 4C–E), suggesting that E-cadherin and Stat92E can be found in close proximity in FCs.

Finally, we tested whether E-cadherin and Stat92E could interact together in ovaries by performing co-immunoprecipitation assays. For this, *Stat92E-GFP* and *shg* were overexpressed in FCs with the *tj-Gal4* driver, and co-immunoprecipitation was tested by using beads bound with anti-GFP antibodies (Figure 4F,F'). When only *shg* is overexpressed, E-cadherin is not immunoprecipitated from ovary extracts incubated with anti-GFP beads (Figure 4F, lane 4). However, when both *Stat92E-GFP* and *shg* are co-overexpressed, E-cadherin is co-immunoprecipitated with Stat92E-GFP from ovary extracts incubated with anti-GFP beads (Figure 4F, lane 2). Endogenous E-cadherin was also co-immunoprecipitated from flies expressing only Stat92E-GFP in FCs (Figure 4F', lane 2). To confirm these results, we also performed the reverse immunoprecipitation on flies expressing only Stat92E-GFP in FCs and succeeded in co-immunoprecipitating Stat92E-GFP from E-Cadherin-coated beads, whereas no Stat92E was immunoprecipitated with the beads alone (Figure 4G). Our results indicate that Stat92E-GFP and endogenous E-cadherin are part of the same physical complex in FCs.

Altogether, our study unravels that E-cadherin is a new positive regulator of the JAK-STAT pathway during oogenesis and that E-cadherin and Stat92E are part of a complex in FCs, suggesting that E-cadherin could modulate JAK-STAT signaling in these cells through physical binding to Stat92E.

Discussion

The results presented here reveal that E-cadherin is necessary for optimal JAK-STAT signaling in the *Drosophila* follicular epithelium during oogenesis. They also show that *shg* is expressed differentially at follicle poles, leading to lower



E-cadherin accumulation in the posterior region from mid-oogenesis, compared to the anterior region, and that JAK-STAT signaling displays a similar asymmetry. The decrease in E-cadherin levels at the posterior pole is therefore likely responsible for the

concurrent decrease in JAK-STAT signaling. It will be interesting in the future to elucidate whether the asymmetry in anterior-posterior JAK-STAT signaling in follicles has a functional significance in their development.

Our study also shows that E-cadherin is necessary for both FCs and adjacent GCs for full JAK-STAT activation in the follicular epithelium in proximity to ligand-producing PCs at follicle extremities. This implies that it is the role of E-cadherin in cell–cell contact, including at the FC-GC interface, that is important for high levels of JAK-STAT signaling. In addition, our work demonstrates that Stat92E is in a complex with E-cadherin in FCs. These results provide potential mechanistic models for the role of E-cadherin in activating JAK-STAT signaling. Indeed, the importance of JAK-STAT components subcellular localization has been demonstrated in FCs, as localization of *upd* mRNA, Upd secretion (Van de Bor et al., 2011) and Dome endocytosis (Devergne et al., 2007) all occur apically. Since we found some Stat92E localized apically in FCs and since the majority of E-cadherin is also detected apically in these cells, it is possible that the E-cadherin-Stat92E interaction allows Stat92E accumulation in proximity to the apically-localized Dome receptor. This polarization of Stat92E in a permissive subdomain of the plasma membrane may mediate Dome conformational change or stabilize the Dome-Stat92E complex at the membrane, leading to more efficient signaling. Similar mechanisms have been demonstrated in mammals, such as in human fibroblasts, where IFN- γ R localization in either membrane lipid or actin nanodomains can have, respectively, an inhibiting or a permissive action on JAK activation, by regulating a conformational change in the receptor (Blouin et al., 2016).

Precedent for polarized JAK-STAT signaling also exists in *Drosophila* since, in the embryonic ectoderm epithelium, apical receptor localization dictates signal transduction (Hombria and Sotillos, 2008). In these cells, subapical accumulation of cytoplasmic inactive Stat92E depends on Par-3 (Sotillos et al., 2008), their physical interaction being mediated by Src kinases (Sotillos et al., 2013). Therefore, polarized apical JAK-STAT signaling not only in the embryonic ectoderm but also in the follicular epithelium (our present findings) may involve interactions with the transmembrane proteins Par-3 and E-cadherin, respectively. Our findings, thus, extend the phenomenon of polarized apical JAK-STAT signaling to a second epithelial tissue in *Drosophila*, the follicular epithelium.

It is possible that Par-3 also associates with the E-cadherin-Stat92E complex, which could contribute to apically polarized JAK-STAT signaling in ovaries. Indeed, Par-3 is physically associated with AJs in different species (Coopman and Djiane, 2016; Thompson, 2022), and Stat92E interacts with Par-3 in the *Drosophila* embryo (Sotillos et al., 2008). Consequently, it has been proposed, although it was not demonstrated, that, generally, Par-3 may form a bridge between E-cadherin and Stat92E, which retains Stat92E at the plasma membrane (Ramirez Moreno et al., 2021).

Finally, E-cadherin could also regulate JAK-STAT signaling outside of the ovary as both E-cadherin and JAK-STAT are involved in other common processes, such as germline stem cell maintenance in *Drosophila* testis (Wang et al., 2006). Although JAK-STAT signaling regulation by E-cadherin has not been

described in *Drosophila* before the present study, in mammals, cadherin activation of JAK-STAT signaling has been reported in several systems. In rat testis, the short-type PB-cadherin, a classical cadherin that co-immunoprecipitates with JAK2, is necessary for JAK-STAT activation and GC survival (Wu et al., 2005). In mouse embryonic stem cells, E-cadherin association with the LIFR-GP130 receptor complex and its consequent stabilization are important to maintain JAK-STAT signaling and pluripotency (del Valle et al., 2013). In cultures of a squamous carcinoma cell line, E-cadherin and STAT3 colocalize and E-cadherin-based cell–cell contacts are necessary for STAT3 activity (Onishi et al., 2008; Geletu et al., 2013). Our findings are, thus, particularly exciting since they suggest conservation of JAK-STAT regulation by E-cadherin between mammals and *Drosophila* and, therefore, strengthen the use of the *Drosophila* follicular epithelium as an excellent model to study JAK-STAT pathway regulation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material; further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

CM performed the vast majority of experiments and data analyses and participated in experimental design. AT performed some experiments and contributed to initiating the project. SN and FC performed co-immunoprecipitation and proximity ligation assays and analyses. MP and JM participated in setting up and improving protocols and data interpretations of molecular biology and biochemistry experiments. A-MP and JM provided material and infrastructure and helped with discussions on the project. A-MP, JM, and MM obtained financial support. MM conceptualized and designed the research study, supervised the project, and performed some experiments. CM, A-MP, and MM wrote the manuscript. All authors critically read and approved the manuscript.

Funding

This work was supported by a 3-year-PhD fellowship obtained from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” for CM, by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Paris-Saclay, and Versailles St-Quentin-en-Yvelines Universities, by a grant from the “Ligue contre le cancer” for laboratory expenses, and by a grant from the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” for a year of salary expenses for CM.

Acknowledgments

The authors wish to thank Erika Bach, Christian Ghiglione, Jean-Paul Vincent, Carsten Janke, Jean-René Huynh, Vincent Mirouse, Yang Hong, and Antoine Boivin for sharing fly stocks and Denise Montell and Steve Hou for sharing antibodies. They are also grateful to Fred Bernard for helpful discussions, and they thank Flybase, BDSC (Bloomington *Drosophila* Stock Center), and DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank) for resources.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Arbouzova, N. I., and Zeidler, M. P. (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila*: Insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 133, 2605–2616. doi:10.1242/dev.02411
- Bach, E. A., Ekas, L. A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M. S., Lee, H., Perrimon, N., et al. (2007). GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway *in vivo*. *Gene Expr. Patterns* 7, 323–331. doi:10.1016/j.modgep.2006.08.003
- Baksa, K., Parke, T., Dobens, L. L., and Dearolf, C. R. (2002). The *Drosophila* STAT protein, stat92E, regulates follicle cell differentiation during oogenesis. *Dev. Biol.* 243, 166–175. doi:10.1006/dbio.2001.0539
- Beccari, S., Teixeira, L., and Rørth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* 111, 115–123. doi:10.1016/s0925-4773(01)00615-3
- Besse, F., and Pret, A.-M. (2003). Apoptosis-mediated cell death within the ovarian polar cell lineage of *Drosophila melanogaster*. *Development* 130, 1017–1027. doi:10.1242/dev.00313
- Blouin, C. M., Hamon, Y., Gonnord, P., Boularan, C., Kagan, J., Viaris de Lesegno, C., et al. (2016). Glycosylation-Dependent IFN- γ R partitioning in lipid and actin nanodomains is critical for JAK activation. *Cell* 166, 920–934. doi:10.1016/j.cell.2016.07.003
- Borensztein, A., Boissoneau, E., Fernandez, G., Agnès, F., and Pret, A.-M. (2013). JAK/STAT autocontrol of ligand-producing cell number through apoptosis. *Development* 140, 195–204. doi:10.1242/dev.079046
- Chen, Q., Giedt, M., Tang, L., and Harrison, D. A. (2014). Tools and methods for studying the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Methods* 68, 160–172. doi:10.1016/j.ymeth.2014.03.023
- Coopman, P., and Djiane, A. (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3535–3553. doi:10.1007/s00018-016-2260-8
- del Valle, I., Rudloff, S., Carles, A., Li, Y., Liszewska, E., Vogt, R., et al. (2013). E-cadherin is required for the proper activation of the Lftr/Gp130 signaling pathway in mouse embryonic stem cells. *Development* 140, 1684–1692. doi:10.1242/dev.088690
- Denef, N., and Schüpbach, T. (2003). Patterning: JAK-STAT signalling in the *Drosophila* follicular epithelium. *Curr. Biol.* 13, R388–R390. doi:10.1016/s0960-9822(03)00317-8
- Devergne, O., Ghiglione, C., and Noselli, S. (2007). The endocytic control of JAK/STAT signalling in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120, 3457–3464. doi:10.1242/jcs.005926
- Fregoso Lomas, M., De Vito, S., Boisclair Lachance, J.-F., Houde, J., and Nilson, L. A. (2016). Determination of EGFR signaling output by opposing gradients of BMP and JAK/STAT activity. *Curr. Biol.* 26, 2572–2582. doi:10.1016/j.cub.2016.07.073
- Geletu, M., Guy, S., Arulananandam, R., Feracci, H., and Raptis, L. (2013). Engaged for survival: From cadherin ligation to STAT3 activation. *JAKSTAT* 2, e27363. doi:10.4161/jkst.27363
- Godt, D., and Tepass, U. (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* 395, 387–391. doi:10.1038/26493
- González-Reyes, A., St Johnston, D., and Gonzalez-Reyes, A. (1998). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* 125, 3635–3644. doi:10.1242/dev.125.18.3635
- Hayashi, Y., Sexton, T. R., Dejima, K., Perry, D. W., Takemura, M., Kobayashi, S., et al. (2012). Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. *Development* 139, 4162–4171. doi:10.1242/dev.078055
- Hombria, J. C.-G., and Sotillos, S. (2008). Disclosing JAK/STAT links to cell adhesion and cell polarity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 370–378. doi:10.1016/j.semcdb.2008.06.002
- Khammari, A., Agnès, F., Gandille, P., and Pret, A.-M. (2011). Physiological apoptosis of polar cells during *Drosophila* oogenesis is mediated by Hid-dependent regulation of Diap1. *Cell Death Differ.* 18, 793–805. doi:10.1038/cdd.2010.141
- Manning, L. A., Weideman, A. M., Peercy, B. E., and Starz-Gaiano, M. (2015). Tissue landscape alters adjacent cell fates during *Drosophila* egg development. *Nat. Commun.* 6, 7356. doi:10.1038/ncomms8356
- Mannix, K. M., Starble, R. M., Kaufman, R. S., and Cooley, L. (2019). Proximity labeling reveals novel interactomes in live *Drosophila* tissue. *Development* 146, dev176644. doi:10.1242/dev.176644
- Marchetti, M., Monier, M.-N., Fradagrada, A., Mitchell, K., Baychelier, F., Eid, P., et al. (2006). Stat-mediated signaling induced by type I and type II interferons (IFNs) is differentially controlled through lipid microdomain association and clathrin-dependent endocytosis of IFN receptors. *Mol. Biol. Cell* 17, 2896–2909. doi:10.1091/mbc.E06-01-0076
- McGregor, J. R., Xi, R., and Harrison, D. A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development* 129, 705–717. doi:10.1242/dev.129.3.705
- Monahan, A. J., and Starz-Gaiano, M. (2013). Socs36E attenuates STAT signaling to optimize motile cell specification in the *Drosophila* ovary. *Dev. Biol.* 379, 152–166. doi:10.1016/j.ydbio.2013.03.022
- Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* 144, 533–547. doi:10.1083/jcb.144.3.533
- Onishi, A., Chen, Q., Humtsoe, J. O., and Kramer, R. H. (2008). STAT3 signaling is induced by intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 314, 377–386. doi:10.1016/j.yexcr.2007.09.018
- Pacquelet, A., and Rørth, P. (2005). Regulatory mechanisms required for DE-cadherin function in cell migration and other types of adhesion. *J. Cell Biol.* 170, 803–812. doi:10.1083/jcb.200506131
- Pannekoek, W.-J., de Rooij, J., and Gloerich, M. (2019). Force transduction by cadherin adhesions in morphogenesis. *F1000Res.* 8, F1000 Faculty Rev-1044. doi:10.12688/f1000research.18779.1

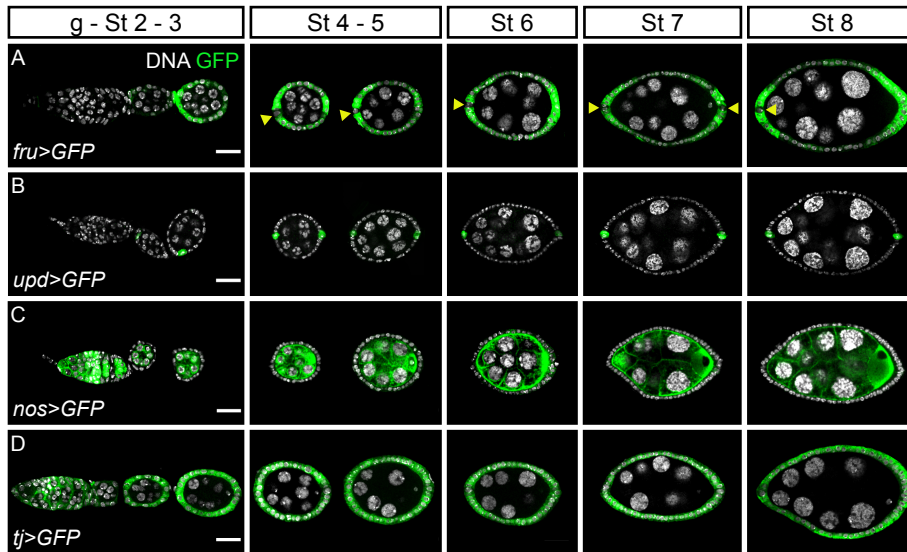
Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

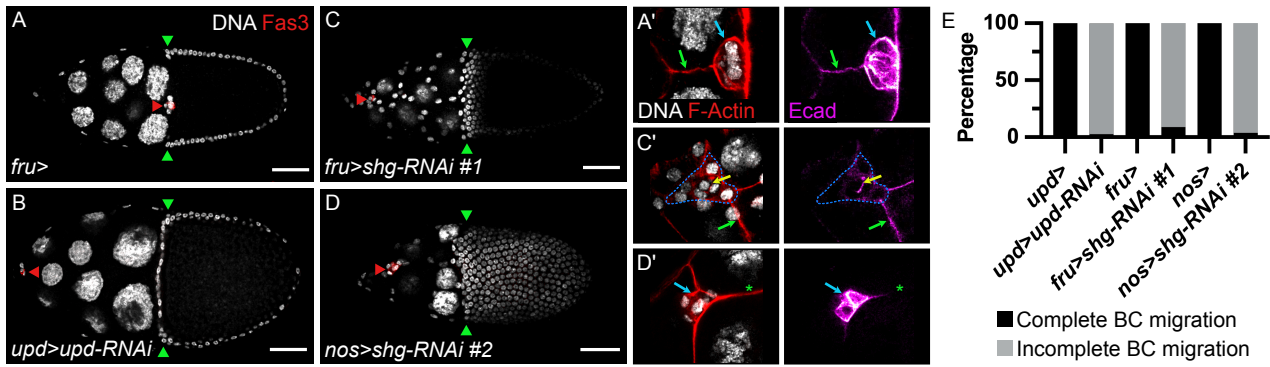
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.886312/full#supplementary-material>

- Parvy, J.-P., Napal, L., Rubin, T., Poidevin, M., Perrin, L., Wicker-Thomas, C., et al. (2012). *Drosophila melanogaster* acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet.* 8, e1002925. doi:10.1371/journal.pgen.1002925
- Ramirez Moreno, M., Stempor, P. A., and Bulgakova, N. A. (2021). Interactions and feedbacks in E-cadherin transcriptional regulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 701175. doi:10.3389/fcell.2021.701175
- Saadin, A., and Starz-Gaiano, M. (2016). Identification of novel regulators of the JAK/STAT signaling pathway that control border cell migration in the *Drosophila* ovary. *G3 (Bethesda)* 6, 1991–2002. doi:10.1534/g3.116.028100
- Sahu, A., Ghosh, R., Deshpande, G., and Prasad, M. (2017). A gap junction protein, *Inx2*, modulates calcium flux to specify border cell fate during *Drosophila* oogenesis. *PLoS Genet.* 13, e1006542. doi:10.1371/journal.pgen.1006542
- Silver, D. L., Geisbrecht, E. R., and Montell, D. J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development* 132, 3483–3492. doi:10.1242/dev.01910
- Silver, D. L., and Montell, D. J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* 107, 831–841. doi:10.1016/s0092-8674(01)00607-9
- Sotillos, S., Díaz-Meco, M. T., Moscat, J., and Castelli-Gair Hombria, J. (2008). Polarized subcellular localization of Jak/STAT components is required for efficient signaling. *Curr. Biol.* 18, 624–629. doi:10.1016/j.cub.2008.03.055
- Sotillos, S., Krahn, M., Espinosa-Vázquez, J. M., and Hombria, J. C.-G. (2013). Src kinases mediate the interaction of the apical determinant Bazooka/PAR3 with STAT92E and increase signalling efficiency in *Drosophila* ectodermal cells. *Development* 140, 1507–1516. doi:10.1242/dev.092320
- Starz-Gaiano, M., Melani, M., Wang, X., Meinhardt, H., and Montell, D. J. (2008). Feedback inhibition of Jak/STAT signaling by apotic is required to limit an invasive cell population. *Dev. Cell* 14, 726–738. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.005
- Stevens, C. A., Revaitis, N. T., Caur, R., and Yakoby, N. (2020). The ETS-transcription factor *Pointed* is sufficient to regulate the posterior fate of the follicular epithelium. *Development* 147, dev189787. doi:10.1242/dev.189787
- Thompson, B. J. (2022). Par-3 family proteins in cell polarity & adhesion. *FEBS J.* 289, 596–613. doi:10.1111/febs.15754
- Torres, A. Y., Malartre, M., Pret, A.-M., and Agnès, F. (2017). JAK/STAT signaling is necessary for cell monosis prior to epithelial cell apoptotic extrusion. *Cell Death Dis.* 8, e2814. doi:10.1038/cddis.2017.166
- Van de Bor, V., Zimniak, G., Cérézo, D., Schaub, S., and Noselli, S. (2011). Asymmetric localisation of cytokine mRNA is essential for JAK/STAT activation during cell invasiveness. *Development* 138, 1383–1393. doi:10.1242/dev.056184
- Wang, H., Singh, S. R., Zheng, Z., Oh, S.-W., Chen, X., Edwards, K., et al. (2006). Rap-GEF signaling controls stem cell anchoring to their niche through regulating DE-cadherin-mediated cell adhesion in the *Drosophila* testis. *Dev. Cell* 10, 117–126. doi:10.1016/j.devcel.2005.11.004
- Wu, J., Jester, W. F., and Orth, J. M. (2005). Short-type PB-cadherin promotes survival of gonocytes and activates JAK-STAT signalling. *Dev. Biol.* 284, 437–450. doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.042
- Xi, R., McGregor, J. R., and Harrison, D. A. (2003). A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium. *Dev. Cell* 4, 167–177. doi:10.1016/s1534-5807(02)00412-4
- Yoon, W. H., Meinhardt, H., and Montell, D. J. (2011). miRNA-mediated feedback inhibition of JAK/STAT morphogen signalling establishes a cell fate threshold. *Nat. Cell Biol.* 13, 1062–1069. doi:10.1038/ncb2316



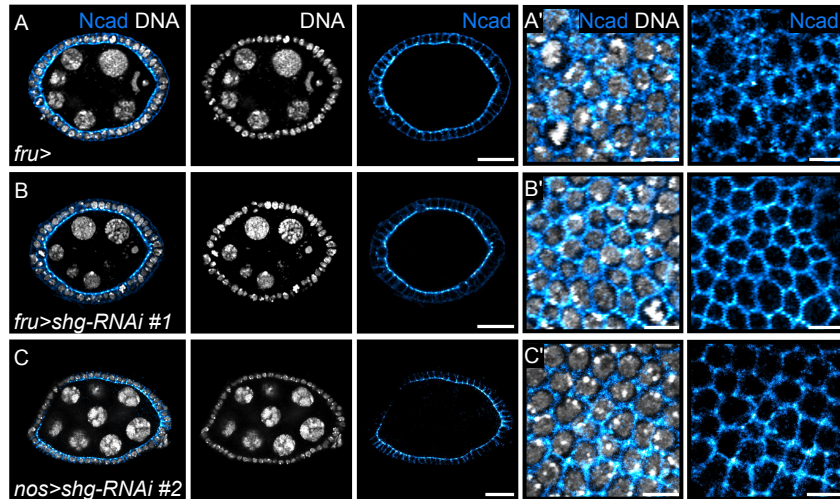
SUPPLEMENTARY FIGURE S1

Expression patterns of the Gal4 drivers used to drive UAS transgenes in different cell types. In all images, anterior is to the left. Yellow arrowheads indicate polar cells (PCs). Follicles from females expressing *UAS-GFP* (green, immunostaining) to visualize the expression pattern of the various Gal4 drivers throughout oogenesis up to stage 8. DNA is stained by DAPI (grey). **(A)** *fruitless-Gal4 (fru)* allows expression in all follicle cells (FCs), except PCs, from stage 2. **(B)** *unpaired-Gal4 (upd)* drives expression in all PCs from stage 2. **(C)** *nanos-Gal4 (nos)* is a germline specific driver, starting to be expressed from the germarium. **(D)** *traffic jam-Gal4 (tj)* drives expression in all FCs from the germarium. g: germarium. St: stage. Scale: 20µm.



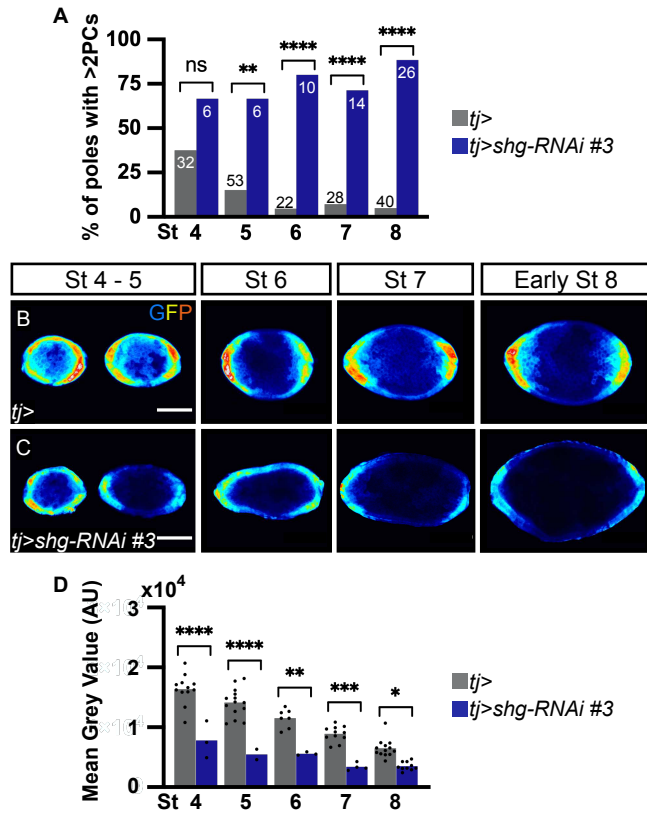
SUPPLEMENTARY FIGURE S2

JAK-STAT signaling downregulation and E-Cadherin knock-down both lead to border cell migration defects. In all images, anterior is to the left. **(A-D)** Border cell (BC) migration is assessed as complete when the BC cluster has reached the oocyte anterior side (green arrowheads) by stage 10 and incomplete when it has not. Immunostaining of Fas3 (red), the polar cell (PC) marker, and DNA labeling (grey, DAPI) are used to visualize BC cluster position (red arrowhead). **(A',C',D')** BC cluster magnifications of follicles presented in A, C and D respectively. F-Actin (red, phalloidin) and DNA stainings allow distinction and delimitation of BC clusters (blue arrows and dotted lines) and germ cells (GCs, green arrows and asterisks). E-Cadherin immunostaining (Ecad, "magenta hot" filter, from magenta, low intensity, to white, high intensity) is used to assess *shg* knock-down efficiency. **(A,A')** Follicle from a female carrying the *fru-Gal4* driver alone used as a control showing complete BC migration (A). E-Cadherin is detected between GCs and in the BC group (A'). **(B)** Follicle from a female expressing RNAi targeting *upd* in PCs driven by the *upd-Gal4* driver to reduce JAK-STAT signaling, which results in BC migration defects. **(C,C',D,D')** Follicles from females expressing RNAis targeting *shg* driven by the *fru-Gal4* (C, *shg-RNAi* #1) or the *nos-Gal4* (D, *shg-RNAi* #2) drivers to knock-down *shg* in FCs or in the germline, respectively. In both conditions, BCs show migration defects. **(C')** When *shg* is reduced in FCs, E-Cadherin is not detected in the BC cluster, except PCs (yellow arrow), but is still detected between GCs. **(D')** When *shg* is decreased in GCs, E-Cadherin is not detected in GCs, but is still detected in the BC group. **(E)** BC migration defect quantification illustrated by the percentage of stage 10 follicles with complete (black) or incomplete (grey) BC migration in different conditions: *upd* knock-down (n=73), *shg* knock-down in FCs (n=34) and *shg* knock-down in GCs (n=27). Females carrying only the corresponding *upd-Gal4*, *fru-Gal4*, and *nos-Gal4* drivers are used as controls (n=51, 65 and 25, respectively). St: stage. Scale: 50µm. n: number of stage 10 follicles analyzed.



SUPPLEMENTARY FIGURE S3

Epithelial integrity is maintained in *shg* knock-down (KD) conditions as a result of N-Cadherin-mediated adhesion between follicle cells (FCs). In all images anterior is to the left. (A-C) One confocal section of follicles at stage 5 of oogenesis from females carrying the *fru-Gal4* driver, a representative control context (A), expressing RNAs against *shg* driven by the *fru-Gal4* driver (B, *shg*-RNAi #1) or the *nanos-Gal4* driver (C, *shg*-RNAi #2) to KD *shg* in FCs or in germ cells respectively. (A'-C') Max projection of 3 confocal basal sections of the same follicles presented in (A-C). N-Cadherin immunostaining (Ncad, "cyan hot" filter, from cyan, low intensity, to white, high intensity) and DNA staining with DAPI (grey) show the global organization and health of the follicular epithelium. In *shg* KD conditions, FCs form a monolayered epithelium as in control condition with no sign of extruded or dying cells. Decreasing E-Cadherin expression in FCs does not affect epithelial structure, which is maintained by N-Cadherin. Scale: (A-C) 20 μ m (A'-C') 5 μ m.



SUPPLEMENTARY FIGURE S4

E-Cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling, as shown by the use of RNAi line #3. In all images, anterior is to the left. **(A)** Apoptosis defect quantification illustrated by the percentage of poles with more than 2 polar cells (PCs) at various stages of oogenesis when *shg* is knocked-down (KD) with the *shg-RNAi* line #3 expressed in follicle cells (FCs, blue bars) compared to control condition (females carrying only the *traffic jam-Gal4* (*tj*) driver, grey bars). Numbers in bars correspond to the number of counted poles. A significant perturbation in PC apoptosis is observed in somatic *shg* KD background at all analyzed oogenesis stages. **(B,C)** Follicles at various stages of oogenesis from *10XSTAT92E-GFP* hemizygous females carrying *tj-Gal4*, a control context to assess JAK-STAT activity (B), or carrying the *Gal4* and the *shg-RNAi* to KD *shg* in FCs (C). GFP immunostaining ("royal" filter, sum projection of total GFP signal) reflects JAK-STAT activity at each pole. In the *shg* KD, GFP signal is lower in the entire follicular epithelium than in the control at all shown stages. **(D)** Mean Grey Value quantification of entire follicles at indicated stages of oogenesis using sum projections of total GFP signal in the *shg* KD (blue bars), compared to the control (*tj-Gal4*, grey bars). GFP intensity reflecting JAK-STAT activity is significantly lower upon *shg* KD at all analyzed oogenesis stages. Bars represent mean measurements and each dot corresponds to one measurement.

St: stage. AU: Arbitrary Units. Statistical tests: (A) Chi2, (D) Ordinary one-way ANOVAs. Stars indicate statistically significant differences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Scale: $30\mu\text{m}$.

RÉSULTATS

PARTIE 2



Actine-F (phalloïdine) dans la gaine musculaire entourant les ovarioles.

The localization of the posterior determinant Oskar in the *Drosophila* oocyte is defined by an interplay between E-Cadherin, EGFR and JAK-STAT signaling pathways in the adjacent follicular epithelium

Charlotte Mallart¹, Fabienne Chalvet^{1†}, Sophie Netter^{2†}, Jacques Montagne¹, Anne-Marie Pret² and Marianne Malartre^{1*}

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

2 Université Paris-Saclay, UVSQ, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif- sur-Yvette, France

[†] These authors have contributed equally to this work

* correspondence: marianne.malartre@universite-paris-saclay.fr

Keywords: JAK-STAT, signaling, oogenesis, E-Cadherin, EGFR, morphogenesis, mRNA determinant, *oskar*, anterior-posterior polarity, body axes, oocyte

ABSTRACT

During metazoan development, the anterior-posterior axis can be set at fertilization, as in *c. elegans*, or even earlier, during oogenesis. In *Drosophila*, this is achieved in the oocyte by polarized localization of cytoplasmic maternal determinants, such as *oskar* mRNA, that is transported toward the posterior pole of the maturing oocyte and is tightly anchored to the actin cortex facing the surrounding somatic follicular epithelium. The precise localization of this anchoring is essential to establish the future embryonic body plan, as well as the formation of germ cells. If many actors involved in *oskar* mRNA transport along microtubules and its anchoring to the cortex in the oocyte have been characterized, the contribution of the surrounding follicular epithelium in this process remains elusive. In particular, how the size of the anchoring area is defined is not understood. Around 200 Posterior Follicle Cells (PFCs) differentiate in response to combinatorial JAK-STAT and EGFR signaling pathways, leading to an as yet unidentified signal from PFCs toward the oocyte, which induces *oskar* mRNA transport and anchoring to the posterior actin cortex. We found that the size of the *oskar* mRNA anchoring zone is very robust as it faces a precise group of 2 follicle cell radius around polar cells, forming a population of about 20 cells. We uncovered that, after PFC differentiation, JAK-STAT activity is reduced to this subpopulation of PFCs that we called the Posterior Anchoring Cells (PACs), since they precisely define the size of the *oskar* mRNA anchoring zone in the adjacent oocyte. We show that the PACs are the only cells to keep a tight contact with the oocyte longer than the other PFCs at stages 9 and 10, during the time *oskar* mRNA is transported and anchored at the oocyte posterior cortex. We demonstrate that JAK-STAT signaling in the follicular epithelium is necessary and sufficient both to maintain the oocyte and PAC membrane tight and for correct *oskar* mRNA posterior localization in the underlying oocyte cortex. We identified that this role is at least partly ensured by *shg*, the gene encoding the adhesion protein E-Cadherin, which is specifically expressed in the PACs in response to opposite outputs received by EGFR and JAK-STAT signaling pathways, in an otherwise low E-Cadherin level environment. Our novel findings identify the PACs, a newly identified follicle cell population, which defines non cell-autonomously, from their location within the follicular epithelium, the size of the *oskar* mRNA anchoring zone in the adjacent oocyte, an essential step to establish the future embryonic body plan.

INTRODUCTION

The establishment of polarity in *Drosophila* requires the precise localization of determinants in early embryos, but regulation of determinant localization actually starts in the oocyte during oogenesis. In *Drosophila*, *bicoid* mRNA is the anterior determinant, while *nanos* (*nos*) is the posterior determinant that is necessary for pole plasm formation and for the development of the abdomen (Wang and Lehmann, 1991). Consequently, *nos* mutant embryos lack pole plasm (or germ plasm), display abdomen segmentation phenotypes and finally die. Oskar is an RNA-binding protein that is required to localize *nos* at the posterior pole of the embryo, and *oskar* mutants likewise lack pole plasm, fail to produce pole cells and their abdominal region remains unsegmented (Ephrussi et al., 1991; Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1986). Oskar is required for germ plasm assembly and function. Germ plasm is organized into germ granules, which are the hallmark of germ cells in all species. Germ plasm contains determinants that direct the formation of pole cells in embryos, giving rise to the germline. Germ plasm formation is therefore crucial for the reproductive success of the species, and it begins, in *Drosophila*, with the transport and anchorage of *oskar* mRNA in the form of ribonucleoprotein granules, which are solid-like condensate, at the posterior pole of the oocyte (Bose et al., 2022). Once reached the posterior oocyte, *oskar* mRNA is translated into a protein, which will recruit other germ plasm proteins, such as Vasa.

Each ovary contains 20 ovarioles on average, which are composed of several egg chambers or ovarian follicles at different stages of oogenesis (14 in total). Ovarian follicles consist of a germline cyst made up of one oocyte and 15 nurse cells (germ cells, GCs) surrounded by follicle cells (FCs) forming a monolayered epithelium (**Figure 1A**). This epithelium is a dynamic tissue presenting active cell division, extrusion, elongation, intercalation, migration and neighbor exchange events. Ovarioles are strings of follicles connected by interfollicular stalks, progressively maturing. Youngest stages are found at the anterior tip, starting with the germarium, which hosts germline and somatic stem cells, while posterior ovarioles contain older stages, ending with the mature egg (Wu et al., 2008).

Communication between FCs and GCs is important at different steps of oogenesis (Merkle et al., 2020). For instance, at stage 6, the EGFR ligand Gurken

(Grk) is secreted by the oocyte and received by FCs, which, in combination with JAK-STAT signaling, instructs the differentiation of posterior follicle cells (PFCs) (Fregoso Lomas et al., 2016; Xi et al., 2003). It is thought that PFCs play a role in sending a yet unidentified signal back to the oocyte, which triggers the reorganization of the microtubule network. Concomitantly to the microtubule reorganization, the oocyte nucleus located close to the posterior pole of the oocyte, migrates dorsally, which is the first event of dorso-ventral axis establishment (Bernard et al., 2018; Roth et al., 1999). Curiously, although the existence of the mysterious signal, called back signaling, has been postulated a long time ago (González-Reyes and St Johnston, 1994; González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995; Ruohola et al., 1991), it still has not been identified. Whether it is a diffusible or localized signal, or even a physical trigger is completely unknown, but it has been proposed that this positional information relay between the PFCs and the oocyte must be sharply defined (Frydman and Spradling, 2001; Poulton and Deng, 2006; Roth and Lynch, 2009).

Reorganization of the microtubule network is achieved by the conserved Par polarity proteins (reviewed in Milas and Telley, 2022). Par-1 and Par3/Bazooka colocalize at the posterior cortex at mid-oogenesis, but at stage 9, Par3 is excluded from the posterior cortex by Par-1 and relocates at the anterior and lateral cortex of the oocyte, which establishes complementary cortical domains (Doerflinger et al., 2010). This mutual exclusion is achieved following Par3 phosphorylation by Par-1 (Benton and St Johnston, 2003), and the exclusion of Par3 from the posterior cortex is also ensured by an endocytic mechanism involving Rab5 and PI(4,5)P2 (Jouette et al., 2019). Par-1 is required for microtubule plus-ends focusing at the posterior, which is necessary for *oskar* mRNA directed transport towards the posterior of the oocyte and is therefore an early actor in the establishment of the anterior-posterior polarity (Doerflinger et al., 2003; Shulman et al., 2000; Tomancak et al., 2000). It does so by inhibiting Shot/Patronin-dependent microtubule minus-end foci at the cortex, causing microtubule plus-ends to accumulate preferentially at the posterior pole (Nashchekin et al., 2016; Parton et al., 2011). Recently, it was shown that MRLC di-phosphorylation establishes an asymmetric myosin activation in the oocyte leading to the recruitment and maintenance of Par-1 at the posterior cortex, making it the first identified event in the anterior-posterior polarity establishment in response to the back signaling (Doerflinger et al., 2022). Dynein heavy chain (Dhc) and Kinesin

heavy chain (Khc), the force generating subunits of the two microtubule motor proteins, Dynein and Kinesin-1 respectively, are also localized at the posterior and participate in *oskar* mRNA transport (Clark et al., 1994; Palacios and St Johnston, 2002). Reciprocally, *oskar* mRNA is involved in Par-1 posterior localization (Shulman et al., 2000). The oocyte microtubule network is actually not as polarized as it was first thought and live imaging allowing to visualize *oskar* mRNA transport *in vivo* in the oocyte, showed that it is actively transported along microtubule in all directions, with only a slight bias towards the posterior pole (Parton et al., 2011; Zimyanin et al., 2008). A theoretical model of microtubule organization with a simple gradient of cortical microtubule nucleation showed that this bias is sufficient to reproduce *bicoid* and *oskar* mRNA localization (Khuc Trong et al., 2015).

Finally, the oocyte actin cytoskeleton plays a role in *oskar* mRNA posterior localization. Oskar interactome contains many actin-binding proteins, which can explain how it anchors to the actin-rich cortex. In particular, the actin motor protein Myosin-V links Oskar to the oocyte posterior cortex, participating to its entrapment (Krauss et al., 2009). It has been recently proposed that Myosin-V and the microtubule-motor Kinesin-1 have opposing activities, Myosin-V facilitating *oskar* mRNA anchoring, while Kinesin-1 removes the complex from the cortex. At the posterior of the oocyte, as the microtubule density is low, Myosin-V wins over Kinesin-1, resulting in *oskar* mRNA anchoring (Lu et al., 2020).

If the mechanisms occurring within the oocyte leading to *oskar* mRNA posterior localization and anchoring have been described extensively, the role played by the follicular epithelium, a distinct tissue, in this process, which is at the start of the establishment of anterior-posterior polarity, is a complete mystery. In addition, if the polarized transport of *oskar* mRNA is now well described, little is known about how the size of the anchoring zone is restricted to the posterior pole of the oocyte, as without a localized anchoring, *oskar* mRNA would diffuse and be displaced after being transported. Given that the actin-related actors involved in *oskar* mRNA anchoring, such as Bifocal, Homer (Babu et al., 2004), Moesin (Jankovics et al., 2002; Polesello et al., 2002), Tropomyosin (Erdélyi et al., 1995), Myosin V (Krauss et al., 2009) and Lasp (Suyama et al., 2009), are distributed in large regions of the oocyte cortex, it suggests that the restricted size of the *oskar* mRNA anchoring zone is not defined by a polarized actin cortex.

Here, we show that *oskar* mRNA transport and anchoring in the oocyte is actually achieved in a more dynamic way than it was described so far. This dynamics, taking place between stages 9 and 10, leads to the restriction of *oskar* mRNA anchoring to a very robust region of the oocyte cortex. We identify a new cell population in the follicular epithelium that we named the Posterior Anchoring Cells (PACs), which is involved in *oskar* mRNA posterior localization and anchorage in the oocyte. The PACs constitute a sub-population of PFCs acting non-autonomously to instruct anterior-posterior polarity in the oocyte in a very precise region facing them. We demonstrate that JAK-STAT activity is necessary and sufficient for the differentiation of the PACs and that signaling restriction at the posterior pole allows to define PAC precise number, which in turn defines the size of the *oskar* mRNA anchoring zone. PACs are characterized by a particular contact between the oocyte and FCs with tighter membranes than in adjacent regions. This tight space is necessary for *oskar* mRNA transport and anchoring, as when oocyte and FC membranes are separated, which is the case in follicles presenting a knock-down in JAK-STAT signaling, *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte is affected or even completely lost. We demonstrate that the restriction of the PAC fate to a limited number of cells is crucial as the differentiation of too many PACs induces a larger *oskar* mRNA anchoring zone, leading to developmental defects in the future embryo. We show that the control of PAC number is ensured by a restriction of JAK-STAT signaling activity at the posterior pole following a regulation exerted by EGFR signaling on *shg* expression, the gene encoding the junctional protein E-Cadherin in *Drosophila*. We identify that *shg* is also a target of the JAK-STAT pathway in the PACs, demonstrating opposing actions of EGFR and JAK-STAT signaling pathways on *shg* expression. Finally, *shg* overexpression rescues *oskar* mRNA posterior localization defects in JAK-STAT loss-of-function follicles and restores the correct anchoring size, showing that JAK-STAT signaling acts on *oskar* mRNA anchoring at least partly via E-Cadherin. Together, our results demonstrate that an interplay between JAK-STAT and EGFR signaling regulate *shg* expression, all contributing to establish the PAC zone in the follicular epithelium, which is necessary to maintain a tight interface between the oocyte and FCs to allow proper *oskar* mRNA posterior localization within the oocyte.

MATERIALS AND METHODS

Fly stocks and genetics

The following stocks were used: *10XSTAT92E-GFP* (gift from E. Bach, Bach et al., 2007), *shg-LacZ* (gift from JP. Vincent), *pnt-LacZ* (BDSC #11724), *Khc::LacZ* (Gift from F. Bernard), *UAS-hop^{TUM}*, *grk[2E12]*, *Df(2L)[ED629]* (Gifts from V. Mirouse), *UAS-shgR* (Gift from JR. Huynh), *UAS-ena-mcherry* (Gift from V. Brodu), *UAS-LacZ* (BDSC #3956 and gift from A. Boivin); *fru-Gal4* (Borensztein et al., 2013), *E4-Gal4* (Gift from F. Bernard), *nos-Gal4* (gift from A. Boivin), *upd-Gal4* (Khammari et al., 2011). RNAi strains are from BDSC: *UAS-shg-RNAi* (#38207), *UAS-EGFR-RNAi* (#31526) and VDRC: *UAS-shg-RNAi* (#27082), *UAS-EGFR-RNAi* (#107130); *UAS-upd-RNAi* (#3282); and *w¹¹¹⁸* (#3605), Canton S (#1), *UAS-mCD8-GFP*, *hsFLP;tub<CD2<Gal4,UAS-GFP* and *tub-Gal80^{TS}* (#7016) are from BDSC. *10XSTAT92E-GFP*, *shg-LacZ* (homozygous only) and *pnt-LacZ* were maintained at 25°C. All crosses using the Gal4-UAS system were performed at 25°C, or at 18°C when *tub-Gal80^{ts}* was used (with *fru-Gal4* line), until transfer of pharate pupae to 29°C. Females were dissected at 3-4 days of age. Flipout clones were performed on pharate pupae or one-day-old adults raised at 25°C by transfer to 37°C (30min to 1h30), followed by transfer to 29°C. Females were dissected at 2-3 days of age. For embryo experiments, females of interest were crossed with males and kept at 29°C until embryo recovery.

Ovary immunostaining and native fluorescence

Ovary dissection and immunostaining were performed according to Torres et al., 2017.

For native GFP observation of *10XSTAT92E-GFP* females, ovaries were fixed in 4% formaldehyde, washed briefly 3x in PBS, 15 minutes in PBS-Triton 0.3%, incubated with DAPI and phalloidin for 30 minutes with agitation and rinsed 3x in PBS. Mounting was done in Dabco (Sigma) and observations were carried out straightaway.

The following primary antibodies were used: rabbit anti-GFP (1:200, Interchim), goat anti-Staufen (1:200, gift from A. Guichet), rabbit anti-Oskar (1:1000 gift from A. Cyrklaf), guinea pig anti-Laminin A (1:400, gift from T. Volt), rabbit anti-Cad99C (1:10 000, gift from C. Dahmann) and from DSHB: rat anti-E-Cadherin (1:200), mouse anti-

β -galactosidase (1:200), mouse anti-GFP (1:50), rat anti-vasa (1:200), mouse anti-Dhc (1:20), and mouse anti-Enabled (1:150). Secondary antibodies were all used at 1:200: anti-mouse Cy3 and anti-rat Alexa 647 (Jackson Laboratories), anti-rabbit Alexa 488, anti-goat Alexa 488 and 568 and anti-rat Alexa 647 (Thermo Fisher Scientific). Phalloidin (Sigma) and DAPI were used at 1:200 to label F-Actin and DNA, respectively.

Embryo immunostaining

Females of interest were let to lay eggs at 29°C for the night and embryos were recovered in the morning, allowing to have embryos at multiple developmental stages. Embryos were bleached for 1min, washed briefly in PBS and fixed in 273 μ L PEMS, 33 μ L 37% formaldehyde and 920 μ L heptan for 30min with agitation. Floating embryos were vortexed for 30s in 500 μ L heptan and 500 μ L methanol. Sinking embryo were washed 3x in 1mL methanol, 1x in PBS and 3x in PBS-Triton 0.3%. Embryos were incubated in primary antibody solution overnight at 4°C with agitation and in secondary antibody solution for 2h at room temperature with agitation, each followed by washing 1x in PBS and 3x in PBS-Triton 0.3%. Mounting was done in Dabco (Sigma).

Image processing and analysis

Confocal images were acquired with a Leica SP8 inverted microscope driven by Las-X software, using 63x or 40x oil immersion lenses. Quantifications on confocal stacks were performed using FIJI and annotated with Affinity Designer. For determination of the number of FCs (size of the AZ, β -galactosidase positive cells with *pnt-LacZ* and *shg-LacZ*, GFP positive cells with the 10XSTAT92E-GFP reporter), of the diameter of the AZ and of the space between oocyte et apical PFC membranes, we used only one confocal section passing through the middle of each follicle (visible PCs) to have consistent data regarding cell positions. In scatter dot plots, bars represent mean measurements and each dot corresponds to one follicle. For mean space measurements, as presented on the scheme in Figure 1, the follicular epithelium is divided in five zones of 2 adjacent FCs, zone 1 being the PACs. The area and length of the separation between the membranes in front of each zone is measured to calculate the mean space. For each follicle analyzed, measures were made on both side of PCs. In mean space line graphs, each dot represents average measurements

made at the corresponding zone on multiple posterior poles. For rescue experiments in Figure 7, as *upd* is not expressed in PFCs and *shg* is already highly expressed by PC, we were able to combine both *upd-Gal4* and *E4-Gal4* drivers to drive the expression of *upd-RNAi* in PCs and/or *shg* in PFCs without any unexpected phenotypes. UAS-*LacZ* transgenes were used to keep Gal4 to UAS ratios equal in all strains. For embryo experiments, the number of pole cells was assessed using vasa immunostaining and DAPI staining. In graphs, the size of the bars and the numbers within indicate the percentage of embryo in each indicated category. In Figure 6B, as presented on the scheme, Staufen signal width from the oocyte posterior membrane was quantified by measuring fluorescence intensity with the plot profile tool along a 14 μ m and 20px wide line (red rectangle on the scheme) on 1024x1024px images. Max intensity ratio correspond to the max intensity measured in each 2 μ m distance interval relative to the max intensity measured close to the membrane (0-2 μ m). In the presented line graph, each dot represents average measurements made in the corresponding distance interval on multiple posterior poles. All statistical analyses were performed using GraphPad PRISM.

RESULTS

1) The *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte is well-defined and its size is robust

If *oskar* mRNA transport towards the oocyte posterior pole and its anchorage to the posterior cortex have been extensively described, the size of its anchoring zone has not been characterized. Is it well-defined, is it robust? As *oskar* mRNA is translated into a protein at the posterior oocyte, the detection of Oskar can be used as a proxy for *oskar* mRNA transport and anchoring. Hence, to answer these questions, we stained ovarioles with an anti-Oskar antibody and counted the number of FCs in the follicular epithelium facing Oskar staining in the oocyte as a mean to quantify *oskar* mRNA anchoring zone size at stage 10, when Oskar protein is well-anchored (**Supplementary Figure 1A-B**). We also did the same with Staufen (Stau), an RNA-binding protein that colocalizes with *oskar* mRNA and is required for *oskar* mRNA transport toward the oocyte posterior pole (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1991; St Johnston et al., 1992). Hence, the detection of either Stau or Oskar at the posterior oocyte cortex can be used as a readout for *oskar* mRNA localization and ultimately for correct anterior-posterior polarity establishment. In both cases, we found the anchoring zone size to be very consistent from a follicle to another, Oskar and Stau being anchored in a region of the oocyte cortex facing two FCs on average on each side of PCs, in all directions (**Figure 1B** and **Supplementary Figure 1A-B**). This region therefore forms a circle of a two FC radius around PCs, containing 24 cells on average, which can be observed in a 3D reconstruction of the follicle from a pole view (**Figure 1B'**).

To find out whether the size of the *oskar* mRNA anchoring zone is variable or stable over time, we quantified it in a similar way at 5 different time points, from when it is first detected as a posterior crescent (early stage 9) to late stage 10b. We found that *oskar* mRNA is anchored in front of slightly more FCs at stage 9 than at stage 10, when the anchoring zone reaches its final size of 4 FCs on average around PCs (**Figure 1D**). Interestingly, the boundaries of *oskar* mRNA anchoring zone correlate precisely with lateral sides of FCs, showing that the determinant is precisely anchored in a domain facing FC apical regions. As the size of FC apical domain increases during these stages with the follicles increasing in size, the area of the

oskar mRNA anchoring zone increases accordingly, but the number of facing FCs remain the same (**Figure 1D**). Our results thus show that the size of the Oskar anchoring zone is very well-defined and is located in front of a robust number of FCs in the facing follicular epithelium. What distinguishes this zone from the neighboring zone?

To investigate what could restrict the size of the *oskar* mRNA anchoring zone so precisely, we examined the interface between FCs and the oocyte more closely by staining follicles with phalloidin to visualize the actin cortex. FC and oocyte membranes are in close contact until stage 9 (**Figure 1C**), and then the perivitelline space increases progressively as vitelline components are synthesized and secreted by FCs and accumulate in the oocyte-FC intermembrane space, which is called perivitelline space (Cavaliere et al., 2008; Margaritis et al., 1980; Waring, 2000). We measured precisely this space at stages 9-10 and found that oocyte and FC membranes do not separate uniformly. The perivitelline space become visible by confocal microscopy at late stage 9 around the lateral sides of the oocyte, while posterior oocyte and FC membranes remain tight, the difference between lateral and posterior membranes being accentuated at stage 10a (**Figure 1C,E**). We found that at early stage 10b, FC and oocyte membranes from the posterior-most region start to separate and the perivitelline space becomes finally homogenous all around the oocyte by late stage 10b (**Figure 1C,E**). Interestingly, the posterior region in which the oocyte and FC membranes remain in tight contact for longer correlates exactly with the *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte, raising the possibility of a requirement of physical contact between the oocyte and a sub-population of PFCs to achieve *oskar* mRNA anchoring. Altogether our results identified a new FC population that is a subset of PFCs, which consistently face the *oskar* mRNA anchoring zone in the underlying oocyte and correlates exactly with a region of tighter contact with the oocyte at stages 9 and 10 of oogenesis. We named this newly identified FC population in the follicular epithelium, the Posterior Anchoring Cells (PACs).

2) JAK-STAT pathway activity in the PACs is necessary for *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte

To find out what could distinguish the PACs from their neighboring cells in the follicular epithelium, we searched for signaling pathways that are active in these cells. The JAK-STAT pathway is activated in response to the Unpaired (Upd) ligand, which is exclusively secreted by PCs in all follicles throughout oogenesis. This creates a gradient with the highest signaling activity at follicle poles, and the lowest in the main body at the center of follicles (Xi et al., 2003). In early oogenesis stages, JAK-STAT activity reaches all FCs as follicles are small, but as they grow and elongate, signaling is not detected anymore in the main body (Mallart et al., 2022). We examined stages 8 to 10 follicles from hemizygous females carrying the 10XSTAT92E-GFP activity reporter (Bach et al., 2007), and we found that after JAK-STAT signaling becomes more restricted at the posterior pole (Mallart et al., 2022), active cells reach a radius of two FCs on each side of PCs at stage 9, which correlates exactly with the size of the PACs and so the size of the *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte (**Figure 2B-C**). Hence, the PACs can be characterized as facing the anchoring zone of the *oskar* mRNA posterior determinant in the oocyte, by a high JAK-STAT signaling activity, and a specific link between both, as illustrated by oocyte and PAC membranes being in tight contact longer than their neighboring PFCs.

JAK-STAT and EGFR signaling pathways are both necessary for PFC differentiation. It has been shown that Stau fails to localize at the posterior cortex of the oocyte in front of FCs defective for JAK-STAT signaling activity (Xi et al., 2003). This result was used as an argument to demonstrate that FCs fail to differentiate as PFCs in absence of JAK-STAT signaling and consequently fail to send the back signaling to the oocyte, which would trigger microtubule reorganization and the subsequent *oskar* mRNA posterior transport. In order to examine the effect of a decrease in JAK-STAT activity in the PACs in more details, we knocked-down *upd* in PCs using the *upd-Gal4* driver. In accordance to the above-mentioned study, we found that Stau posterior localization was affected in 43% of stage 10 follicles, with a range of phenotype expressivities (**Figure 2D-E**). Similar results were obtained with Oskar (data not shown). More interestingly, although PAC-oocyte membranes remain tight until late stage 10 in controls, we found that membranes were separated already at stage 9 in 90% of follicles in which JAK-STAT signaling was decreased (n = 22). Consequently, the separation between membranes in the perivitelline space was visible both in the posterior region and in the lateral region, as opposed to controls

which have a visible separation only in the lateral region at that stage (**Figure 2D, F**). These results therefore suggest that keeping membranes tight between the PACs and the oocyte could be a requirement for *oskar* mRNA posterior localization in such a precisely defined region. Finally, to better understand at which step the *oskar* mRNA posterior localization process is affected when JAK-STAT signaling is reduced, we looked at the localization of a Khc: β -Galactosidase (Khc: β -Gal) fusion protein as a reporter of microtubule polarity of the oocyte (Clark et al., 1994). This tool can be used to assess *oskar* mRNA transport since Khc is a microtubule motor protein required for transporting *oskar* mRNA towards microtubule plus-ends (Brendza et al., 2000) and *oskar* mRNA posterior localization is lost in *khc* mutants (Cha et al., 2002). As mentioned before, the oocyte microtubule network is reorganized after PFC differentiation with a slight bias of plus-ends toward the posterior pole (Parton et al., 2011; Zimyanin et al., 2007). Hence, Khc, which is localized at the posterior pole of the oocyte where it delivers *oskar* mRNA, is actually a readout of microtubule organization in the oocyte. We observed that the posterior localization of Khc: β -Gal in the oocyte evolves in a similar way as *oskar* mRNA, following the progressive restriction of the anchoring zone size between stages 9 and 10 (**Figure 2G-H**). At stage 10, Khc: β -Gal is localized in front of four FCs around PCs on average in controls, whereas the cortical area is strongly reduced and a subset of Khc: β -Gal is found at the center of the oocyte when JAK-STAT signaling is decreased in the follicular epithelium (**Figure 2G,I**). These results therefore demonstrate that JAK-STAT signaling in the PACs is necessary for Khc posterior localization in the facing oocyte and that Khc localization is restricted in size concomitantly with *oskar* mRNA. They also indicate that the microtubule network organization of the oocyte is affected when JAK-STAT activity is reduced, which likely accounts for the *oskar* mRNA posterior localization defects.

Altogether our findings demonstrate that *oskar* mRNA and Khc: β -Gal posterior localization in the oocyte are both restricted between stages 9 and 10, which occurs after JAK-STAT activity is restrained to fewer cells, the PACs, at posterior follicle poles. In addition, we uncover that JAK-STAT signaling pathway is necessary to keep the oocyte and PAC membranes tight, and to set the microtubule bias necessary to allow *oskar* mRNA transport toward the posterior cortex of the oocyte, suggesting that both processes could be linked.

3) JAK-STAT pathway activity in the PACs is sufficient for *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte

Is the restriction we observed in the number PACs and in the *oskar* mRNA anchoring zone important? To answer this question and investigate further the link between the number of PACs, characterized by active JAK-STAT signaling, the contact between PAC-oocyte membranes and *oskar* mRNA anchoring, we performed a JAK-STAT gain-of-function experiment. To this end, we overexpressed *hop^{tumoral}* (*hop^{TUM}*), an allele of the *hopscotch* (*hop*) gene containing a mutation resulting in the constitutive activation of the *Drosophila* JAK kinase Hop (Corwin and Hanratty, 1976; Luo et al., 1995), in PFCs with a specific posterior driver that starts to drive expression at stage 8 (*E4-Gal4*). This results in an increase of the JAK-STAT gradient strength and size. We found the cortical distribution of both Oskar (data not shown) and Stau to be affected in the oocyte in an opposite manner as in JAK-STAT knocked-down follicles (**Figure 3A**). Indeed, this time, not only the zone of *oskar* mRNA anchoring was larger, as assessed by an increased number of FCs facing *oskar* mRNA anchoring and an increased crescent diameter (**Figure 3B**), but the tight contact between PACs and the oocyte membranes was maintained in a larger region instead of being restricted as in controls. Note that this time, if both *oskar* mRNA anchoring and PACs-oocyte tight membranes increased, the two parameters do not correlate exactly in size. Indeed, in the gain-of-JAK-STAT signaling condition, *oskar* mRNA is anchored in a larger region than controls (3 FC radius around PCs instead of 2 in controls) but the region with tighter space between oocyte and PAC membranes extends even further (7 FC radius around PCs instead of 2 FC radius in controls). This is possibly due to a limiting amount of *oskar* available in the oocyte to reach the limits of the experimentally increased PAC zone. In conclusion, we observed a correlation in the JAK-STAT activity gradient, the *oskar* mRNA anchoring zone and the tightness of PAC-oocyte membranes in both loss and gain-of-function for JAK-STAT signaling, suggesting a link between these three parameters. In addition, our results demonstrate that JAK-STAT activity is both necessary and sufficient in the follicular posterior epithelium for *oskar* mRNA posterior determinant anchoring in the adjacent oocyte and that the restriction in the JAK-STAT activity

gradient is required to limit and define precisely the size of *oskar* mRNA anchoring zone.

4) Restricting *oskar* mRNA anchoring in front of the PAC is necessary for germ cell development of the future embryo

If the consequences that a loss of posterior determinant localization in the oocyte have on the development of the future embryo are well-known (Ephrussi et al., 1991; Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1986; Wang and Lehmann, 1991), whether increasing the size of the *oskar* mRNA anchoring zone impacts the future embryo has not been described, given that the phenotype we obtained in gain-of-JAK-STAT function has not been reported in other genetic conditions. Gain of *oskar* leads to a different phenotype, in that ectopic Oskar is found in an ectopic dot in the middle of the oocyte, but the size of the anchoring zone does not seem affected (Zimyanin et al., 2007). Hence, *oskar* is not sufficient to increase the size of its anchoring zone, suggesting that the latter parameter is rather defined from the follicular epithelium, by JAK-STAT signaling.

Is it important to restrict the size of *oskar* mRNA anchoring for the development of the future embryo? To answer that question, we let females displaying a gain-of-JAK-STAT activity in PFCs get fertilized and looked at their descendants. Embryos developed but their germline was affected in several ways (**Figure 3E-F**). Pole cells were found in excess in some embryos, and moreover, they did not migrate correctly inside most of embryos. In controls, pole cells start to migrate collectively before splitting in two groups forming the gonads at stage 13. Occasionally, individual pole cells detach from their group and get lost while migrating, but most of them remain associated in clusters until they reach their final destination at stage 14. In embryos coming from eggs in which *oskar* mRNA anchoring size was increased, the collective migration of pole cells or coalescence was strongly affected and an increased number of groups of lagging cells or individual lost cells were found, thus compromising the formation of the gonads. Similar phenotypes have also been reported in embryos presenting a gain of *oskar*, which is explained by the toxicity of an excess of *oskar* mRNA for pole cell development (Eichler et al., 2020; Smith et al., 1992). Our results thus demonstrate that restricting the zone of *oskar* mRNA

anchoring in the oocyte during oogenesis is crucial for regulating pole cell number and coalescence of the migrating cluster, which is essential to give rise to descendants with a functional germline.

5) The PACs are established by opposing actions of JAK-STAT and EGFR signaling on *shg* expression.

a) EGFR signaling inhibits *shg* expression in the follicular epithelium surrounding the oocyte

Having demonstrated that the restriction of *oskar* mRNA anchoring to a region facing the PACs is important for the development of the future embryo and that the PAC size is defined by the JAK-STAT signaling pathway, we wondered how the sharp PAC boundaries are established. Until stage 8, JAK-STAT signaling is active at follicle poles as a gradient. However, from stage 9, 10XSTAT92E-GFP reporter shows that the PACs display high JAK-STAT activity, but this activity decreases abruptly outside of the PACs (**Figure 2A**). We have previously shown that E-Cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling in oogenesis (Mallart et al., 2022). Interestingly, although E-Cadherin is present in the whole follicular epithelium, it is not evenly distributed. *shg* expression decreases at the posterior pole of follicles from stage 6, which is followed by a decrease in JAK-STAT signaling at stage 7, so they both remain active in a more restrained region around the posterior pole (Mallart et al., 2022). If the decrease in *shg* expression likely explains the decrease in JAK-STAT activity, what triggers this decrease in *shg* expression is not known. We noticed that the boundary of high/low *shg* expression in the posterior follicular epithelium, as visualized by a *shg-lacZ* transcriptional reporter and an anti-E-Cadherin antibody, coincide precisely with the oocyte anterior side, which is particularly striking at stage 8 (**Figure 4A-B**). Hence, FCs all around the oocyte, which correspond, from stage 6, to PFCs expressing the *pointed* (*pnt*) marker (**Figure 4A'**), display lower levels of E-Cadherin, suggesting that the oocyte could be a source of signal inhibiting *shg* expression. To test this hypothesis, we examined follicles in which the oocyte is mis-localized, which is the case when the germline is deficient in E-Cadherin, as E-Cadherin is required in both germ cells and FCs to

anchor the oocyte to the posterior region of the follicles from the germarium stage (Godt and Tepass, 1998; González-Reyes and St Johnston, 1998). Remarkably, when we knocked-down *shg* in the germline using the *nos-Gal4* driver, leading to oocyte mispositioning, the decrease in E-Cadherin detection in the follicular epithelium followed the position of the oocyte in the underlying tissue (**Figure 4C**). Wherever the oocyte was localized in the egg chamber, a decrease in E-Cadherin detection in the follicular epithelium was observed all around the oocyte position (n = 33), suggesting that the oocyte inhibits *shg* expression.

As the oocyte is the source of Grk, which activates the EGFR signaling pathway in FCs at stage 6, thus triggering PFC differentiation, we reasoned that the decrease in E-Cadherin accumulation could be also set in response to EGFR signaling, giving that both events correlate in space and time. To test this hypothesis, we examined *grk* mutant follicles (n=29) and observed that they were all symmetric in terms of E-Cadherin accumulation, with no posterior decrease being detected anymore (**Figure 4D**), suggesting that EGFR signaling regulates negatively E-Cadherin levels. To confirm our results, we induced the formation of clones expressing a RNAi against EGFR to decrease signaling activity, and, strikingly, E-Cadherin levels were increased in a cell-autonomous manner in all clones located in the posterior follicular epithelium (n=57, **Figure 4E**). Hence, our findings demonstrate that EGFR signaling is a negative regulator of E-Cadherin from stage 6 onward, which contributes to set the PAC zone boundaries (**Figure 4F**).

b) A positive feedback loop between JAK-STAT signaling and *shg* expression is required to set the PAC zone boundaries

Given that E-Cadherin is a JAK-STAT activity regulator, we propose that the decrease in E-Cadherin is then translated into a decrease in JAK-STAT activity, which explains the origin of the asymmetry in JAK-STAT signaling and in E-Cadherin we have characterized before (Mallart et al., 2022). To confirm that E-Cadherin is indeed a regulator of JAK-STAT signaling in the posterior region between stages 8-10, we overexpressed *shg* in PFCs using the *E4-Gal4 driver* in females carrying the 10X-STAT-GFP reporter, which led to an increase in GFP levels and in the number of PFCs expressing the JAK-STAT activity reporter, thus reflecting a corresponding

increase in JAK-STAT activity (**Figure 5A-B**). E-Cadherin is therefore sufficient to activate JAK-STAT signaling at the posterior pole of follicles.

As mentioned before, the posterior-most region of the egg chambers displays a few FCs with high E-Cadherin levels in an otherwise low E-Cadherin environment. Interestingly, the size of this region of high E-Cadherin levels also corresponds to the PACs. Hence, if the decrease in *shg* expression around the oocyte can be explained by the negative regulation exerted by the EGFR signaling pathway, which subsequently triggers a decrease in JAK-STAT signaling activity, a question that remains is what keeps E-Cadherin levels high specifically in the PACs? The fact that the JAK-STAT pathway is active exactly in these cells and since *shg* has been described as a JAK-STAT signaling target in border cells (Silver and Montell, 2001), another specific FC population, prompted us to investigate whether *shg* could be a JAK-STAT target in the PACs. We thus decreased JAK-STAT signaling by targeting a RNAi against *upd* in PCs and examined the effect on the *shg-lacZ* transcriptional reporter. The highest expression of the reporter is detected in PCs throughout oogenesis, consistently to its reported pattern of expression (Niewiadomska et al., 1999). At stage 10, *shg-lacZ* is also detected in a two FC radius around PCs in homozygous individuals, corresponding to the PACs, and only one FC radius around PCs in heterozygous individuals (**Figure 5C-E**). When *upd* levels were reduced, no more FCs around PCs expressed the reporter that was only detected in PCs, indicating that JAK-STAT signaling is required to activate *shg* expression in a subset of PFCs in which signaling is the highest (**Figure 5A'**). To confirm this result, we performed the reverse experiment by expressing *hop^{TUM}* in PFCs with the *E4-Gal4* driver to activate constitutively JAK-STAT signaling in these cells. In this condition, more PFCs around PCs presented high E-Cadherin levels as compared to controls, showing that E-Cadherin levels respond positively to JAK-STAT signaling activity (**Figure 5E**). In summary, our data show that JAK-STAT signaling activates *shg* expression at the posterior pole from stage 7, which is likely translated into a further increase in JAK-STAT signaling activity, since E-Cadherin is a positive regulator of JAK-STAT signaling (Mallart et al., 2022) and we have shown here that JAK-STAT signaling respond to *shg* in PFCs. Our results therefore suggest that these regulatory events set up a positive feedback loop between JAK-STAT and E-Cadherin in posterior follicles from stage 7, counteracting the previous inhibition on *shg*

expression exerted by EGFR signaling. This reciprocal activation thus maintains high levels of JAK-STAT signaling and E-Cadherin, in this way defining very precisely the PACs (**Figure 5F**). Together, our results show that an interplay between JAK-STAT and EGFR signaling pathways, having opposite effects on *shg* expression, is required to set up the number of PACs to allow *oskar* mRNA anchoring to a region of the oocyte posterior cortex with sharp boundaries.

6) *shg* expression is required in the PACs to maintain epithelium integrity and allow proper *oskar* mRNA anchoring in the oocyte

Having identified that *shg* is expressed precisely in the PACs and is both a regulator and a target of JAK-STAT signaling in that region, we wondered whether its activity is also required for the PAC function, that is for *oskar* mRNA anchoring. We thus decreased E-Cadherin levels in the follicular epithelium by driving a RNAi against *shg* using the *fruitless-Gal4 (fru)* driver and assessed Stau localization in stage 10 follicles. Stau (**Figure 6A-B**) and Oskar (data not shown) posterior localization was affected in 90% (n=30) of follicles with a range of phenotype expressivities. Weak phenotypes were observed when Stau anchoring defects to the oocyte posterior cortex led to a blurry distribution, with a wider and less defined crescent instead of the tight crescent seen in controls, whereas strong phenotypes were characterized by a partial lack of Stau staining in the region facing the PACs, or a translation to a more lateral position. We also noticed that cell shapes in the PAC zone were affected to varying degrees when *shg* levels were reduced. PACs were often shorter instead of the cuboidal shape observed in control cells in this region and were more packed, leading to a decrease in their apical surface that is in contact with the oocyte, thus affecting the overall follicular epithelium regular shape. It is of note to report that this abnormal cell morphology phenotype is only observed from stage 9. Interestingly, when Stau localization was shifted from the pole to a more lateral position, it correlated with the degree of PAC shape defects, so Stau would preferentially localize in front of cells that were less disturbed, with no Stau anchoring at all in front of the most affected PACs (cells indicated with blue stars in **Figure 6A**). Note that these morphological cell shape changes in *shg* knocked-down stage 9-10 follicles impede the assessment of E-Cadherin contribution to the perivitelline space

width as these defects likely have indirect consequences on the oocyte-PAC interface, which appears actually tighter than in controls. In conclusion, our results show that *shg* is required in the PACs for correct *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte and for correct PAC morphogenesis.

To further examine the PAC shape defects caused by reduced E-Cadherin levels, we looked at Laminin A localization in the follicular epithelium. Indeed, Laminin A is a major component of the extra-cellular matrix (ECM) that is found basally in the follicular epithelium, and is secreted by FCs. It is therefore a marker of apico-basal polarity and, in addition, *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte is lost in absence of *laminin A* (Deng and Ruohola-Baker, 2000). Furthermore, it has been shown that ectopic apical Laminin A is found between cells overexpressing Dystroglycan and the oocyte, and *oskar* mRNA posterior localization is lost in the oocyte cortex facing these mutant cells (Poulton and Deng, 2006). Similarly, we found some ectopic apical Laminin A between the PACs and the oocyte in follicles with reduced levels of E-Cadherin, in addition to its expected basal localization (**Figure 6C**). This phenotype was particularly clear in cases of cells whose shape was more severely affected. *shg* is therefore required to maintain proper apico-basal polarity of the PACs from stage 9 of oogenesis.

Finally, to find out at which step of the cascade leading to *oskar* mRNA posterior localization *shg* is involved, we reduced E-Cadherin levels in the follicular epithelium and looked at Dhc, as this microtubule motor subunit colocalizes with Khc at the posterior poles of oocyte (Li et al., 1994; Sanghavi et al., 2013). If *dhc* is not involved in *oskar* mRNA posterior localization, it is absent of the posterior pole of the oocyte in *khc* germline clones, and can therefore be used as a readout of Khc posterior localization and of microtubule cytoskeletal polarization of the oocyte (Palacios and St Johnston, 2002). When E-Cadherin levels are reduced, we did not observe major changes in Dhc posterior localization in the oocyte (**Figure 6D**), indicating that microtubule organization in the oocyte is not affected and that the defects observed in *oskar* localization are more likely due to deficient anchoring to the oocyte cortex rather than defective transport along microtubules. Altogether, our findings identify E-Cadherin as a new player involved in *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte, presumably through the regulation of cell shape morphogenesis and PAC polarity.

7) ***shg* is sufficient to determine the PAC zone size and is acting downstream of JAK-STAT signaling**

Since JAK-STAT signaling and *shg* are both necessary for *oskar* mRNA anchoring to the region of the oocyte facing PACs, we wished to find out whether *shg* is, like JAK-STAT signaling, also sufficient to define *oskar* mRNA anchoring zone size. To this end, we overexpressed *shg* using the *E4-Gal4* driver to increase the number of PFCs expressing *shg*, and assessed *oskar* mRNA localization by staining follicles with an anti-Stau antibody. We found that the gain-of-*shg* leads to an increased size of the *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte with 2 more cells on average in the radius of FCs around PCs facing *oskar* mRNA localization, and increased PAC diameters (**Figure 7A-B**). In addition, tight contact between PFC and the oocyte membranes was maintained in a larger region than in controls when the number of PFCs expressing *shg* was increased, suggesting that more PACs differentiate in the posterior region upon *shg* overexpression (**Figure 7A,C**). Hence, increasing the number of PFCs with high E-Cadherin levels leads to the maintenance of a larger *oskar* mRNA anchoring zone after stage 9 instead of the restriction observed in controls. Our results thus demonstrate that *shg*, like JAK-STAT signaling, is both necessary and sufficient to define the number of PACs and that the restriction of *shg* expression is required to allow the correct localization of *oskar* mRNA in a limited region of the facing oocyte posterior cortex.

Finally, given that modulating JAK-STAT activity and *shg* expression affect *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte, we wondered whether JAK-STAT was acting through *shg* to mediate these functions. To test this hypothesis, we overexpressed *shg* in PFCs with the *E4-Gal4* driver in follicles in which JAK-STAT activity was also decreased by targeting a RNAi against *upd* in PCs. In this condition, the defects in Stau anchoring normally observed in *upd* knock-down follicles were largely rescued in all the considered parameters: the number of PACs, that is the number of FCs around PCs facing the *oskar* mRNA anchoring zone, the diameter of the PACs, and the expressivity of the different Stau defect phenotypes (**Figure 7D-E**). Remarkably, the perivitelline space area, which is increased between PACs and oocyte when JAK-STAT activity is reduced, was also largely rescued by the ectopic

expression of *shg* (**Figure 7D,F**). Together, our results therefore demonstrate that *shg* is necessary and sufficient in the follicular epithelium for *oskar* mRNA posterior localization in the underlying oocyte and that *shg* is acting downstream of the JAK-STAT signaling pathway in this process.

DISCUSSION

Our novel findings demonstrate that the PACs, a newly identified subpopulation of PFCs, are necessary and sufficient to restrict the transport and anchoring of the *oskar* mRNA cytoplasmic determinant to a defined region of the oocyte posterior cortex, which is surrounded by the follicular epithelium. The localized anchoring of *oskar* mRNA is crucial for the establishment of the anterior-posterior axis of the future embryo. Our results reveal that the *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte is ensured by the adjacent tissue, the follicular epithelium, through opposite actions of Grk/EGFR and the JAK-STAT signaling pathways on *shg* expression in the follicular epithelium. If E-Cadherin regulates the JAK-STAT pathway during oogenesis (Mallart et al., 2022), we show here that *shg* is also a target of JAK-STAT signaling in PACs from stage 7 of oogenesis. Likewise, E-Cadherin expression is also reduced in *Stat92E* mutant BCs, presumably through a decrease in the expression of the *slbo* JAK-STAT signaling target which regulates *shg* expression, and *Stat92E* and *shg* interact genetically in BC migration (Inaki et al., 2022; Mathieu et al., 2007; Niewiadomska et al., 1999; Silver and Montell, 2001). We propose that this crosstalk between E-Cadherin, EGFR and JAK-STAT signaling pathways occurring between stages 6 and 10 is necessary to establish and maintain a precise number of PACs, which is an essential step to mediate localization and anchoring of posterior determinants in the oocyte. Our findings reveal that this crosstalk occurs as follows: first, Grk is emitted from the oocyte at stage 6-7 to activate EGFR signaling in the follicular epithelium, which inhibits *shg* expression around the oocyte, at the posterior pole of follicles. Consequently, JAK-STAT activity decreases in the same region, in response to decreased E-Cadherin accumulation, leading to asymmetric JAK-STAT activity in follicles from stage 7. Hence, high JAK-STAT activity is only found in a few cells around PCs, the PACs, leading to an increase in *shg* expression in these cells. A positive feedback loop between JAK-STAT signaling and E-Cadherin is therefore established in these cells, which contributes to define the PAC zone sharp borders required for *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte.

A localized or physical trigger rather than a diffusible signal

Around 30 years ago, the existence of the back signaling emanating from PFCs after their differentiation in response to Grk signaling to instruct the oocyte to set up anterior-posterior polarity was postulated (González-Reyes and St Johnston, 1994; González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995; Ruohola et al., 1991). To date, however, this intriguing signal has still not been identified, despite numerous attempts by different laboratories (Chen and Schüpbach, 2006; Deng and Ruohola-Baker, 2000; Laplante and Nilson, 2006; Pai et al., 2000; Sun et al., 2011; Wittes and Schüpbach, 2019; Yan et al., 2009). Although, at first, hypotheses about the back signaling evoked a chemical signal emanating from PFCs, mosaic analysis of PFCs mutant for different genes have shown that the posterior localization of *oskar*/Stau could be lost in front of mutant cells but maintained in front of the adjacent wild-type PFCs (Frydman and Spradling, 2001; Poulton and Deng, 2006; Sun et al., 2011; Xi et al., 2003). These clonal situations, also called CAM for Clone Adjacent Mislocalization, suggest that the trigger coming from PFCs is rather physical as a chemical signal would be more likely to disperse in the oocyte, which is just one cell. It has also been hypothesized, although not demonstrated, that the stronger adhesion the oocyte presents for FCs located at the posterior of follicles allowing its own posterior anchoring, could somehow trigger directly the rearrangement of the microtubule cytoskeleton, not needing to invoke a chemical signal (López-Schier, 2003; Poulton and Deng, 2007). Our novel findings demonstrate that membranes from the oocyte and the PACs need to remain tight in a very defined region that become restricted between stages 9 and 10 to allow *oskar* mRNA posterior defined localization in the oocyte. This tight contact is controlled by JAK-STAT signaling as oocyte-PAC membranes appear more separated when JAK-STAT activity is reduced, impeding the posterior *oskar* mRNA transport and anchoring. In addition, we observed that *oskar* mRNA anchoring stops exactly in front of lateral PAC-non PAC junction, so the whole apical PAC membrane seems to be involved in the *oskar* mRNA localization. Our results therefore reinforce the hypothesis that the back signaling involves a physical contact between FCs and the oocyte rather than a diffusible signal. Also fitting with our model is a recent study deposited on BioRxiv, showing that the tight space between FCs and the oocyte membranes is required to maintain Par-1 at the posterior pole of the oocyte. This was shown by physically

separating the FC-oocyte membranes, which leads to the premature loss of Par-1 posterior localization, and Par3/Bazooka being found all around the oocyte cortex (Milas et al., 2022). Altogether, this latter study and our findings unravel that the tight membrane space between the oocyte and the PACs is required early in the process of anterior-posterior polarity establishment.

Uncoupling nucleus migration and posterior determinant localization

It is believed that the back signaling triggers a reorganization of the microtubule network polarity in the oocyte, which has two main consequences: the nucleus migration from the posterior toward the antero-dorsal cortex of the oocyte and the delivery and anchoring of the posterior determinant *oskar* mRNA at the posterior cortex. It is possible that linking these two events as a readout of efficient back signaling has been misleading and impeded its identification. We did not observe nucleus migration defects when JAK-STAT signaling was reduced although it did impact *oskar* mRNA posterior localization and the reorganization of the oocyte microtubule network. In several other circumstances, *oskar* mRNA posterior localization and the oocyte nucleus migration have actually also been uncoupled. For instance, although Par-1 is an essential actor of microtubule reorganization, which must be localized to the posterior pole of the oocyte for *oskar* mRNA polarized transport and anchoring, nucleus migration is not affected in *par-1* mutants, in which anterior-posterior polarity is nonetheless compromised (Shulman et al., 2000). In addition, in some conditions affecting *oskar* mRNA posterior localization, such as in follicles bearing large mutant clones for *hop* (Xi et al., 2003) or for *lamininA*, encoding a component of the ECM that also triggers *oskar* mRNA posterior localization in the oocyte from the follicular epithelium (Deng and Ruohola-Baker, 2000), nucleus migration is only very rarely affected. It has been proposed that the migration of the nucleus would be actually triggered by the release of the nucleus from a posterior anchor in response to the back signaling, rather than by microtubule reorganization, which would also argue in favor of uncoupling nucleus migration required for dorso-ventral polarity from *oskar* mRNA posterior localization that is the necessary to the establishment of anterior-posterior polarity (Zhao et al., 2012). Finally, nucleus migration is a more complex process than it seemed initially, and live imaging revealed that the oocyte nucleus can take different paths to reach its antero-dorsal

final destination. Moreover, the robustness of this process is ensured by various mechanisms. While growing microtubules nucleating at centrosomes located at the posterior pole of the oocyte push the nucleus (Zhao et al., 2012) to drive one migratory path, another mechanism involving the microtubule-associated protein Mud/nuMA at the posterior side of the nuclear envelope is providing the possibility of an alternative route (Tissot et al., 2017), which is thus independent of the microtubule reorganization triggered by the back signaling. It is therefore possible that when JAK-STAT signaling is reduced, oocyte and PAC membranes tight contact is not maintained long enough to allow the microtubule cytoskeleton reorganization of the oocyte and the subsequent *oskar* mRNA transport toward the posterior pole. However the oocyte nucleus could still migrate through the Mud/nuMA-related path, explaining why we do not observe nucleus migration defects although the microtubule cytoskeleton and anterior-posterior polarity establishment are compromised. Accordingly, oocytes without centrosomes can proceed through oogenesis and their nuclei can still migrate, although with a decreased velocity, to reach the final antero-dorsal position (Stevens et al., 2007; Tissot et al., 2017).

Multiple processes controlled by JAK-STAT signaling organize anterior-posterior polarity

If we do not invalidate the existence of the back signaling, we believe that it is actually much more complex than what was initially thought. In the assumed model, one signal is sent by PFCs to the oocyte and then a cascade of events occurs in the oocyte to establish anterior-posterior polarity. We now propose a model in which specialized FCs are acting reiteratively and in different ways to instruct the oocyte to be polarized and anchor posterior determinants. On one hand, a signal is sent from PFCs to trigger nucleus migration (or to release the nucleus posterior anchor), but robustness of the nucleus migration process ensures that the nucleus can still migrate in absence of this signal, and on another hand an independent round of back signaling is sent to define the *oskar* mRNA anchoring zone through the PACs. This second part is, we believe, orchestrated by the JAK-STAT signaling pathway.

In our new model, JAK-STAT signaling would actually be acting from the follicular epithelium on multiple processes that eventually lead to *oskar* mRNA posterior localization in the underlying oocyte via several mechanisms. First, as it has been

previously shown (Xi et al., 2003), JAK-STAT activity is required to determine PFC fate at stage 6. Between stages 7 and 9, JAK-STAT activity gradient size is restricted, allowing the differentiation of a precise number of PACs, a sub-population of PFCs. These cells play a crucial role in maintaining a tight contact with the oocyte, which allows the restriction of the size of *oskar* mRNA posterior localization to a defined region of the oocyte cortex, as we demonstrate in the present study. We showed that PACs are characterized by high levels of *shg* expression, high JAK-STAT signaling and a tight contact with the oocyte, facing the exact region of *oskar* mRNA localization. We demonstrated that JAK-STAT regulates the size of this zone with tight contact, which we propose thereby allows the precise Par-1 localization in the oocyte (Milas et al., 2022). Par-1 subsequently reorganizes the microtubule cytoskeleton with a bias of plus-ends towards the posterior pole, leading to *oskar* mRNA polarized transport, which is supported by our finding that Khc posterior localization is defective when JAK-STAT activity is reduced. Our gain-of-function experiments then argue for a distinct and additional role of JAK-STAT signaling in *oskar* mRNA anchoring. Both JAK-STAT activity and *shg* gain-of-functions are sufficient to increase the size of the *oskar* mRNA posterior crescent by increasing the number of PACs, which maintains more FCs in tight contact with the oocyte. As *shg* and *hop*^{TUM} overexpressions are driven with the late *E4-Gal4*, which expression starts at stage 8, when PFC differentiation is already finished, this result suggests that the size of the anchoring zone can be modulated by JAK-STAT signaling, through the regulation of *shg* expression, after *oskar* mRNA transport has started. This also supports the idea that two regions can be distinguished at follicle posterior poles in that they receive different quantities of JAK-STAT signaling and at different stages: PFCs are differentiated in a larger region (with an average of 200 cells), and PACs, which differentiate later, located at the center of PFCs, are 10 times less numerous (with an average of 20 cells). Interestingly, our findings are also supported by the single-cell transcriptomic analysis of ovary that identified two cell populations at the posterior of follicles at stage 8 (Slaidina et al., 2021). JAK-STAT signaling, in our model, like it does in anterior follicles at stage 8 when signaling activity defines 3 cell types depending on the distance to the Upd source (border, stretched and centripetal cells), would also present morphogen activity at the posterior poles of follicles. This would be achieved by first inducing PFC differentiation and then defining the PACs in a more restricted region where JAK-STAT signaling activity is the highest.

In summary, we propose that JAK-STAT signaling have multiple roles in the follicular epithelium for the establishment of anterior-posterior polarity in the underlying oocyte, presumably through different effectors, by triggering: PFC fate differentiation, PAC fate differentiation allowing to keep FC and oocyte membranes tight, which leads to the reorganization of the microtubule cytoskeleton and *oskar* mRNA transport to the posterior pole of the oocyte, apico-basal PAC polarity controlled by the expression of *shg*, and regulation of the size of the *oskar* mRNA anchoring zone. JAK-STAT signaling therefore orchestrates a series of events all required to ensure the posterior localization of maternal determinants and thus the establishment of the anterior-posterior axis, which is essential to the development of the future embryo.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *oskar* mRNA anchoring zone faces a precise number of PFCs, which maintain a tight contact with the oocyte.

In all images and drawings, posterior is to the right. All images, except B', are one confocal section passing through PCs (yellow stars). **(A)** Schematic drawing of an ovariole, with the germarium and follicles at various stages, indicating the different cell types. From stage 9, Staufen (Stau) and Oskar localization is illustrated in pink. **(B,C)** Follicles from control females (*fruitless-Gal4/+*) with F-Actin (grey, phalloidin), to visualize cell cortexes. DNA in cyan (DAPI). Staufen in "fire" filter (from purple, low intensity, to orange, high intensity). **(B)** Stage 10a follicle. **(B')** 3D projection of DNA staining at the posterior pole shows the organization of the PFCs around PCs and highlights the first two rows, called PC+1 (orange) and PC+2 (green). **(C)** Only posterior regions of follicles are shown, *oskar*/Staufen Anchoring Zone (AZ, pink dotted rectangle) and adjacent lower lateral region (white dotted rectangle) are magnified. Orange and green stars show PC+1 and PC+2 rows. Boundaries of the AZ on oocyte and FC sides are indicated by pink and white arrowheads respectively. "Tight" and "Spaced" are guides for the evolution of the space between oocyte and apical PFC (oo-PFC) membranes. **(D)** Quantifications of the size of the AZ through the number of FCs around PCs facing Staufen signal and the diameter of the crescent. **(E)** Quantification of the space between oocyte and PFC membranes. Blue lines are visual guides. Stars, organized in the same order as the curves, indicate statistically significant differences between the PAZ and adjacent zone 2 at all stages. **(F)** Schematic representation of a stage 10a follicle posterior part (section view) illustrating the correlation between *oskar*/Staufen AZ at the PAZ (purple) and the tight contact between oocyte (blue line) and PFC membranes in front of PCs, PC+1 and PC+2 rows. The pole view illustrates the extent of *oskar*/Staufen AZ around PCs.

nc: nurse cells oo: oocyte fc: follicle cells bc: border cells sc: stretch cells cc: centripetal cells. St: stage. #: number. ns: non significant. Statistical tests: (D) # of FCs around PCs: Mann-Whitney. (D) Diameter and (E): unpaired t-test. Stars indicate statistically significant differences. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Scale:

30 μ m except magnifications 15 μ m. Number of posterior poles analyzed: (D) St9 n=13; St10a n=17; Early St10b n=17; Late St10b n=14. (E) Number of mean space measurements on each side of PCs: St9 n=24; St10a n=54; Early St10b n=50; Late St10b n=16.

Figure 2. JAK-STAT activity gradient is restricted to the PACs and is necessary to define the size of *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte.

In all images and drawings, posterior is to the right and only follicle posterior regions are shown. All images are one confocal section or z-projections (A, sum of 5 ; G lower images, max of 2) of confocal sections passing through PCs (yellow stars) of stage 10a follicles, except otherwise indicated. Orange and green stars indicate rows PC+1 and PC+2 respectively. **(A)** Follicle from *10XSTAT92E-GFP* hemizygous females. DNA in grey (DAPI) and GFP in “royal” filter. The blue dotted lines delimit JAK-STAT signaling gradient in PFCs. **(B)** Mean number of GFP-positive (GFP+) PFCs in *10XSTAT92E-GFP* hemizygous females. **(C)** Schematic representation of a stage 10a follicle posterior part (section view) illustrating the correlation between *oskar*/Staufen AZ and JAK-STAT active PFCs and their extent around PCs (dark and light pink for PC+1 and PC+2 rows respectively). **(D)** Follicles from control (*w1118*) and in *upd* knockdown (KD, *upd>upd-RNAi*) conditions. The PACs (pink dotted rectangle) and adjacent PFCs (white dotted rectangle) are magnified. F-Actin in grey (phalloidin), to visualize cell cortexes. DNA in cyan (DAPI). Staufen in “fire” filter (Stau, from purple, low intensity, to orange, high intensity). Boundaries of the PAZ in the oocyte are indicated by pink arrowheads. “Partial” refers to the presented Staufen localization phenotype, here detected both in a smaller AZ and in the oocyte cytoplasm (pink arrow). “Tight” and “Spaced” are guides to compare the space between oocyte and PFC membranes in both conditions. **(E)** Diagram presenting the proportion for each Stau localization phenotypes observed in *upd>upd-RNAi* stage 10 follicles. Not anchored: dot in the oocyte cytoplasm. Ectopic: at the membrane but away from the PAZ. Smaller PAZ: size <4 PFCs and <30 μ m. Partial: both smaller AZ and not anchored phenotypes. Those defects were never observed in control condition (n=11). **(F)** Quantification of the space between oocyte and PFC membranes in control and *upd* KD conditions. Connecting curves are visual guides. **(G)** Follicles from females expressing *Khc::LacZ* in control (*Khc::LacZ;upd>*) and in

upd knockdown (*Khc::LacZ;upd>upd-RNAi*) conditions to assess global cortical microtubule network polarity in the oocyte. β -galactosidase (β gal) in “royal” filter. DNA in grey (DAPI). The “Partial” colored box refers to the presented *Khc:: β gal* localization phenotype, here detected both in a smaller crescent at the AZ (blue arrowhead) and dispersed in the oocyte cytoplasm (blue arrow) **(H)** Quantification of the size of *Khc:: β gal* crescent at the PAZ in control condition (*Khc::LacZ;upd>*). **(I)** Diagram presenting the proportion for each *Khc:: β gal* localization phenotypes observed in *Khc::LacZ;upd>upd-RNAi* stage 9 and 10 follicles. Dispersed: in the oocyte cytoplasm. Partial: both smaller crescent (size <4 PFCs) and not anchored phenotypes. Those defects were never observed in control condition (n=17).

St: stage. #: number. ns: non significant. Statistical tests: (B, F) Unpaired t-test. Stars indicate statistically significant differences. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Scale: 30 μ m except magnifications 15 μ m. n: Number of posterior poles analyzed. (B) Late St8 n=22; St9 n=21; St10 n=7. Number of mean space measurements on each side of PCs: (F): control (*upd-Gal4/+* and *upd-Gal4/+;shg-LacZ/+*) St9 n=22; St10a n=45. *upd>upd-RNAi* (*upd-Gal4/+;upd-RNAi/shg-LacZ* and *upd-Gal4/+;upd-RNAi/+*) St9 n=22; St10a n=41.

Figure 3. JAK-STAT pathway activity in the PACs is sufficient to control the size of the *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte.

In all images and drawings, posterior is to the right. Only follicle posterior regions are shown. Yellow, orange, green and red stars indicate PCs and rows PC+1, PC+2 and PC+3 respectively. **(A)** Follicles at stage 10a of oogenesis from control females carrying only the *E4-Gal4* (*E4>*) driver and females expressing *UAS-hop^{TUM}* in PFCs with the *E4-Gal4* driver. One confocal section together with magnifications of the PACs and adjacent PFCs (PACs = pink dotted rectangle, PFCs = white dotted rectangle). F-Actin (grey, phalloidin), to visualize cell cortexes. DNA in cyan (DAPI). Staufen in “fire” filter (Stau, from purple, low intensity, to orange, high intensity). Boundaries of the AZ in the oocyte are indicated by pink arrowheads. “Tight” and “Spaced” are guides to compare the space between oocyte and PFC membranes in both conditions. The white arrowhead highlights the frontier between rows PC+7 and

PC+8 where oocyte and PFC membranes start to separate. Quantifications **(B)** of the size of the AZ through the number of FCs around PCs facing Staufén signal and the diameter of the crescent and **(C)** of the space between oocyte and PFC membranes in control condition and when *UAS-hop^{TUM}* is expressed in PFCs. In (C) grey and pink connecting curves are visual guides. **(D)** Embryos from control females and *E4>hop^{TUM}* females. Max z-projection showing vasa in black to identify the pole cells. Orange stars: gonads with normal number of pole cells. Brown star: gonad with an abnormally low number of pole cells (light). Brown arrowheads: lost pole cells. Quantification **(E)** of the number of pole cells in stage 5 and stage 8 to 12 embryos and **(F,F')** of the number of pole cells in stage 13-14 embryos in the gonads (F) and outside of the gonads ("lost", F'). The numbers within the bars indicate the percentage of embryo in each indicated category.

St: stage. #: number. Statistical tests: (B) # of FCs around PCs: Mann-Whitney. (B) Diameter and (C): unpaired t-test. (D,F) Fisher's exact test performed by combining embryos in light and dark brown categories and embryos in light and dark orange categories. Stars indicate statistically significant differences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Scale: 30 μ m except magnifications 15 μ m. (B) Number of posterior poles analyzed: *E4>* St9 n=13; St10a n=14; Early St10b n=16; Late St10b n=14. *E4>hop^{TUM}* St9 n=8; St10a n=14; Early St10b n=7; Late St10b n=5. (E) Number of mean space measurements on each side of PCs: *E4>* St10a n=46; Early St10b n=14. *E4>hop^{TUM}* St10a n=38; Early St10b n=18. Number of embryos analyzed: (D) *E4>* n=22. *E4>hop^{TUM}* n=39. (F,F') *E4>* n=13. *E4>hop^{TUM}* n=30.

Figure 4. E-Cadherin levels decrease in PFCs in response to the Grk/EGFR signaling pathway.

In all images and drawings, posterior is to the right. Yellow stars indicate PCs. **(A,A')** Follicles at stage 7 of oogenesis from *shotgun-LacZ* (*shg-LacZ*, A) and *pointed-LacZ* (*pnt-LacZ*, A') hemizygous females. One z-section. F-Actin in white (phalloidin), to visualize the limits of the oocyte anterior side (white stars) and beta-galactosidase (β gal) in "red hot" filter (from red, low intensity, to orange, high intensity). White arrowheads indicate the frontiers between FCs expressing low and high levels of *shg*

(A, n=19) and *pnt* (A', n=17). n: number of stage 6-7 follicles analyzed. **(B-D)** Max z-projections of E-Cadherin (Ecad, “magenta hot” filter, from magenta, low intensity, to white, high intensity) immunostaining in stage 8 follicles. Yellow and blue dotted rectangles indicate magnified zones of the follicular epithelium contacting or not the oocyte, respectively. The white dotted lines indicate the nurse-oocyte frontier. **(B)** Control follicle (same females as in A). **(C)** Follicle with the mispositioned oocyte phenotype from a female expressing a RNAi against *shg* in germ cells (*nanos*-Gal4 driver, *nos*). **(D)** Follicle from a female mutant for *grk* (*grk*-). Note the clear difference in Ecad levels between both sides of the nurse-oocyte frontier in (B) and (C) and its loss in (D). **(E)** Clone cells (GFP positive, green) expressing a RNAi against *EGFR* (#31526, similar phenotypes were obtained with the second RNAi line #107130) within a wild type epithelium (GFP negative FCs). Green dotted lines: clone cells in contact with the oocyte. **(F)** Schematic representation of the decrease of E-Cadherin expression in FCs in contact with the oocyte in answer to Grk from the oocyte.

Scale: 30µm except magnifications 10µm. All phenotypes illustrated in (C-E) were observed in 100% of stage 7-10 follicles analyzed. (C) n=33. (D) n=29. (E) total counting with both RNAi line n=57.

Figure 5. *shg*, encoding E-Cadherin, is a regulator and a target of the JAK-STAT signaling pathway in the PACs.

In all images and drawings, posterior is to the right. Only follicle posterior regions are shown, and the PAZ (pink dotted rectangle) are magnified. Yellow, orange, green and stars indicate PCs and rows PC+1, PC+2 and PC+3 respectively. **(A-B)** Follicle from *10XSTAT92E-GFP* hemizygous females carrying the *E4*-Gal4 driver only (*10XSTAT92E-GFP;E4>*) and expressing *UAS-shg* in PFCs with the *E4*-Gal4 driver (*10XSTAT92E-GFP;E4>shg*). DNA in grey (DAPI) and GFP in “royal” filter. The blue dotted lines delimit JAK-STAT signaling gradient in PFCs. Mean numbers of GFP-positive (GFP+) PFCs in both conditions are presented in (B). **(C)** Follicles from females carrying the *shg-LacZ* reporter (hemizygous) in control condition (*shg-LacZ/+*) and in *upd* knockdown (KD) condition (*shg-LacZ;upd>upd-RNAi*). One z-section. F-Actin in white (phalloidin) to visualize cell cortexes. DNA in cyan (DAPI).

Beta-galactosidase (β gal) in "red hot" filter (from red, low intensity, to orange, high intensity). White arrowheads highlight the strong E-Cadherin expression in centripetal cells in both conditions. **(D)** Quantification of the number of *shg-LacZ* expressing PFCs around PCs in females homozygous or hemizygous for the transgene in control condition and females hemizygous for the transgene in *upd* KD condition. **(E)** Follicles from females carrying the *E4-Gal4* driver (*E4>*) and expressing *UAS-hop^{TUM}* in PFCs with the *E4-Gal4* driver (*E4> hop^{TUM}*). Max projection of 4 z-sections. E-Cadherin (Ecad) in "magenta hot" filter (from magenta, low intensity, to white, high intensity). White arrowheads point the frontiers between FCs with high and low E-Cadherin accumulation. **(F)** Schematic representation of the crosstalk between Grk/EGFR and JAK-STAT pathways to restrict E-Cadherin expression in PFCs highlighted by the results presented in figure 4 and this figure. In answer Grk/EGFR signaling, *pnt* is expressed in PFCs and in the same cells, E-Cadherin expression decreases. This leads to JAK-STAT pathway gradient progressive restriction from stages 7 to 9 (Mallart *et al*, 2022) to only rows PC+1 and PC+2. In those cells, an amplification loop is set between the JAK-STAT pathway and E-Cadherin. The pole view highlights the correlation between JAK-STAT active and E-Cadherin expressing PFCs and *oskar*/Staufen anchoring zone (AZ).

#: number. St: stage. Statistical test: Mann-Whitney. Stars indicate statistically significant differences. **** $p < 0.0001$. Scale: 30 μ m except magnifications 10 μ m in (C) and 15 μ m in (E). (B) Number of stages 10 analyzed. *10XSTAT92E-GFP;E4>* n=21. *10XSTAT92E-GFP;E4>shg* n=21. (D) Number of stages 10 analyzed. *shg-LacZ* (homozygous) St 7 n=8. St8 n=17. St9 n=10. St10 n= 14. *shg-LacZ/+* n=9. *shg-LacZ/+;upd>updRNAi* n=16.

Figure 6. *shg* is necessary to maintain the morphology and apico-basal polarity of the PACs and for *oskar* mRNA anchoring in the oocyte.

In all images, posterior is to the right and only one confocal section of stage 10a follicle posterior regions are shown. The PACs (pink dotted rectangle) are magnified. Yellow and blue stars indicate PCs and PFCs with strong morphology defects respectively. All presented follicles are from control females carrying only the *fru-*

Gal4 (*fru*) driver and females expressing a RNAi against *shotgun* in FCs with the *fru*-Gal4 driver (*fru>shg-RNAi*). “Weak” and “strong” refer to the expressivity of PFC morphology phenotypes in *shg* knockdown (KD) condition. **(A)** F-Actin in grey (phalloidin), to visualize cell cortexes, DNA in cyan (DAPI) and Staufen in “fire” filter (Stau, from purple, low intensity, to orange, high intensity). Weak defects lead to Staufen failing to form a tight crescent at the AZ (pink arrow). Strong defects can lead to the absence of Staufen in front of affected PFCs (blue arrowhead) and restriction of its anchoring to less altered PFCs. **(B)** Quantifications of Staufen signal width from the oocyte posterior membrane at stage 10a in control condition and in *shg* KD condition. **(C)** Laminin A in magenta and DNA in cyan. Strong PFC morphology defects lead to an abnormal localization of Laminin A between affected PFCs and the oocyte (blue arrowheads) in 100% of observed cases (n=24, stages 9 and 10). This phenotype is also sometimes observed when PFCs are weakly affected (14%, n=22 stages 9 and 10). **(D)** Dhc in “royal” filter to assess global cortical microtubule network polarity in the oocyte, that is not affected in *shg* KD condition (n=20) and DNA in grey.

Statistical test: unpaired t-test. Stars indicate statistically significant differences. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$. Scale: 30 μ m except magnifications 15 μ m. (B) Number of posterior poles analyzed: *fru*> n=22; *fru>shg-RNAi* n=10.

Figure 7. *shg* is sufficient in the PACs to control the size of *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte and is acting downstream of JAK-STAT signaling.

In all images, posterior is to the right and only one confocal section of stage 10a follicle posterior regions are shown. F-Actin in grey (phalloidin), to visualize cell cortexes, DNA in cyan (DAPI) and Staufen in “fire” filter (Stau, from purple, low intensity, to orange, high intensity). The PACs (pink dotted rectangle) and adjacent PFCs (white dotted rectangle) are magnified. Boundaries of the AZ in the oocyte are indicated by pink arrowheads. Yellow, orange, green and red stars indicate PCs and rows PC+1, PC+2 and PC+3 respectively. “Tight” and “Spaced” are guides to compare the space between oocyte and PFC membranes in both conditions. **(A)**

Follicles at stage 10a of oogenesis from control females carrying only the *E4-Gal4* (*E4>*) driver and females expressing *UAS-shg* in PFCs with the *E4-Gal4* driver. The white arrowhead highlights the frontier between rows PC+7 and PC+8 where oocyte and PFC membranes start to separate. Quantifications **(B)** of the size of the AZ through the number of FCs around PCs facing Staufen signal and the diameter of the crescent and **(C)** of the space between oocyte and PFC membranes in control condition and when *UAS-shg* is expressed in PFCs. In (C) grey and green connecting curves are visual guides. **(D-F)** Rescue experiment using combined *upd-Gal4* and *E4-Gal4* drivers to drive the expression of *upd-RNAi* in PCs and/or *shg* in PFCs. See materials and methods section for details. The size of the AZ **(E)** and the space between oocyte and PFC membranes **(F)** at stage 10a and Stau posterior localization phenotypes at stage 10 **(E')** are assessed. When E-Cadherin is overexpressed in PFCs in *upd* KD condition, it partially rescues all *upd* KD phenotypes at the AZ.

St: stage. #: number. Statistical tests: (B,E) # of FCs around PCs: Mann-Whitney. (B,E) Diameter and (C,F): unpaired t-test. Stars indicate statistically significant differences. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Scale: 30 μ m except magnifications 15 μ m. (B) Number of posterior poles analyzed: *E4>* St9 n=13; St10a n=14; Early St10b n=16; Late St10b n=14. *E4>shg* St9 n=8; St10a n=22; Early St10b n=15; Late St10b n=11. (C) Number of mean space measurements on each side of PCs: *E4>* St10a n=46; Early St10b n=14. *E4>shg* St10a n=60; Early St10b n=28. (E) Number of posterior poles analyzed: *upd;E4>LacZ* n=9; *upd;E4>LacZ;shg* n=20; *upd;E4>updRNAi;LacZ* n=20; *upd;E4>updRNAi;shg* n=10; (E') Number of follicles analyzed: *upd;E4>updRNAi;LacZ* n=43; *upd;E4>updRNAi;shg* n=17. (F) Number of mean space measurements on each side of PCs: *upd;E4>LacZ* n=16; *upd;E4>LacZ;shg* n=38; *upd;E4>updRNAi;LacZ* n=24; *upd;E4>updRNAi;shg* n=18.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CM performed the vast majority of experiments and data analyses and participated in experimental design. SN and FC performed experiments. AMP and JM provided material, infrastructure and helped with discussions on the project. AMP, JM and MM obtained the financial support. MM conceptualized and designed the research study, supervised the project and performed some experiments. CM and MM wrote the manuscript. All authors critically read and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by a 3 year-PhD fellowship obtained from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” for CM, by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Paris-Saclay and Versailles St-Quentin-en-Yvelines Universities, by a grant from the “Ligue contre le cancer” for laboratory expenses, and by a grant from the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” for a year of salary expenses for CM.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Erika Bach, Jean-Paul Vincent, Fred Bernard, Jean-René Huynh, Vincent Mirouse, Véronique Brodu and Antoine Boivin for sharing fly stocks and Antoine Guichet, Anna Cyrklaf, Talila Volt, Christian Dahmann for sharing antibodies. We are also grateful to Fred Bernard for helpful discussions, and we thank Flybase, BDSC (Bloomington *Drosophila* Stock Center) and DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank) for resources.

REFERENCES

- Babu, K., Cai, Y., Bahri, S., Yang, X. and Chia, W.** (2004). Roles of Bifocal, Homer, and F-actin in anchoring Oskar to the posterior cortex of *Drosophila* oocytes. *Genes Dev* **18**, 138–143.
- Bach, E. A., Ekas, L. A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M. S., Lee, H., Perrimon, N. and Baeg, G.-H.** (2007). GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr. Patterns* **7**, 323–331.
- Benton, R. and St Johnston, D.** (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* **115**, 691–704.
- Bernard, F., Lepesant, J.-A. and Guichet, A.** (2018). Nucleus positioning within *Drosophila* egg chamber. *Semin Cell Dev Biol* **82**, 25–33.
- Borensztein, A., Boissoneau, E., Fernandez, G., Agnès, F. and Pret, A.-M.** (2013). JAK/STAT autocontrol of ligand-producing cell number through apoptosis. *Development* **140**, 195–204.
- Bose, M., Lampe, M., Mahamid, J. and Ephrussi, A.** (2022). Liquid-to-solid phase transition of oskar ribonucleoprotein granules is essential for their function in *Drosophila* embryonic development. *Cell* **185**, 1308-1324.e23.
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B. and Saxton, W. M.** (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science* **289**, 2120–2122.
- Cavaliere, V., Bernardi, F., Romani, P., Duchi, S. and Gargiulo, G.** (2008). Building up the *Drosophila* eggshell: first of all the eggshell genes must be transcribed. *Dev Dyn* **237**, 2061–2072.
- Cha, B.-J., Serbus, L. R., Koppetsch, B. S. and Theurkauf, W. E.** (2002). Kinesin I-dependent cortical exclusion restricts pole plasm to the oocyte posterior. *Nat Cell Biol* **4**, 592–598.
- Chen, Y. and Schüpbach, T.** (2006). The role of brinker in eggshell patterning. *Mechanisms of Development* **123**, 395–406.
- Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* **4**, 289–300.
- Corwin, H. O. and Hanratty, W. P.** (1976). Characterization of a unique lethal tumorous mutation in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **144**, 345–347.
- Deng, W. M. and Ruohola-Baker, H.** (2000). Laminin A is required for follicle cell-oocyte signaling that leads to establishment of the anterior-posterior axis in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 683–686.

- Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J. M. and St Johnston, D.** (2003). The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development* **130**, 3965–3975.
- Doerflinger, H., Vogt, N., Torres, I. L., Mirouse, V., Koch, I., Nüsslein-Volhard, C. and St Johnston, D.** (2010). Bazooka is required for polarisation of the *Drosophila* anterior-posterior axis. *Development* **137**, 1765–1773.
- Doerflinger, H., Zimyanin, V. and St Johnston, D.** (2022). The *Drosophila* anterior-posterior axis is polarized by asymmetric myosin activation. *Curr Biol* **32**, 374–385.e4.
- Eichler, C. E., Hakes, A. C., Hull, B. and Gavis, E. R.** (2020). Compartmentalized oskar degradation in the germ plasm safeguards germline development. *Elife* **9**, e49988.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K. and Lehmann, R.** (1991). oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**, 37–50.
- Erdélyi, M., Michon, A. M., Guichet, A., Glotzer, J. B. and Ephrussi, A.** (1995). Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* **377**, 524–527.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nüsslein-Volhard, C. and St Johnston, D.** (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**, 1221–1232.
- Fregoso Lomas, M., De Vito, S., Boisclair Lachance, J.-F., Houde, J. and Nilson, L. A.** (2016). Determination of EGFR Signaling Output by Opposing Gradients of BMP and JAK/STAT Activity. *Curr Biol* **26**, 2572–2582.
- Frydman, H. M. and Spradling, A. C.** (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within *drosophila* ovarian follicles. *Development* **128**, 3209–3220.
- Godt, D. and Tepass, U.** (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* **395**, 387–391.
- González-Reyes, A. and St Johnston, D.** (1994). Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*. *Science* **266**, 639–642.
- González-Reyes, A. and St Johnston, D.** (1998). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* **125**, 3635–3644.
- González-Reyes, A., Elliott, H. and St Johnston, D.** (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* **375**, 654–658.

- Inaki, M., Vishnu, S. and Matsuno, K.** (2022). Live imaging of delamination in *Drosophila* shows epithelial cell motility and invasiveness are independently regulated. *Sci Rep* **12**, 16210.
- Jankovics, F., Sinka, R., Lukácsovich, T. and Erdélyi, M.** (2002). MOESIN crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Curr Biol* **12**, 2060–2065.
- Jouette, J., Guichet, A. and Claret, S. B.** (2019). Dynein-mediated transport and membrane trafficking control PAR3 polarised distribution. *Elife* **8**, e40212.
- Khammari, A., Agnès, F., Gandille, P. and Pret, A.-M.** (2011). Physiological apoptosis of polar cells during *Drosophila* oogenesis is mediated by Hid-dependent regulation of Diap1. *Cell Death Differ* **18**, 793–805.
- Khuc Trong, P., Doerflinger, H., Dunkel, J., St Johnston, D. and Goldstein, R. E.** (2015). Cortical microtubule nucleation can organise the cytoskeleton of *Drosophila* oocytes to define the anteroposterior axis. *eLife* **4**, e06088.
- Krauss, J., López de Quinto, S., Nüsslein-Volhard, C. and Ephrussi, A.** (2009). Myosin-V regulates oskar mRNA localization in the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* **19**, 1058–1063.
- Laplante, C. and Nilson, L. A.** (2006). Differential expression of the adhesion molecule Echinoid drives epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **133**, 3255–3264.
- Lehmann, R. and Nüsslein-Volhard, C.** (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* **47**, 141–152.
- Li, M., McGrail, M., Serr, M. and Hays, T. S.** (1994). *Drosophila* cytoplasmic dynein, a microtubule motor that is asymmetrically localized in the oocyte. *J Cell Biol* **126**, 1475–1494.
- López-Schier, H.** (2003). The polarisation of the anteroposterior axis in *Drosophila*. *Bioessays* **25**, 781–791.
- Lu, W., Lakonishok, M., Liu, R., Billington, N., Rich, A., Glotzer, M., Sellers, J. R. and Gelfand, V. I.** (2020). Competition between kinesin-1 and myosin-V defines *Drosophila* posterior determination. *Elife* **9**, e54216.
- Luo, H., Hanratty, W. P. and Dearolf, C. R.** (1995). An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J.* **14**, 1412–1420.
- Mallart, C., Chalvet, F., Netter, S., Torres, A. Y., Poidevin, M., Montagne, J., Pret, A.-M. and Malartre, M.** (2022). E-cadherin acts as a positive regulator of the JAK-STAT signaling pathway during *Drosophila* oogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**,.

- Margaritis, L. H., Kafatos, F. C. and Petri, W. H.** (1980). The eggshell of *Drosophila melanogaster*. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. *J Cell Sci* **43**, 1–35.
- Mathieu, J., Sung, H.-H., Pugieux, C., Soetaert, J. and Rorth, P.** (2007). A Sensitized PiggyBac-Based Screen for Regulators of Border Cell Migration in *Drosophila*. *Genetics* **176**, 1579–1590.
- Merkle, J. A., Wittes, J. and Schüpbach, T.** (2020). Signaling between somatic follicle cells and the germline patterns the egg and embryo of *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol* **140**, 55–86.
- Milas, A. and Telley, I. A.** (2022). Polarity Events in the *Drosophila melanogaster* Oocyte. *Front Cell Dev Biol* **10**, 895876.
- Milas, A., de-Carvalho, J. and Telley, I. A.** (2022). Follicle cell contact maintains main body axis polarity in the *Drosophila melanogaster* oocyte. 2022.03.03.482911.
- Nashchekin, D., Fernandes, A. R. and St Johnston, D.** (2016). Patronin/Shot Cortical Foci Assemble the Noncentrosomal Microtubule Array that Specifies the *Drosophila* Anterior-Posterior Axis. *Dev Cell* **38**, 61–72.
- Niewiadomska, P., Godt, D. and Tepass, U.** (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **144**, 533–547.
- Pai, L. M., Barcelo, G. and Schüpbach, T.** (2000). D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* **103**, 51–61.
- Palacios, I. M. and St Johnston, D.** (2002). Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development* **129**, 5473–5485.
- Parton, R. M., Hamilton, R. S., Ball, G., Yang, L., Cullen, C. F., Lu, W., Ohkura, H. and Davis, I.** (2011). A PAR-1-dependent orientation gradient of dynamic microtubules directs posterior cargo transport in the *Drosophila* oocyte. *J Cell Biol* **194**, 121–135.
- Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P. and Payre, F.** (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* **4**, 782–789.
- Poulton, J. S. and Deng, W.-M.** (2006). Dystroglycan down-regulation links EGF receptor signaling and anterior-posterior polarity formation in the *Drosophila* oocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12775–12780.
- Poulton, J. S. and Deng, W.-M.** (2007). Cell-cell communication and axis specification in the *Drosophila* oocyte. *Dev Biol* **311**, 1–10.
- Roth, S. and Lynch, J. A.** (2009). Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001891.

- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G. and Schüpbach, T.** (1995). cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* **81**, 967–978.
- Roth, S., Jordan, P. and Karess, R.** (1999). Binuclear *Drosophila* oocytes: consequences and implications for dorsal-ventral patterning in oogenesis and embryogenesis. *Development* **126**, 927–934.
- Ruohola, H., Bremer, K. A., Baker, D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1991). Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* **66**, 433–449.
- Sanghavi, P., Laxani, S., Li, X., Bullock, S. L. and Gonsalvez, G. B.** (2013). Dynein associates with oskar mRNPs and is required for their efficient net plus-end localization in *Drosophila* oocytes. *PLoS One* **8**, e80605.
- Shulman, J. M., Benton, R. and St Johnston, D.** (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* **101**, 377–388.
- Silver, D. L. and Montell, D. J.** (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* **107**, 831–841.
- Slaidina, M., Gupta, S., Banisch, T. U. and Lehmann, R.** (2021). A single-cell atlas reveals unanticipated cell type complexity in *Drosophila* ovaries. *Genome Res* **31**, 1938–1951.
- Smith, J. L., Wilson, J. E. and Macdonald, P. M.** (1992). Overexpression of oskar directs ectopic activation of nanos and presumptive pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* **70**, 849–859.
- St Johnston, D., Beuchle, D. and Nüsslein-Volhard, C.** (1991). Staufén, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**, 51–63.
- St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G. and Jantsch, M.** (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10979–10983.
- Stevens, N. R., Raposo, A. A. S. F., Basto, R., St Johnston, D. and Raff, J. W.** (2007). From stem cell to embryo without centrioles. *Curr Biol* **17**, 1498–1503.
- Sun, Y., Yan, Y., Deneff, N. and Schüpbach, T.** (2011). Regulation of somatic myosin activity by protein phosphatase 1 β controls *Drosophila* oocyte polarization. *Development* **138**, 1991–2001.
- Suyama, R., Jenny, A., Curado, S., Pellis-van Berkel, W. and Ephrussi, A.** (2009). The actin-binding protein Lasp promotes Oskar accumulation at the posterior pole of the *Drosophila* embryo. *Development* **136**, 95–105.

- Tissot, N., Lepesant, J.-A., Bernard, F., Legent, K., Bosveld, F., Martin, C., Faklaris, O., Bellaïche, Y., Coppey, M. and Guichet, A.** (2017). Distinct molecular cues ensure a robust microtubule-dependent nuclear positioning in the *Drosophila* oocyte. *Nat Commun* **8**, 15168.
- Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K. C., Kempfues, K. J. and Ephrussi, A.** (2000). A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol* **2**, 458–460.
- Torres, A. Y., Malartre, M., Pret, A.-M. and Agnès, F.** (2017). JAK/STAT signaling is necessary for cell monosis prior to epithelial cell apoptotic extrusion. *Cell Death Dis* **8**, e2814.
- Wang, C. and Lehmann, R.** (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* **66**, 637–647.
- Waring, G. L.** (2000). Morphogenesis of the eggshell in *Drosophila*. *Int Rev Cytol* **198**, 67–108.
- Wittes, J. and Schüpbach, T.** (2019). A Gene Expression Screen in *Drosophila melanogaster* Identifies Novel JAK/STAT and EGFR Targets During Oogenesis. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **9**, 47–60.
- Wu, X., Tanwar, P. S. and Raftery, L. A.** (2008). *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 271–282.
- Xi, R., McGregor, J. R. and Harrison, D. A.** (2003). A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium. *Dev. Cell* **4**, 167–177.
- Yan, Y., Deneff, N. and Schüpbach, T.** (2009). The Vacuolar Proton Pump, V-ATPase, Is Required for Notch Signaling and Endosomal Trafficking in *Drosophila*. *Developmental Cell* **17**, 387–402.
- Zhao, T., Graham, O. S., Raposo, A. and St Johnston, D.** (2012). Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. *Science* **336**, 999–1003.
- Zimyanin, V., Lowe, N. and St Johnston, D.** (2007). An oskar-dependent positive feedback loop maintains the polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* **17**, 353–359.
- Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A., Davis, I. and St Johnston, D.** (2008). In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization. *Cell* **134**, 843–853.

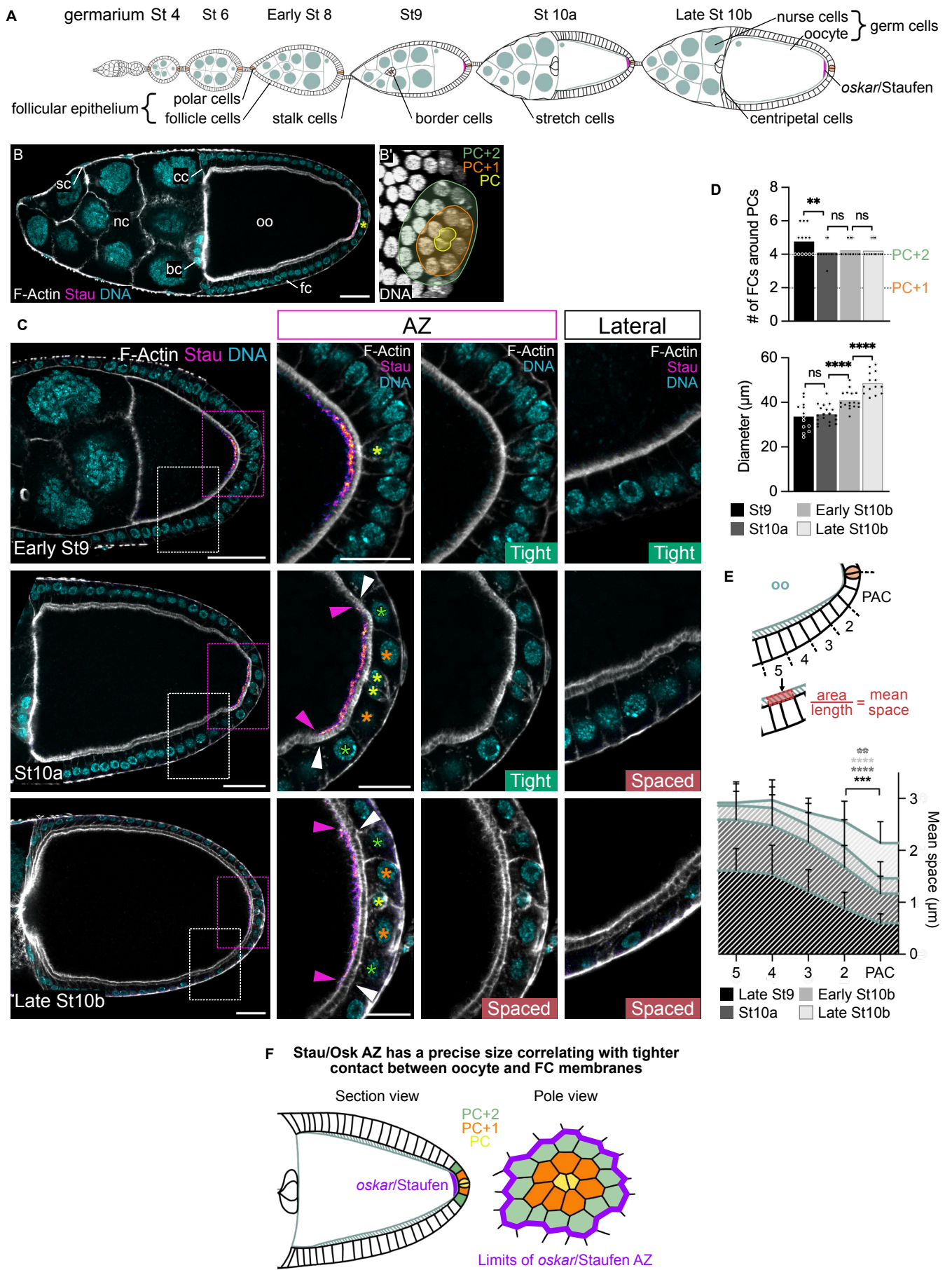


Figure 1. *oskar* mRNA anchoring zone faces a precise number of PFCs, which maintain a tight contact with the oocyte.

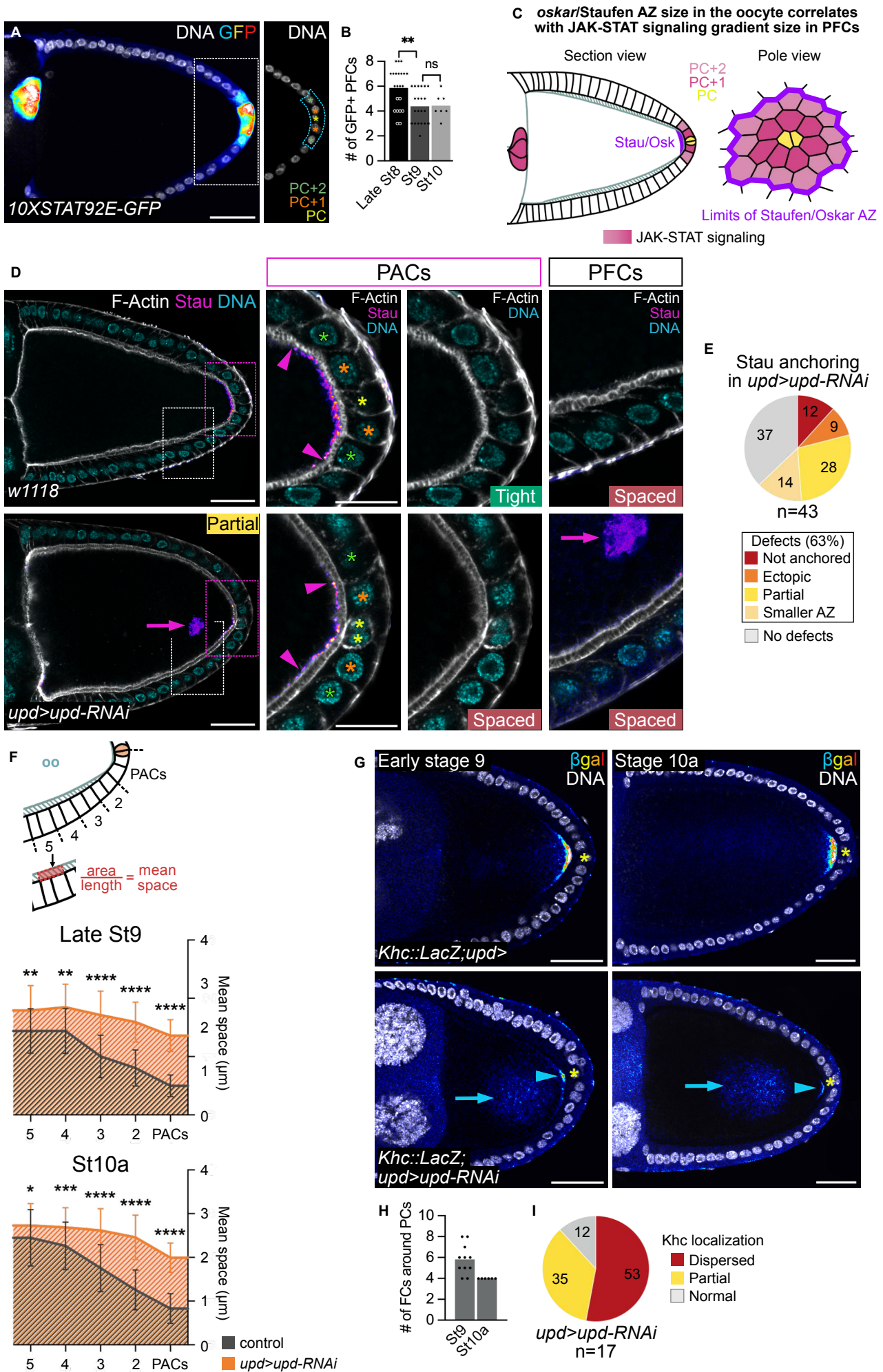


Figure 2. JAK-STAT activity gradient is restricted to the PACs and is necessary to define the size of *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte.

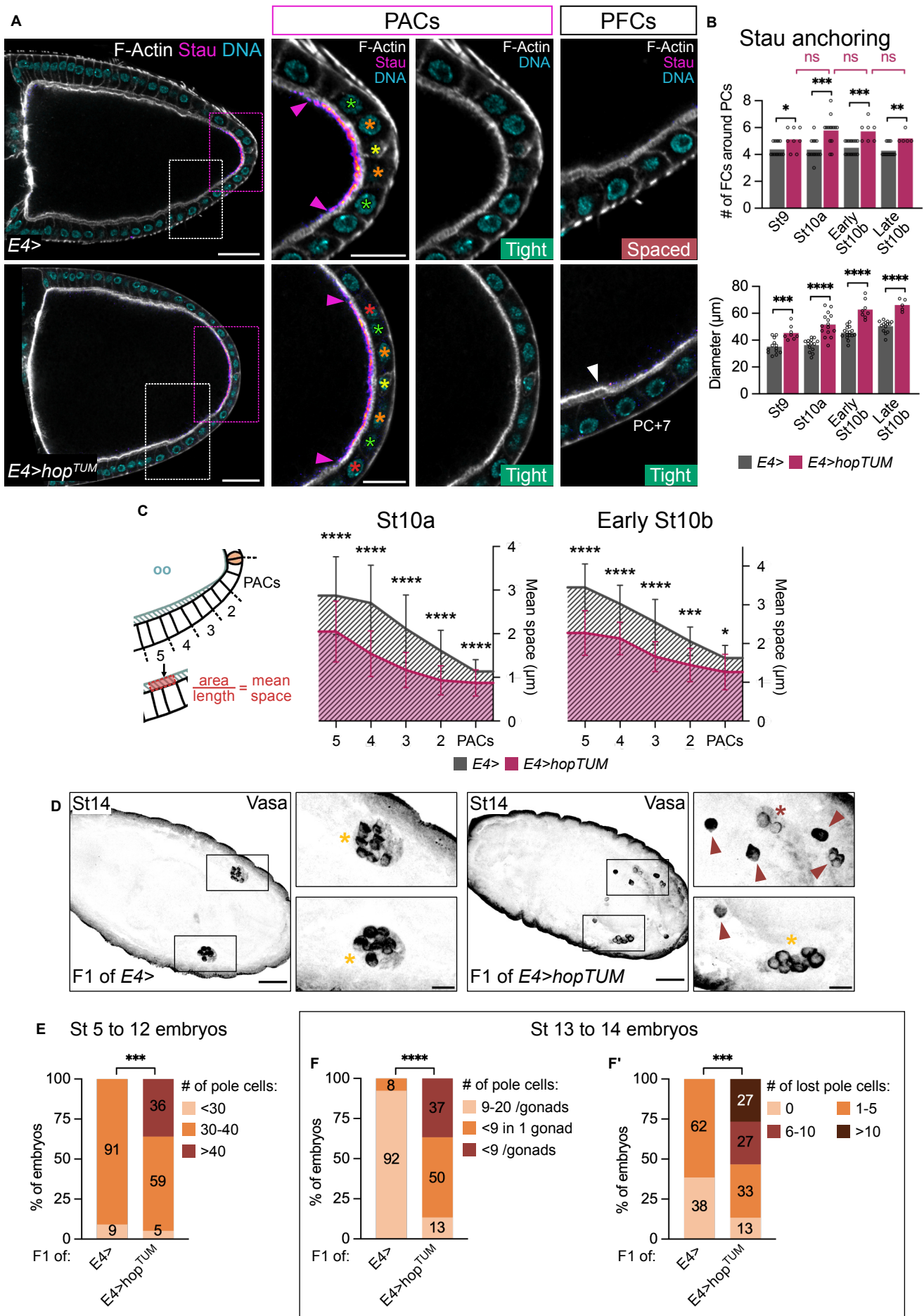


Figure 3. JAK-STAT pathway activity in the PACs is sufficient to control the size of the *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte.

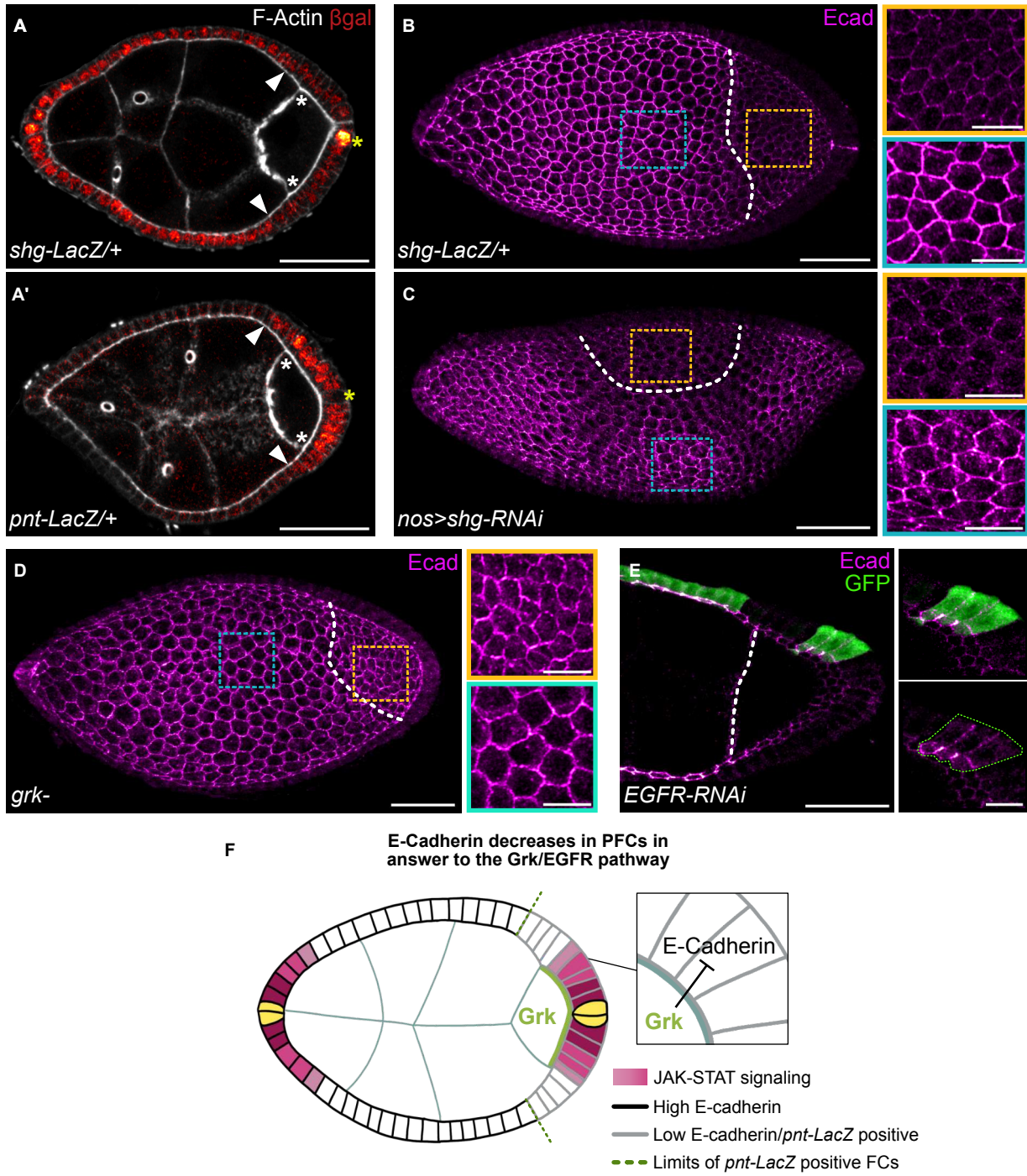


Figure 4. E-Cadherin levels decrease in PFCs in response to the Grk/EGFR signaling pathway.

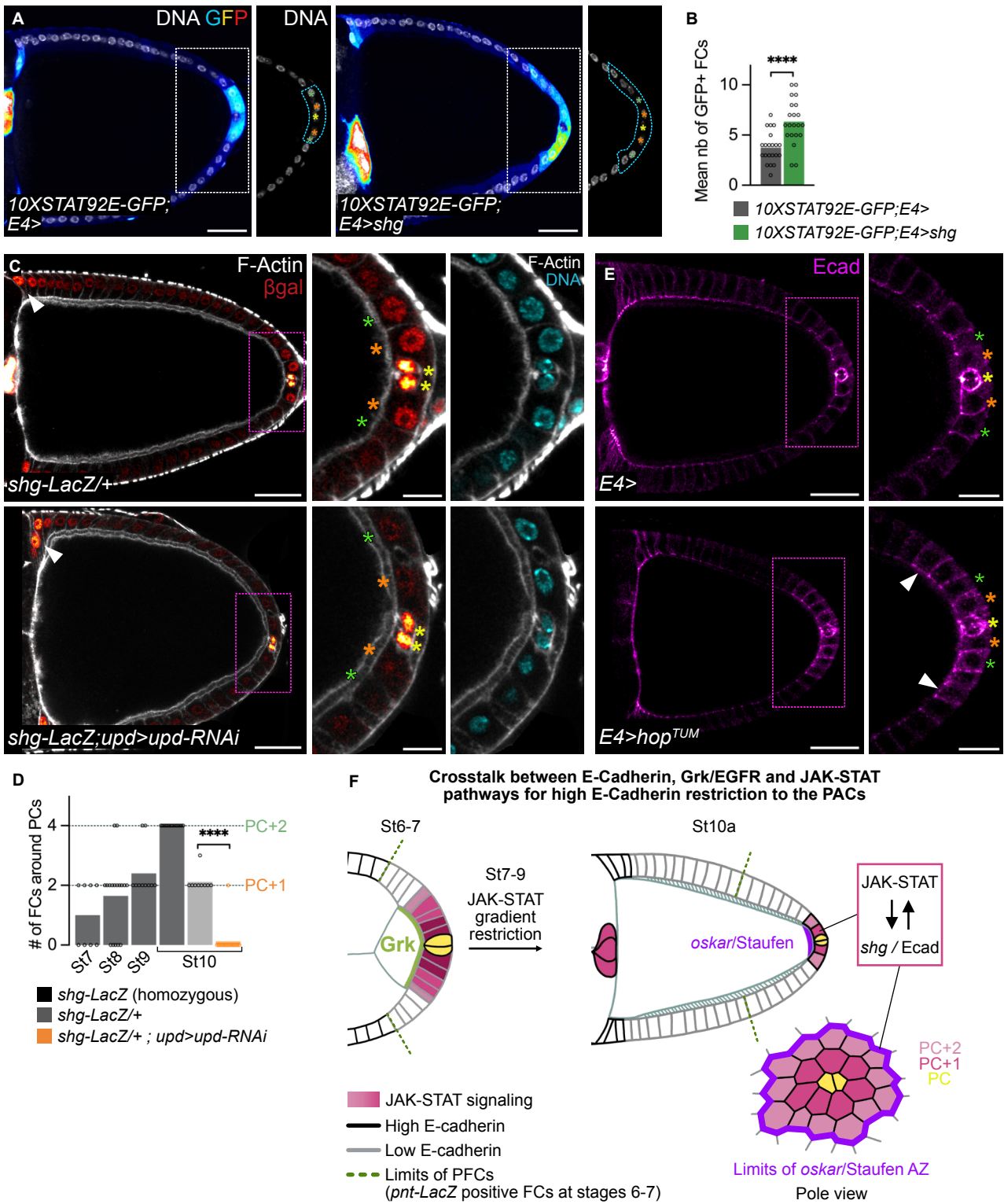


Figure 5. *shg*, encoding E-Cadherin, is a regulator and a target of the JAK-STAT signaling pathway in the PACs.

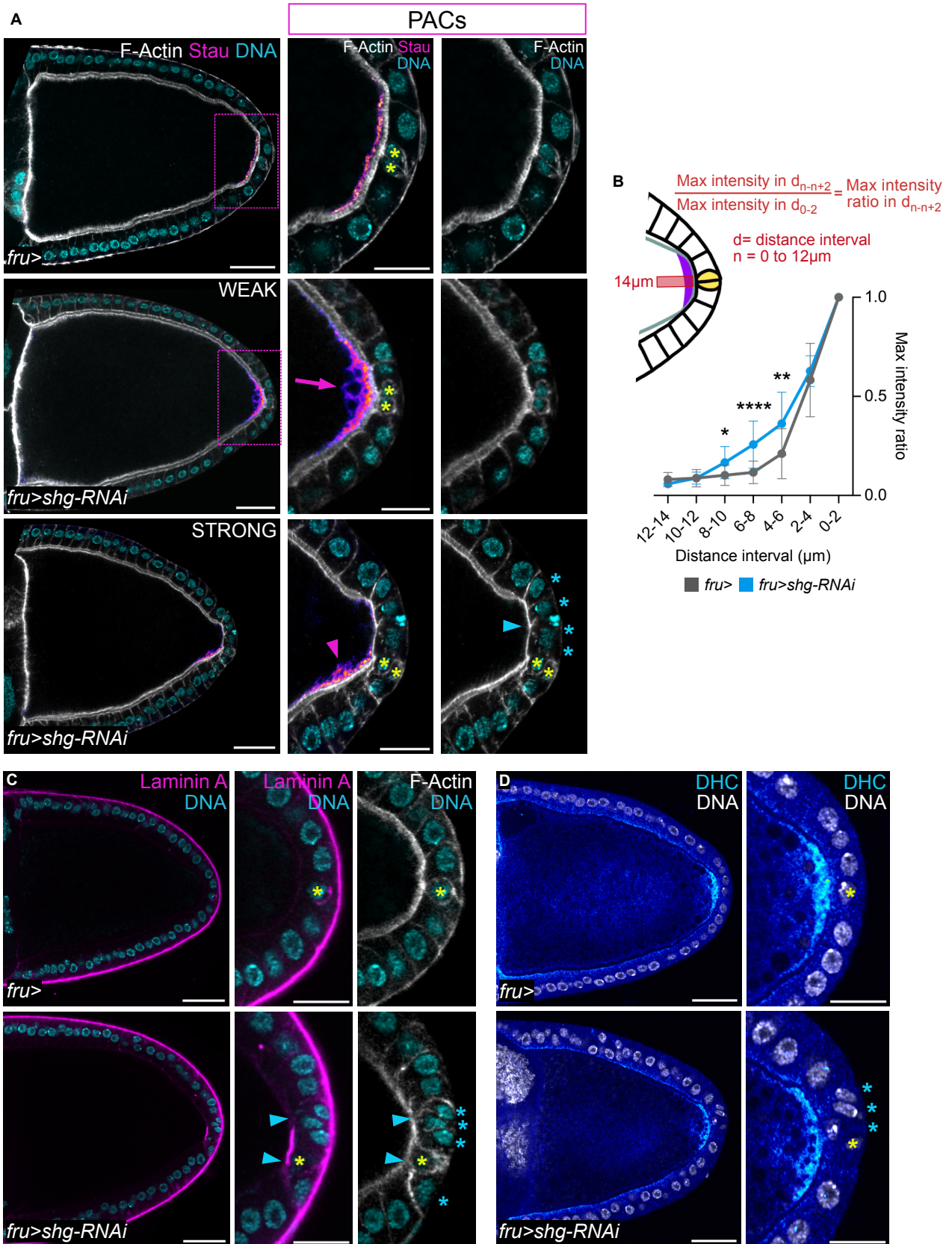


Figure 6. *shg* is necessary to maintain the morphology and apico-basal polarity of the PACs and for *oskar* mRNA anchoring in the oocyte.

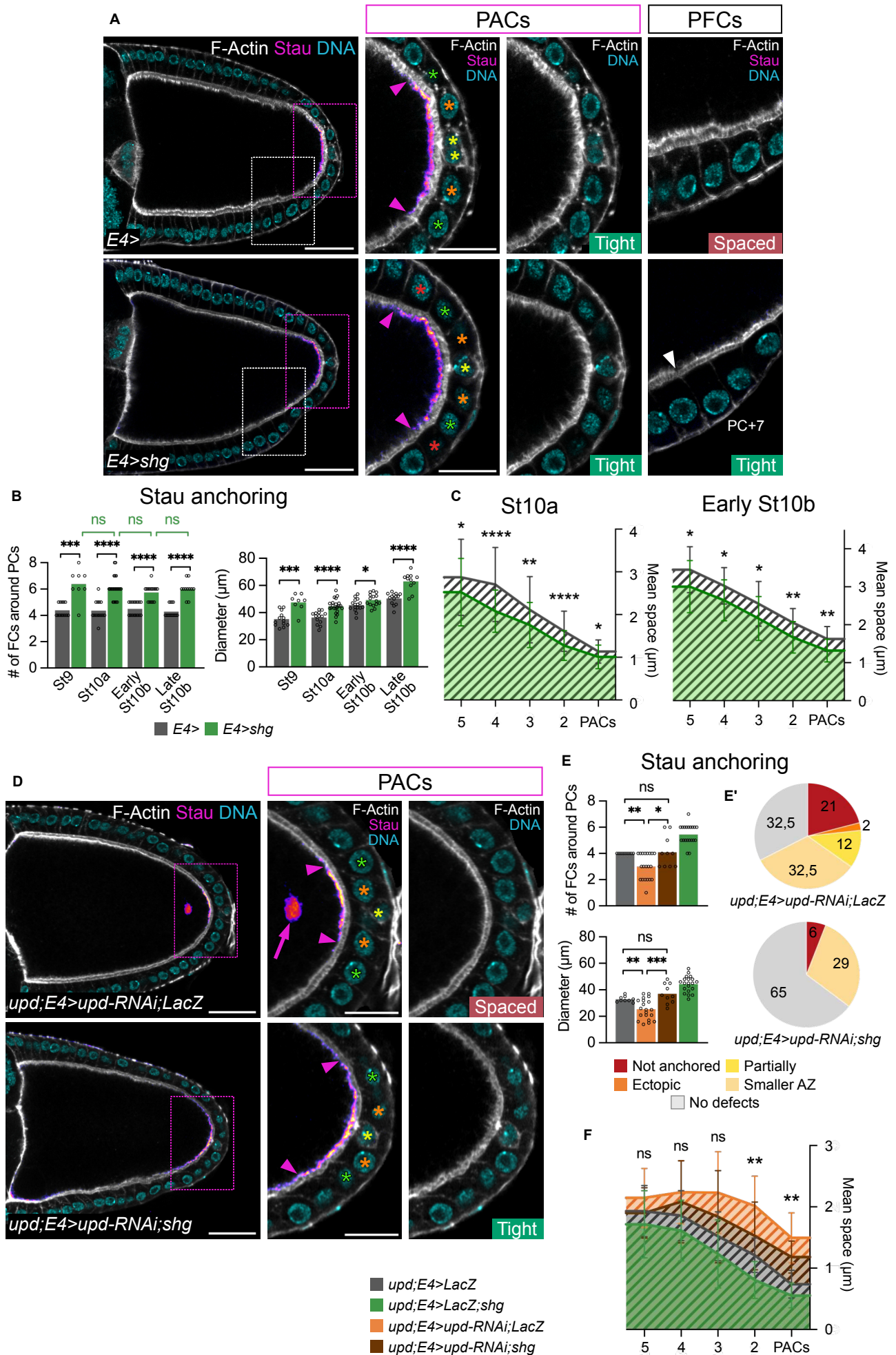


Figure 7. *shg* is sufficient in the PACs to control the size of *oskar* mRNA anchoring zone in the oocyte and is acting downstream of JAK-STAT signaling.

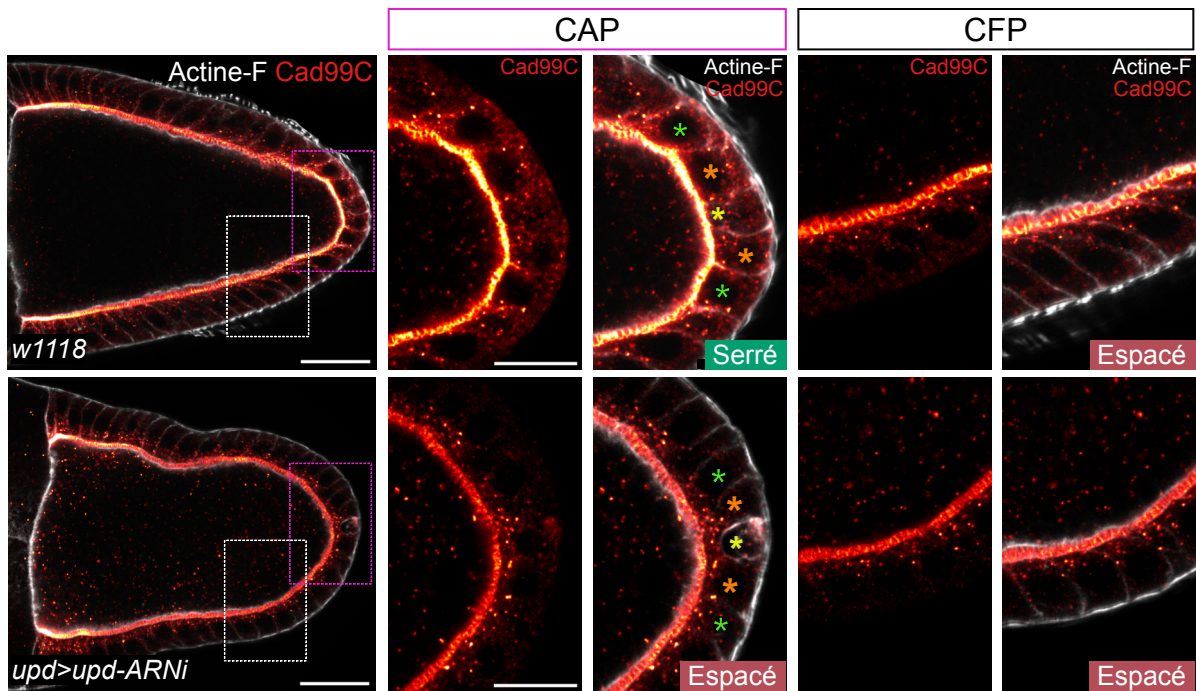


Figure 1. La voie JAK-STAT semble nécessaire à la forte accumulation de Cad99C dans les CAP et sous forme de vésicules au cortex de l'ovocyte. Dans toutes les images, le pôle postérieur est à droite. Follicules au stade 10a de l'ovogenèse de femelles contrôle (*w1118*) et exprimant un ARNi dirigé contre *upd* dans les CP (*upd>upd-RNAi*). Uniquement une coupe confocale de la région postérieure des follicules est présentée, avec des agrandissements au niveau des CAP (rectangle rose) et des CFP adjacentes (rectangle blanc). Actine-F (gris, phalloïdine) permettant de visualiser les cortex cellulaires. Cad99C en filtre "red hot" (de rouge, faible intensité, à blanc, forte intensité). Les étoiles jaunes, oranges et vertes indiquent les cellules polaires (CP) et les rangs de cellules folliculaires CP+1 et CP+2 respectivement. "Serré" et "Espacé" sont des guides visuels pour comparer l'espace entre les membranes de l'ovocyte et apicales des cellules d'ancrage postérieur.

Échelles : 30µm sauf pour les agrandissements 15µm.

Résultats préliminaires complémentaires au papier n°2

Dans cette partie, je vais présenter des résultats préliminaires venant compléter l'étude présentée dans la seconde partie de mes résultats, correspondant au papier n°2 « The localization of the posterior determinant Oskar in the *Drosophila* oocyte is defined by an interplay between E-Cadherin, EGFR and JAK-STAT signaling pathways in the adjacent follicular epithelium ». Les informations techniques sont à retrouver dans la section Matériel et Méthode du papier n°2. Le terme « préliminaire » indique que, bien qu'ayant été observés dans plusieurs follicules, la quantification des phénotypes observés n'est pas terminée et la confirmation de ces résultats est en cours.

Abréviation : CAP pour Cellules d'Ancrage Postérieur.

1. La voie JAK-STAT semble nécessaire à la forte accumulation de Cad99C dans les CAP et sous forme de vésicules au cortex de l'ovocyte.

Ayant démontré que les CAP gardent un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte, j'ai tenté de résoudre le mécanisme permettant à leurs membranes de rester accolées. Étant donné que la E-Cadhérine est suffisante pour maintenir un contact étroit entre les membranes de l'ovocyte et des CFP et qu'il s'agit d'une protéine de jonction, une hypothèse évidente était que le maintien de ce contact étroit pourrait être dû à une adhérence Cadhérine-Cadhérine entre ces deux types cellulaires. Cependant, mes expériences de perte de fonction de la E-Cadhérine dans les cellules germinales ont montré que le maintien de l'espace étroit entre les membranes de l'ovocyte et des CAP ne semble pas affecté (résultats non montrés).

D'autres types de Cadhérines sont exprimées par les cellules folliculaires entourant l'ovocyte. Notamment, ces cellules expriment la proto-cadhérine Cad99C, impliquée dans la formation de microvillosités à leur surface apicale (Mahowald, 1972; D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006). Il a été proposé que la Cad99C pourrait interagir avec d'autres protéines présentes à la membrane de l'ovocyte (Schlichting et al., 2006). J'ai donc effectué un immunomarquage de la Cad99C sur des follicules de femelles sauvages afin de déterminer si cette protéine présentait une accumulation et/ou localisation subcellulaire différente dans les CAP par rapport aux autres CFP. Mes résultats préliminaires ont permis de confirmer que la Cad99C est localisée dans l'espace situé entre les membranes de l'ovocyte et des cellules folliculaires (D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006), mais également d'observer un marquage ponctiforme dans le cytoplasme des cellules folliculaires, qui n'est pas décrit dans la littérature et qui pourrait correspondre à des vésicules (Figure 1). De façon intéressante, ces marquages semblent plus intenses au niveau des CAP par rapport aux autres CFP, à la fois au niveau cytoplasmique et dans les microvillosités. De plus, bien que la Cad99C ait été décrite comme n'étant pas exprimée par les cellules germinales (D'Alterio et al., 2005), des vésicules positives pour la Cad99C sont visibles dans le cytoplasme de l'ovocyte et semblent s'accumuler en plus grand nombre à

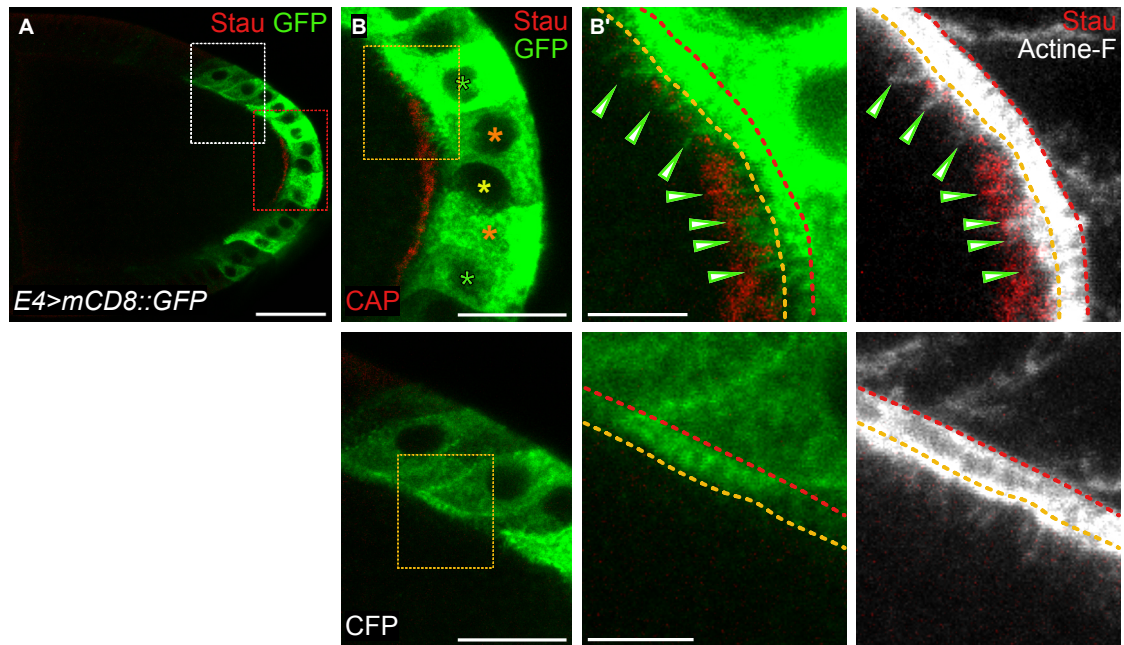


Figure 2. Des projections membranaires riches en actine-F émanent des CAP et pénètrent dans l'ovocyte au niveau de la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen. Dans toutes les images, le pôle postérieur est à droite. **(A)** Follicules au stade 10a de l'ovogenèse d'une femelle exprimant le transgène *UAS-mCD8::GFP* dans les cellules folliculaires du pôle postérieur grâce au pilote *E4-Gal4* (*E4>mCD8::GFP*). Actine-F (gris, phalloïdine) permettant de visualiser les cortex cellulaires. GFP en vert. Staufen en rouge. Une projection "max" de deux coupes confocales de la région postérieure du follicule est présentée. **(B)** Agrandissements au niveau des CAP (rectangle rouge) et des CFP (rectangle blanc). Les étoiles jaunes, oranges et vertes indiquent les cellules polaires (CP) et les rangs de cellules folliculaires CP+1 et CP+2 respectivement. **(B')** Agrandissement de la région apicale d'une CAP et d'une CFP (rectangle jaune). Les têtes de flèche vertes montrent les projections riches en actine et GFP positives au niveau de la zone d'ancrage. Les lignes pointillées jaunes et rouges indiquent les cortex de l'ovocyte et apicaux des cellules folliculaires respectivement.

Échelles : A : 30µm. B : 15µm. B' : 5µm.

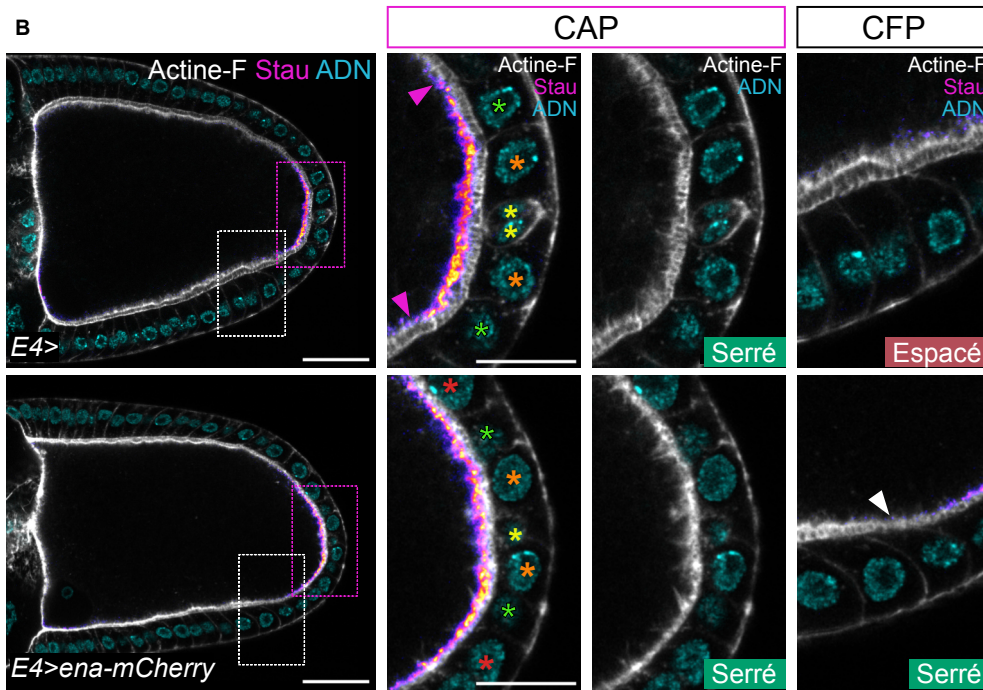
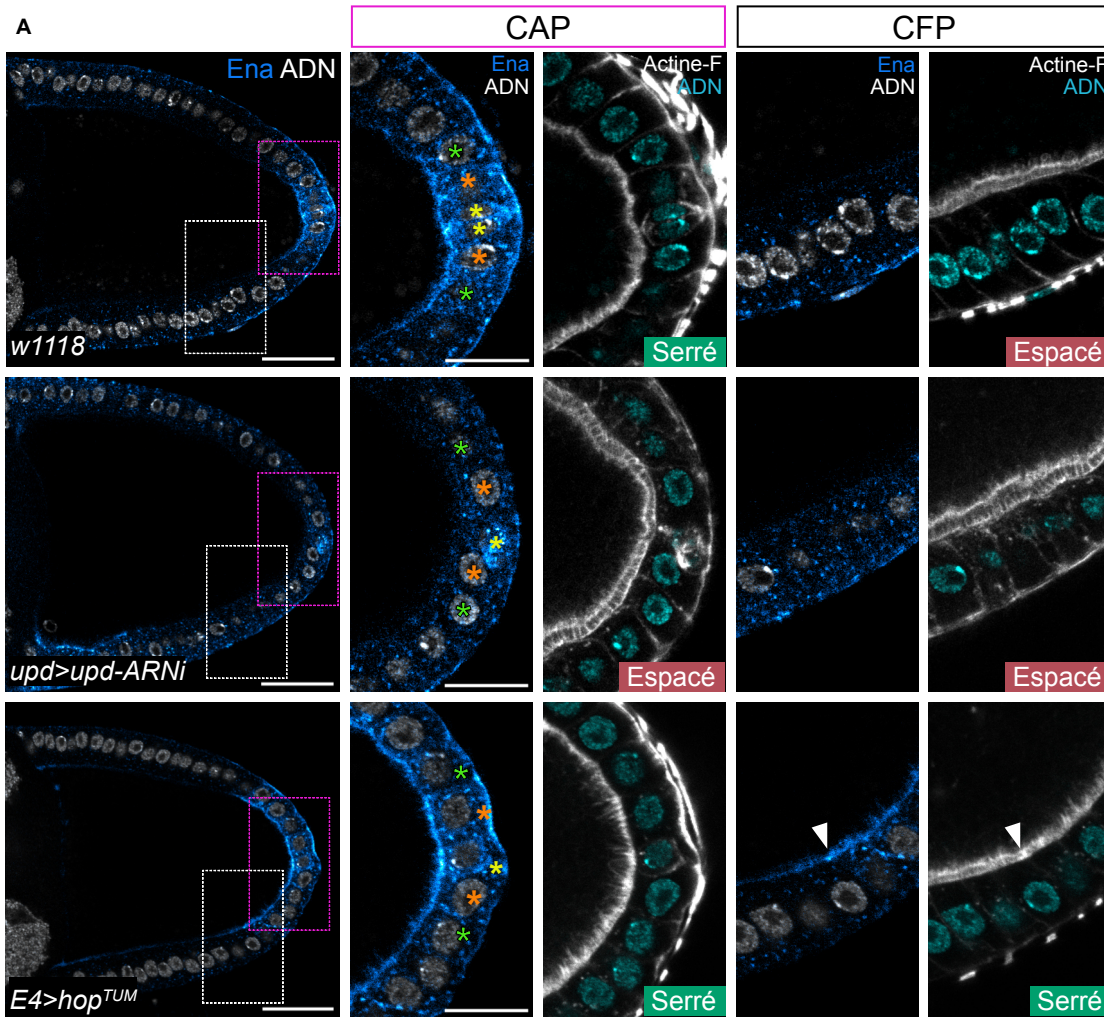
proximité du cortex et en particulier au niveau de la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen à la membrane postérieure de l'ovocyte (Figure 1).

Étant donné que la voie JAK-STAT joue un rôle essentiel dans les CAP, je me suis demandé si elle était nécessaire à l'accumulation de la Cad99C dans ces cellules. J'ai, pour ce faire, observé la localisation de la Cad99C en condition de perte de fonction d'*upd*. Dans les cellules folliculaires entourant l'ovocyte, la Cad99C présente les mêmes localisations subcellulaires qu'en condition contrôle (Figure 1). Cependant, la protéine n'est pas détectée à des niveaux supérieurs dans les CAP, contrairement au contrôle. De plus, la localisation des vésicules positives pour la Cad99C dans le cytoplasme de l'ovocyte semble différente : l'accumulation au cortex n'est pas visible et les vésicules sont réparties uniformément dans tout le cytoplasme.

L'ensemble de ces résultats préliminaires suggère qu'une plus forte accumulation en Cad99C au niveau de la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen dans l'ovocyte et dans les CAP dépendrait de l'activité de la voie JAK-STAT. Ainsi, la Cad99C pourrait être un des acteurs régulés par la voie JAK-STAT et impliqué dans le maintien d'un contact étroit entre les membranes.

2. Des projections membranaires riches en actine-F émanent des CAP et pénètrent dans l'ovocyte au niveau de la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen.

Afin de caractériser plus précisément l'interaction entre les microvillosités des CAP et de l'ovocyte, j'ai induit l'expression de la protéine de fusion mCD8-GFP, permettant de visualiser les membranes, uniquement dans les CFP grâce au pilote *E4-Gal4* (Figure 2). Du côté apical de ces cellules, un signal GFP membranaire est détecté dans l'espace les séparant de l'ovocyte, correspondant aux microvillosités des cellules folliculaires. De façon surprenante, j'ai observé que des protrusions membranaires marquées par la GFP, donc provenant des cellules folliculaires, et riches en actine-F étaient visibles à l'intérieur de l'ovocyte. Ces structures émanent en grand nombre des CAP et pénètrent dans la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen dans l'ovocyte. Ainsi, une majorité des projections d'actine-F perpendiculaires au cortex de l'ovocyte au niveau de la zone d'ancrage et qui semblent être formées dans l'ovocyte correspondent à ces protrusions et proviennent en fait des CAP. En revanche, en dehors de la zone d'ancrage, ces structures ne semblent pas présentes, puisque le signal GFP est restreint à l'espace entre les membranes et n'est pas détecté au-delà du cortex de l'ovocyte. Des filaments d'actine perpendiculaires au cortex de l'ovocyte sont également visibles mais ne sont pas positifs pour la GFP, suggérant qu'ils émanent du réseau d'actine-F cortical de l'ovocyte.



c Ancre Stau

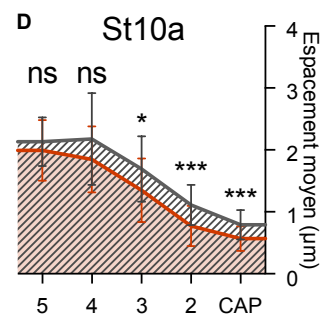
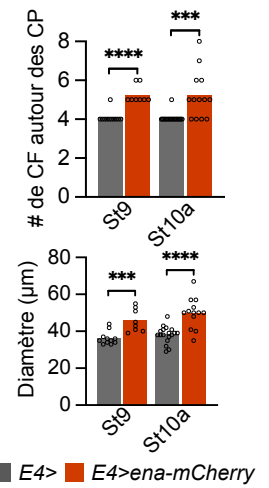


Figure 3. *enabled* est exprimé dans les CAP en réponse à la voie JAK-STAT et est suffisant au maintien d'un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte. Voir légende à la suite des résultats.

3. *enabled* est exprimé dans les CAP en réponse à la voie JAK-STAT et est suffisant au maintien d'un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte.

Ces protrusions membranaires émanant des CAP étant longues et riches en actine, il s'agit très certainement de filopodes. De plus, il a été décrit que les cellules folliculaires forment des filopodes, dans leur région basale, capables de pénétrer les cellules voisines dans l'épithélium (Popkova et al., 2020). *enabled*, le gène codant une protéine impliquée dans la polymérisation de l'actine-F, est exprimé par les cellules folliculaires et est nécessaire à l'élongation des filopodes en région basale (Popkova et al., 2020). Afin de déterminer si Enabled serait également impliquée dans la formation des protrusions observées au niveau de la zone d'ancrage, j'ai réalisé un immunomarquage de cette protéine en condition sauvage. J'ai observé que Enabled est détectée dans toutes les cellules folliculaires entourant l'ovocyte, avec une localisation spécifique en région basale cohérente avec son rôle décrit dans la littérature (Figure 3A). De façon très intéressante, les CAP présentent une plus forte accumulation en Enabled que les autres cellules folliculaires et notamment une localisation en région apicale. Une perte de fonction d'*upd* entraîne une diminution des niveaux d'Enabled dans les CAP, suggérant qu'*enabled* est une cible de la voie JAK-STAT dans ces cellules (Figure 3A). De plus, un gain de fonction de la voie JAK-STAT dans les CFP par une surexpression d'*hop^{TUM}* est suffisant à augmenter les niveaux d'Enabled dans ces cellules (Figure 3A). Enfin, la surexpression d'une protéine de fusion Enabled-mCherry dans les CFP est suffisante au maintien d'un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte dans une plus grande région que celle couverte par les CAP, ce qui agrandit la zone d'ancrage d'*oskar/Staufen* dans l'ovocyte (Figure 3B-D).

L'ensemble de ces résultats suggère que les protrusions membranaires des CAP sont effectivement des filopodes, formés en région apicale des CAP grâce à la localisation spécifique de la protéine Enabled. De plus, ces filopodes semblent impliqués dans le maintien du contact entre les membranes de l'ovocyte et des CAP et dans l'ancrage d'*oskar/Staufen*.

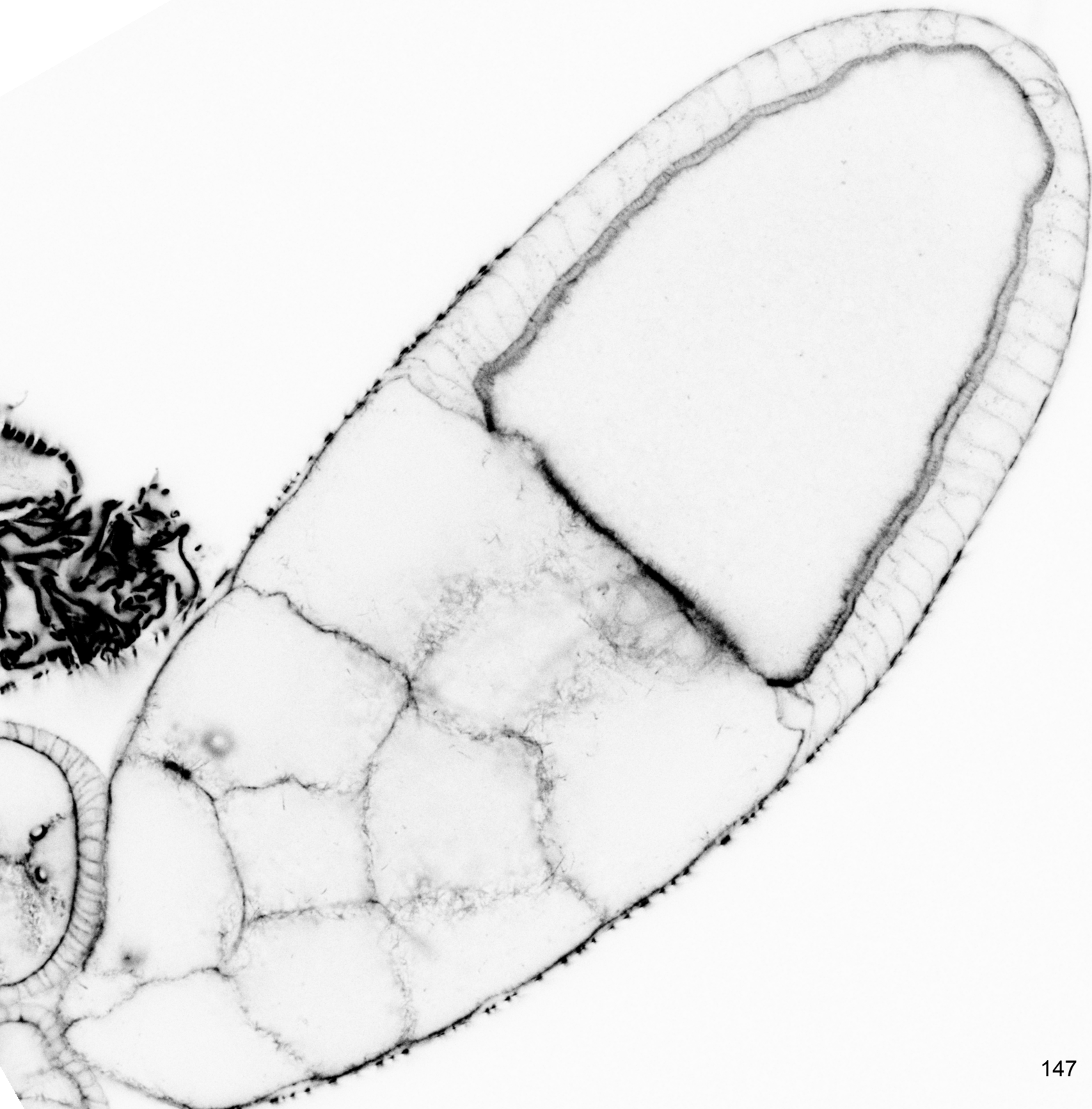
Légende de la Figure 3.

Dans toutes les images, le pôle postérieur est à droite. Uniquement une coupe confocale de la région postérieure des follicules est présentée, avec des agrandissements au niveau des CAP (rectangle rose) et des CFP adjacentes (rectangle blanc). Les étoiles jaunes, oranges, vertes et rouges indiquent les cellules polaires (CP) et les rangs de cellules folliculaires CP+1, CP+2 et CP+3 respectivement. "Serré" et "Espacé" sont des guides visuels pour comparer l'espace entre les membranes de l'ovocyte et apicales des CAP. **(A)** Follicules au stade 10a de l'ovogenèse de femelles contrôle (*w118*), exprimant un ARNi dirigé contre *upd* dans les CP (*upd>upd-RNAi*) et surexprimant *UAS-hop^{TUM}* dans les cellules folliculaires du pôle postérieur grâce au pilote *E4-Gal4* (*E4>hop^{TUM}*). Actine-F (gris, phalloïdine) permettant de visualiser les cortex cellulaires. Ena en filtre "cyan hot" (de bleu, faible intensité, à cyan, forte intensité). **(B)** Follicules au stade 10a de l'ovogenèse de femelles contrôle (*E4>*) et surexprimant *UAS-enabled-mCherry* grâce au pilote *E4-Gal4* (*E4>ena-mCherry*). Actine-F (gris, phalloïdine) permettant de visualiser les cortex cellulaires. Staufen (Stau) en filtre "fire" (de violet, faible

intensité, à orange, forte intensité). ADN en cyan (DAPI). Les têtes de flèche roses et blanche montrent respectivement la limite de la zone d'ancrage de Staufen en condition contrôle et la limite à partir de laquelle les membranes de l'ovocyte et apicale des CFP s'écartent en condition de surexpression d'*enabled-mcherry*. Quantifications **(C)** de la taille de la zone d'ancrage par le nombre de cellules folliculaires autour des CP faisant face au signal de Staufen et par le diamètre du croissant d'ancrage de Staufen et **(D)** de l'espacement entre les membranes de l'ovocyte et apicale des CAP/CFP en condition contrôle et de surexpression d'*enabled-mcherry* dans les CFP. En (C), les courbes grise et orange sont des guides visuels. St: stade. #: nombre. ns : non significatif. Tests Statistiques : (C) # de CF autour des CP : Mann-Whitney. (C) Diamètre et (D): unpaired t-test. Les étoiles indiquent les différences statistiquement significatives. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, and **** $p < 0,0001$. Échelles : $30\mu\text{m}$ sauf agrandissements $15\mu\text{m}$. (C) Nombre de poles postérieurs analysés : *E4*> St9 n=11 ; St10a n=18. *E4*>*ena-mcherry* St9 n=8 ; St10a n=13. (D) Nombre de mesures de l'espacement effectuées de chaque côté des CP : *E4*> n=32. *E4*>*mcherry* n=26.

Actine-F (phalloïdine) corticale délimitant les cellules dans un follicule ovarien.

DISCUSSION



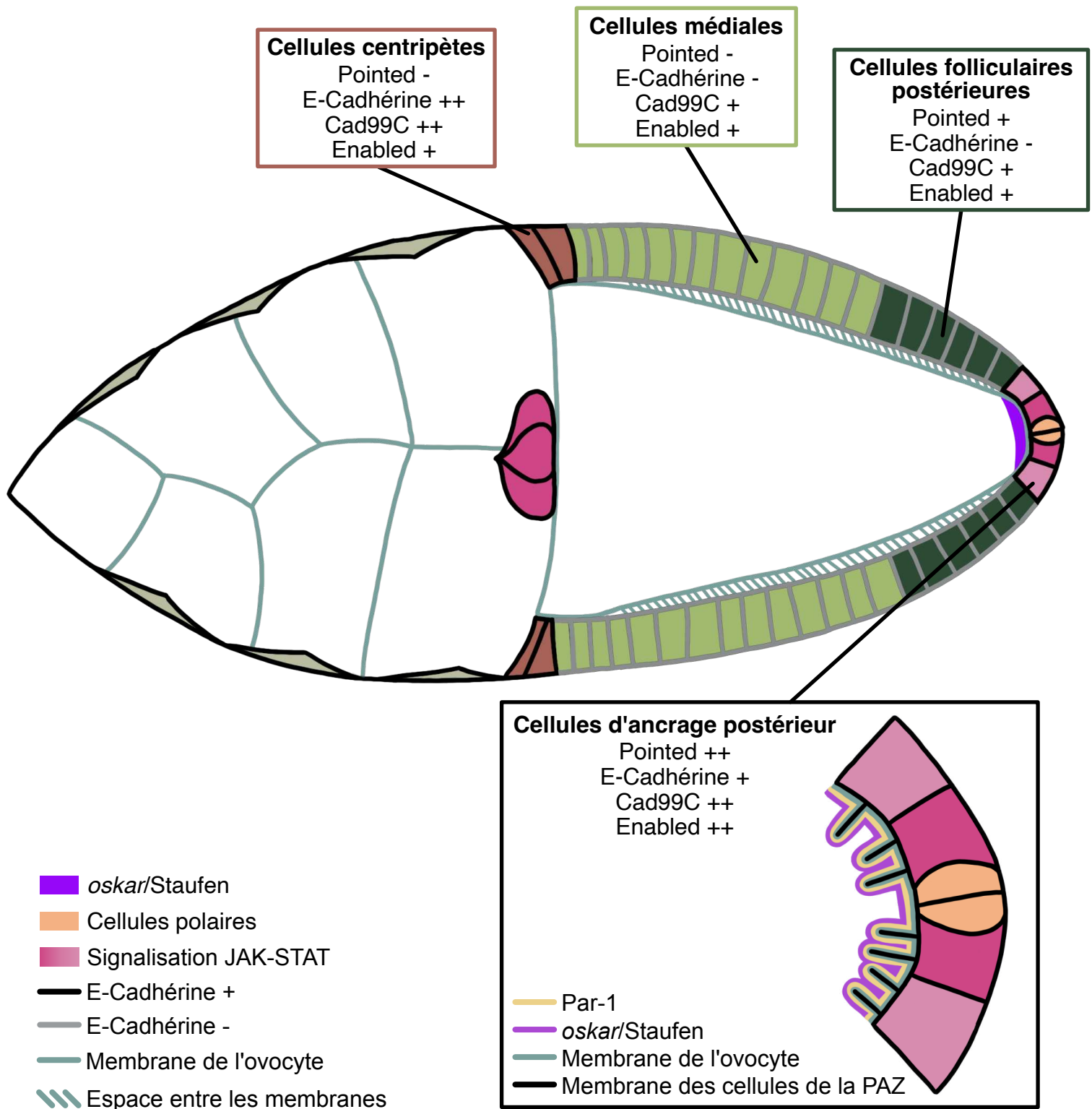


Figure 1 - Les Cellules d'Ancre Postérieur (CAP) : une sous-population de cellules folliculaires postérieures. L'antérieur est à gauche. Schéma d'un follicule au stade 10a de l'ovogénèse pour lequel les différentes sous-populations de cellules folliculaires entourant l'ovocyte sont indiquées avec leurs niveaux d'accumulation des protéines Pointed, E-Cadhérine, Cad99C et Enabled observés expérimentalement. Pour les CAP, l'agrandissement met en avant les filopodes en émanant et pénétrant dans l'ovocyte en poussant sur sa membrane et une représentation hypothétique de l'organisation de Par-1 et *oskar/Staufen* autour de ces structures membranaires.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont mené à l'identification et la caractérisation de la E-Cadhérine comme régulateur positif de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires au cours de l'ovogenèse. S'ils n'ont pas permis d'élucider le mécanisme précis derrière cette régulation, ils ont démontré que la E-Cadhérine forme un complexe avec le facteur de transcription Stat92E. De plus, mes observations ont permis de replacer cette régulation dans un processus physiologique au cours de l'ovogenèse que j'ai identifié : la restriction du gradient d'activité de la voie JAK-STAT au pôle postérieur du follicule se déroulant entre les stades 6 et 9.

J'ai démontré que l'expression du gène codant la E-Cadhérine diminue dans les CFP en réponse à la voie Gurken/EGFR et que cette diminution induit la restriction du gradient de la voie JAK-STAT à un rayon de deux cellules folliculaires autour des cellules polaires. De plus, j'ai identifié que cette restriction est requise pour la différenciation d'une nouvelle sous-population de CFP, les CAP, dont le nombre doit être finement régulé.

En effet, j'ai observé que les CAP sont les seules cellules gardant un contact étroit avec la membrane postérieure de l'ovocyte entre les stades 9 et 10b et ce notamment grâce à la E-Cadhérine, une cible de la voie JAK-STAT dans ces cellules. J'ai démontré que la voie JAK-STAT, en régulant le maintien de ce contact, était nécessaire au transport postérieur de l'ARNm *oskar* et de sa protéine associée *Staufen* dans l'ovocyte et pour contrôler la taille de leur zone d'accumulation au cortex postérieur de l'ovocyte. En effet, j'ai constaté que la taille du croissant d'*oskar*/*Staufen* au pôle postérieur de l'ovocyte n'est pas constante au cours du temps et que leur zone d'ancrage est progressivement restreinte pour ne plus faire face qu'aux CAP au stade 10. Cette régulation est cruciale, puisqu'une zone d'ancrage trop grande dans l'ovocyte mène à des défauts de formation des cellules germinales primordiales du futur embryon.

Dans cette partie, je vais discuter de la cohérence de mes résultats avec les données de la littérature et de leur impact en proposant une ouverture sur leur potentielle conservation dans d'autres tissus et/ou d'autres organismes, et ce en particulier pour :

- Le rôle de la E-Cadhérine comme régulateur positif de la voie JAK-STAT dans l'épithélium folliculaire.
- La régulation négative de la E-Cadhérine par la voie EGFR dans les CFP.
- La régulation positive de la E-Cadhérine par la voie JAK-STAT dans les CAP.

Puis, je vais aborder le rôle de la voie JAK-STAT dans la différenciation des CAP et dans le maintien d'un contact étroit entre ces cellules et la membrane de l'ovocyte.

Enfin, je vais tenter de faire le lien entre les CAP et l'évolution de la zone d'ancrage d'*oskar*/*Staufen* en replaçant l'ensemble de mes résultats dans la chronologie actuelle des événements menant à l'ancrage d'*oskar*/*Staufen*.

1. Le rôle de la E-Cadhérine comme régulateur positif de la voie JAK-STAT

Au cours de mon premier projet, j'ai notamment démontré que la E-Cadhérine est un régulateur positif de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires par des expériences de perte de fonction de la E-Cadhérine dans les cellules somatiques ainsi que dans les cellules germinales. Cette seconde expérience est particulièrement intéressante car elle apporte une nouvelle preuve de l'existence d'une adhérence hétérotypique entre ces deux types cellulaires et propose un nouveau mécanisme pour lequel le contact entre les cellules germinales et les cellules folliculaires est requis : la mise en place d'un patron correct d'activité de la voie JAK-STAT. De plus, nous avons démontré que la E-Cadhérine et le facteur de transcription Stat92E forment un complexe *in vivo*, permettant de proposer un mécanisme potentiel de régulation de la voie JAK-STAT par le contrôle de la localisation subcellulaire d'un de ses acteurs.

Dans cette partie, je vais dans un premier temps replacer mes résultats dans le contexte des connaissances actuelles sur le contact entre les cellules germinales et somatiques dépendant de la E-Cadhérine. Puis, je vais recentrer la discussion sur la régulation de la voie JAK-STAT, en me concentrant sur l'interaction de la E-Cadhérine avec le facteur de transcription Stat92E. Enfin, je vais aborder des exemples de systèmes dans lesquels cette régulation pourrait être conservée.

1.1. Nouvelle preuve d'une adhérence dépendante de la E-Cadhérine entre cellules folliculaires et germinales

La présence physique de la E-Cadhérine à l'interface entre cellules germinales et somatiques reste spéculative. Les analyses par immunomarquage ont montré que la E-Cadhérine est majoritairement détectée à la membrane apicale des cellules folliculaires, où il a été proposé qu'en plus d'assurer la formation des jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales, elle permettrait l'interaction avec les cellules germinales (Tanentzapf et al., 2000). Dans l'ovocyte, la E-Cadhérine est détectée au niveau de la membrane postérieure lors du processus de positionnement de l'ovocyte au pôle postérieur, bien qu'il a été admis que la résolution de ces images ne permettait pas de distinguer s'il s'agissait bien de la E-Cadhérine germinale ou de la somatique (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998b). Très récemment, une équipe a observé des jonctions adhérentes entre les cellules du cyste et les cellules folliculaires par microscopie électronique, mais sans démontrer la présence de E-Cadhérine (Riparbelli et al., 2022).

Actuellement, les preuves les plus convaincantes de l'adhérence entre les cellules germinales et folliculaires via la E-Cadhérine restent celles fournies par des études fonctionnelles. Dans le germarium, la E-Cadhérine est nécessaire dans les deux types cellulaires pour l'encapsulation correcte des cystes par les cellules folliculaires (Chanet and Huynh, 2020) ainsi que pour le positionnement et l'ancrage de l'ovocyte au pôle postérieur du follicule (Godt and Tepass, 1998; Gonzalez-Reyes and St Johnston,

1998b). Au stade 9, l'adhérence entre le groupe de cellules de bordure et les cellules nourricières est nécessaire pour guider leur migration (Cai et al., 2014). De même, au stade 10b, la E-Cadhérine est requise dans les cellules folliculaires et germinales pour la migration des cellules centripètes le long de la membrane antérieure de l'ovocyte (Niewiadomska et al., 1999). Ainsi, mes résultats démontrant que la perte de fonction de la E-Cadhérine dans les cellules germinales entraîne une diminution de l'activité de la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires et un défaut d'apoptose des cellules polaires apportent une nouvelle preuve fonctionnelle que le cyste germinale et les cellules folliculaires adhèrent via la E-Cadhérine.

1.2. Quelle population de E-Cadhérine folliculaire est impliquée dans la régulation positive de la voie JAK-STAT ?

Dans notre étude, nous avons démontré que la E-Cadhérine et le facteur de transcription Stat92E forment un complexe *in vivo*, suggérant que la E-Cadhérine pourrait réguler la voie JAK-STAT par une modulation de la localisation subcellulaire de Stat92E. Comme présenté en introduction et discuté dans la partie précédente, deux populations de E-Cadhérine seraient présentes dans les cellules folliculaires, l'une permettant l'interaction avec les cellules germinales (apicale) et l'autre avec les cellules folliculaires voisines (apico-latérale). Les expériences de perte de fonction de la E-Cadhérine dans les cellules germinales ont démontré que la population apicale est impliquée dans la régulation de la voie JAK-STAT. Cependant, les deux populations sont affectées par les expériences de perte de fonction de la E-Cadhérine dans les cellules somatiques, empêchant de démontrer fonctionnellement si seule la E-Cadhérine apicale jouerait un rôle dans cette régulation ou si la E-Cadhérine apico-latérale serait également impliquée. Bien qu'il ait été suggéré que ces populations soient adressées dans des régions de la membrane distinctes par deux mécanismes différents (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998b), il paraît complexe de poursuivre une étude fonctionnelle en tentant d'affecter uniquement la E-Cadhérine apico-latérale. En revanche, une étude plus approfondie de la localisation subcellulaire de Stat92E et de son interaction avec la E-Cadhérine pourrait apporter des précisions quant à l'implication de chaque population dans cette régulation, discuté dans la partie suivante.

1.3. La localisation subcellulaire de la E-Cadhérine et son interaction avec Stat92E dans l'ovaire

L'étude de la localisation subcellulaire de la protéine de fusion Stat92E-GFP surexprimée dans les cellules folliculaires nous a permis de décrire que Stat92E-GFP est notamment localisé tout le long de la membrane apico-latérale, dans des régions où la E-Cadhérine est également observée. Par des expériences de co-immunoprécipitation et de PLA (pour Proximity Ligation Assay), nous avons démontré

que la E-Cadhérine et le facteur de transcription Stat92E forment un complexe *in vivo* dans les cellules folliculaires. Ainsi, nous avons pu proposer un modèle dans lequel la E-Cadhérine régulerait positivement la voie JAK-STAT dans les cellules folliculaires par rapprochement des acteurs de la transduction, modèle cohérent avec les connaissances actuelles sur la localisation subcellulaire de la E-Cadhérine et sur l'activation de la voie JAK-STAT dans notre système.

Le ligand Upd est traduit et sécrété au pôle apical des cellules polaires (Van de Bor et al., 2011) et diffuse entre les cellules de l'épithélium folliculaire et les cellules germinales (Hayashi et al., 2012). Son récepteur Dome est localisé en région apico-latérale de la membrane des cellules folliculaires (Ghiglione et al., 2002). Ainsi, l'activation de la voie JAK-STAT a lieu majoritairement en région apicale des cellules folliculaires, comme attesté par l'accumulation de vésicules d'endocytose du complexe Upd/Dome dans cette zone (Devergne et al., 2007).

Ainsi, l'interaction de Stat92E avec la E-Cadhérine pourrait permettre de recruter Stat92E dans les régions où la E-Cadhérine est présente, donc majoritairement à la membrane apicale et en plus faible quantité à la membrane latérale, rapprochant le facteur de transcription de la principale zone d'activation de la voie JAK-STAT. De même, la localisation de Dome décrite dans la littérature étant similaire à celle que nous avons observée pour Stat92E-GFP (Ghiglione et al., 2002), les jonctions adhérentes pourraient servir de sous-domaines membranaires favorables à l'activation de la voie JAK-STAT par le recrutement spécifique du récepteur et du facteur de transcription à proximité de la zone de diffusion du ligand. Il serait intéressant d'observer si les localisations de Stat92E et Dome sont affectées en condition de perte de fonction de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires et germinales.

Pour faire le lien avec la partie précédente, nos observations sur la localisation de Stat92E-GFP suggèrent que le facteur de transcription interagirait à la fois avec la E-Cadhérine présente aux jonctions cellules germinales/folliculaires et folliculaires/folliculaires, ce qui est donc en faveur d'une implication des deux populations de E-Cadhérine somatique dans la régulation de la voie JAK-STAT. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en étendant nos techniques d'observation vers la microscopie électronique pour réaliser une étude ultrastructurale. L'utilisation de la technique de détection de protéines fusionnées à la GFP par l'outil GBP-APEX (Bernard et al., 2021) pourrait permettre de visualiser précisément la localisation de Stat92E-GFP au niveau des différents types de jonctions adhérentes.

1.4. Discussion sur la conservation de la régulation de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine

Comme présenté en introduction, des liens entre jonctions adhérentes, polarité cellulaire et activation de la voie JAK-STAT ont déjà été identifiés dans d'autres tissus chez la drosophile et chez les vertébrés. Je vais donc tenter de replacer mes résultats

dans d'autres contextes dans lesquels la régulation que nous avons identifiée pourrait s'appliquer.

1.4.1. Conservation de l'activation apicale de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine

Restons dans un premier temps chez la drosophile. Dans les cellules d'origine ectodermique de l'intestin et des spiracles postérieures de l'embryon, l'activation de la voie JAK-STAT dépend de la polarisation apico-basale par une interaction physique entre Stat92E et Baz/Par-3 (Sotillos et al., 2013). Dans ces cellules, Stat92E, Dome, Baz/Par-3 et la E-Cadhérine sont tous localisés en région apicale (Uemura et al., 1996; Sotillos et al., 2008). Toujours au cours du développement, la E-Cadhérine est impliquée dans le recrutement de Baz/Par-3 dans les cellules épithéliales du disque d'aile (Wei et al., 2005), et inversement Baz/Par-3 recrute la E-Cadhérine lors de la cellularisation de l'embryon (Harris and Peifer, 2005). Enfin, la protéine Baz/Par-3 est une protéine d'échafaudage, et il a été proposé qu'elle servirait de lien entre la E-Cadhérine et Stat92E pour le recrutement de ce dernier aux jonctions adhérentes, sans que cela ait été démontré (Ramirez Moreno et al., 2021).

Si on s'aventure dans un modèle vertébré, certaines de ces interactions ont aussi été décrites. Dans des cellules rénales canines en culture présentant une polarité apico-basale, où STAT3 est activé de façon polarisé en région apicale (Buk et al., 2004), des jonctions adhérentes sont présentes tout le long de la membrane latérale, du pôle apical au pôle basal, et PAR-3 y est recruté par interaction avec la E-Cadhérine (Wang et al., 2009).

Bien qu'une interaction entre la E-Cadhérine et Baz/Par-3 n'a pas été démontrée chez la drosophile ni dans les cellules de l'intestin et des spiracles postérieures, ni dans les cellules folliculaires, l'ensemble de ces résultats combiné à nos découvertes pourraient suggérer que dans ces systèmes, Baz/Par-3, la E-Cadhérine et Stat92E forment un complexe nécessaire à une activation correcte de la voie JAK-STAT, hypothèse qu'il serait très intéressant de tester.

1.4.2. La régulation positive de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine sans polarisation apicale

En dehors d'un système impliquant une activation apicale de la signalisation, la E-Cadhérine et la voie JAK-STAT partagent d'autres fonctions communes au cours desquelles notre modèle pourrait être conservé.

1.4.2.1. Ouverture aux niches de cellules souches germinales chez la drosophile

Dans l'ovaire et le testicule de la drosophile, Upd est produit par les cellules de la niche des cellules souches germinales et est requis pour la maintenance de leur état de

cellules souches. Dans ces deux systèmes, la voie JAK-STAT participe à la stimulation de la production des ligands de la voie BMP, qui vont être ensuite sécrétés au niveau de la niche (Kiger et al., 2001; Leatherman and Dinardo, 2010). La conséquente activation de la voie BMP dans les cellules germinales entraîne la répression transcriptionnelle de *bam* et permet le maintien d'un état indifférencié (Chen and McKearin, 2003; Kawase et al., 2004; Song et al., 2004). En parallèle, la E-Cadhérine est impliquée dans l'adhérence entre les cellules souches germinales et la niche, et donc aussi nécessaire au maintien de leur état indifférencié (Song et al., 2002; Wang et al., 2006; Wang and Page-McCaw, 2018). Il est intéressant de noter que dans la niche du testicule, Par-3 colocalise avec la E-Cadhérine (Leatherman and Dinardo, 2010).

Ainsi, dans les niches du testicule et de l'ovaire, les pertes de fonction de la voie JAK-STAT ou de la E-Cadhérine entraînent toutes deux une perte des cellules souches germinales. Bien que le rôle de la E-Cadhérine soit actuellement décrit comme servant de point d'ancrage pour maintenir les cellules souches germinales dans la niche, cette phénocopie donne tout de même envie de tester si notre modèle de régulation positive de la voie JAK-STAT ne s'appliquerait pas dans ces systèmes.

1.4.2.2. Ouverture à la niche de cellules souches dans l'intestin chez la drosophile

Dans l'intestin de la drosophile, les cellules souches ne sont pas rassemblées dans une niche mais sont réparties dans tout l'épithélium intestinal et adhèrent à la membrane basale. Leur division asymétrique permet leur auto-renouvellement et la génération d'un entéroblaste, qui se différencie en entérocyte en réponse aux voies de signalisation Delta/Notch et JAK-STAT (Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006; Beebe et al., 2010). Dans ce système, la E-Cadhérine est aussi nécessaire à la différenciation correcte des entéroblastes, et une perte de fonction de la E-Cadhérine mène au même phénotype qu'une perte de fonction de la voie JAK-STAT, c'est-à-dire une accumulation des cellules progénitrices (Maeda et al., 2008). Bien que ce rôle de la E-Cadhérine soit associé à un effet sur la voie Delta/Notch, il serait intéressant de tester si la E-Cadhérine régule également la voie JAK-STAT dans ce système.

CONCLUSION

L'ensemble de ces éléments semble placer la E-Cadhérine comme un potentialisateur de la signalisation JAK-STAT par la formation d'un complexe avec Stat92E, possiblement via Par-3 chez la drosophile, mécanisme qui pourrait être conservé chez les vertébrés. Cette interaction permettrait à la fois la polarisation de la signalisation JAK-STAT dans les cellules épithéliales, mais pourrait aussi plus généralement contrôler l'activation de la voie JAK-STAT dans les cellules adhérentes, tel que démontré dans des cellules de carcinome en culture (Onishi et al., 2008). Ainsi, notre

modèle est particulièrement intéressant car, en plus de démontrer pour la première fois une régulation de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine chez la drosophile, il semble s'inscrire dans un mécanisme de régulation général et conservé.

2. Les causes et conséquences de la dynamique de la E-Cadhérine et de la voie JAK-STAT au pôle postérieur

Parfois, les observations fortuites sont le début d'une belle histoire. Au cours de mon premier projet, j'ai observé la diminution du gradient d'activation de la voie JAK-STAT au pôle postérieur et ma cheffe d'équipe Anne-Marie Pret a remarqué la diminution de la E-Cadhérine dans les CFP. Je venais de démontrer la régulation de la voie JAK-STAT par la E-Cadhérine et le fait que la baisse de la E-Cadhérine précède celle de la voie JAK-STAT suggérait fortement qu'il s'agissait d'un exemple physiologique de cette régulation. La principale différence entre les pôles antérieur et postérieur du follicule étant la présence de l'ovocyte, il m'a paru assez évident qu'il fallait se pencher sur la signalisation Gurken/EGFR pour trouver une potentielle explication à la dynamique que nous venions de mettre en évidence.

Ce travail a permis de démontrer que (1) la voie Gurken/EGFR régule négativement la E-Cadhérine dans les CFP, (2) que cette diminution de la E-Cadhérine mène à une restriction du gradient d'activité de la voie JAK-STAT et (3) que la E-Cadhérine est une cible de la voie JAK-STAT dans les cellules toujours actives pour cette signalisation après cette restriction. L'ensemble de ces résultats a permis l'identification d'une régulation croisée de la E-Cadhérine par les voies Gurken/EGFR (négative) et JAK-STAT (positive) se déroulant entre les stades 6 et 8 de l'ovogenèse.

Dans une première partie, je vais discuter de la diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires en abordant les causes possibles de cette diminution en réponse à la voie Gurken/EGFR, puis ses conséquences en replaçant la diminution de la E-Cadhérine dans la série d'évènements de morphogenèse se déroulant au pôle postérieur. Je vais également mentionner un aspect inexpliqué de la dynamique de la E-Cadhérine dans l'épithélium folliculaire que j'ai observé. Ensuite, je vais discuter de la régulation de l'expression du gène codant la E-Cadhérine par la voie JAK-STAT dans les CAP. Enfin, je vais terminer par un parallèle entre la régulation croisée de la E-Cadhérine par les voies Gurken/EGFR et JAK-STAT et la régulation du gradient de la voie JAK-STAT au pôle antérieur.

2.1. La diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires entourant l'ovocyte

2.1.1. Le rôle de la voie Gurken/EGFR dans la diminution de la E-Cadhérine

J'ai décrit qu'à la fois la quantité de protéine E-Cadhérine et son expression transcriptionnelle diminuaient drastiquement dans les CFP, au stade 6 de l'ovogenèse en réponse à la voie Gurken/EGFR. Il est intéressant de noter qu'il ne semble pas y

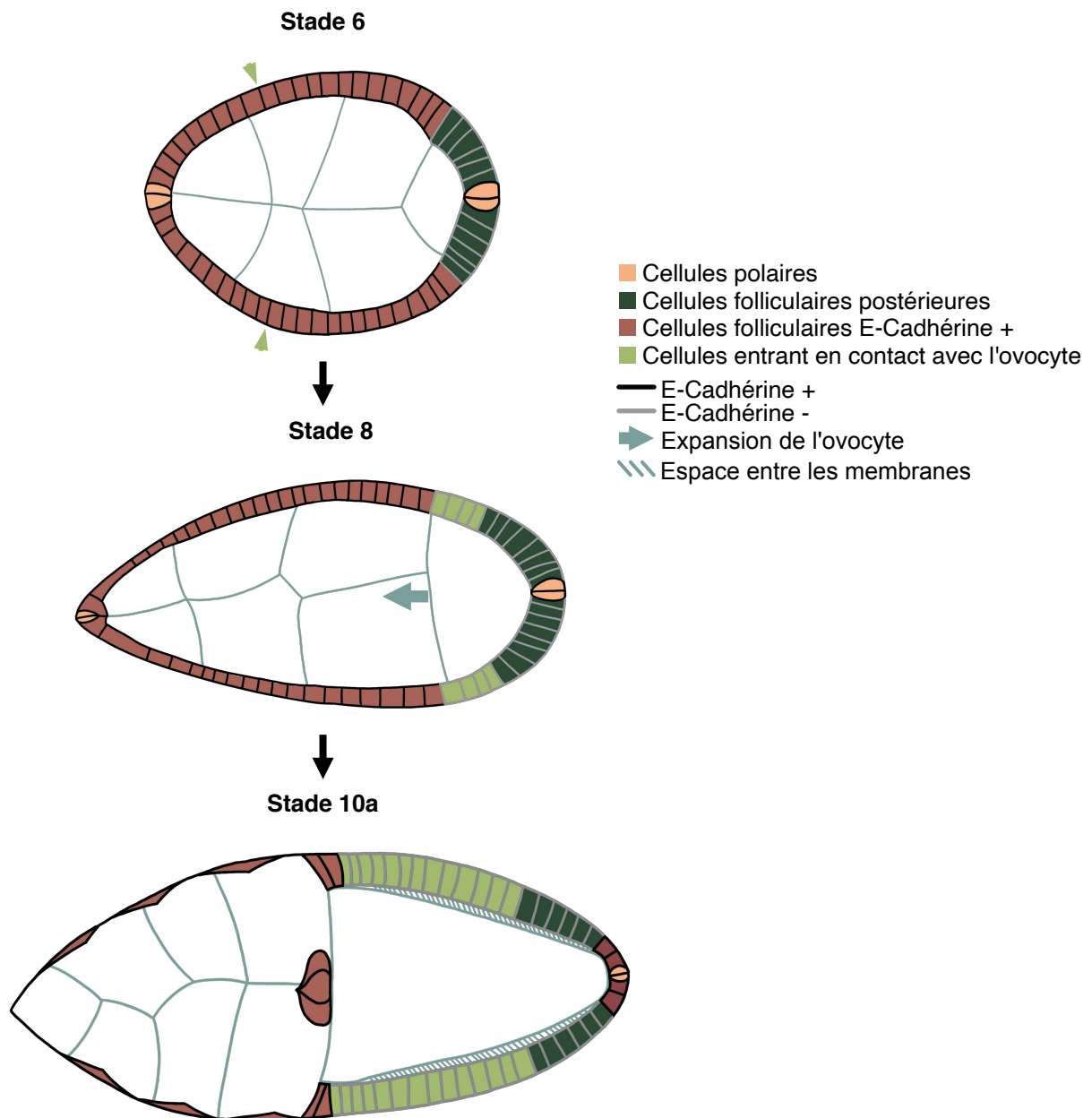


Figure 2 - La diminution de la E-Cadhérine dans les cellules médiales entrant en contact avec l'ovocyte. Dans tous les schémas, l'antérieur est à gauche. Les têtes de flèches vertes indiquent la limite antérieure de la population de cellules passant d'un contact avec les cellules nourricières au stade 6 à un contact avec l'ovocyte par son expansion et passant d'une forte à une faible expression de la E-Cadhérine. Les cellules E-Cadhérine + au pôle postérieur au stade 10a correspondent aux CAP.

avoir de décalage temporel entre les diminutions transcriptionnelle et de la protéine à la membrane.

L'existence d'une boucle de régulation négative entre la voie EGFR et la E-Cadhérine dans des cellules normales et cancéreuses chez les mammifères est connue et vient de faire l'objet d'une revue (Ramírez Moreno and Bulgakova, 2022). Notamment, la voie EGFR régule négativement la E-Cadhérine en agissant au niveau transcriptionnel mais aussi sur sa disponibilité à la membrane, et ce par endocytose, en déstabilisant son association au cortex ou encore en induisant son clivage. Cette double action pourrait ainsi expliquer les diminutions concomitantes de la protéine et de l'expression transcriptionnelle de la E-Cadhérine dans les CFP.

Chez la drosophile, il a été démontré que la voie EGFR et la E-Cadhérine interagissent génétiquement et physiquement lors du développement du système visuel et que la voie EGFR est requise pour diminuer l'adhérence cellulaire (Dumstrei et al., 2002). Une modification de la localisation membranaire de la E-Cadhérine en réponse à la voie EGFR a aussi été décrite (O'Keefe et al., 2007). En revanche, une régulation négative de la transcription de *shotgun* en réponse à la voie EGFR ne semble pas avoir été démontrée précédemment. Ainsi, mon modèle décrirait pour la première fois ce type de régulation chez la drosophile.

2.1.2. La diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires en contact avec la région antéro-latérale de l'ovocyte

Il a été décrit que les cellules médiales et les futures cellules centripètes, précédemment en contact avec les cellules nourricières, entrent en contact avec l'ovocyte du fait de son expansion rapide en taille à partir du stade 7 (Kolahi et al., 2009). Or, j'ai observé qu'au stade 6 ces cellules folliculaires expriment fortement la E-Cadhérine. En revanche, quand l'ovocyte grandit, les nouvelles cellules folliculaires entrant en contact avec lui présentent de faibles niveaux de E-Cadhérine, suggérant que le passage d'un contact avec les cellules nourricières à un contact avec l'ovocyte induit une diminution de l'expression de *shotgun* dans les cellules folliculaires (Figure 2). La voie Gurken/EGFR ne semble pas être impliquée dans cet événement car (1) à ces stades le noyau de l'ovocyte a déjà migré, relocalisant la signalisation Gurken/EGFR à une région antéro-latérale restreinte et (2) j'ai observé que la perte de fonction du récepteur EGFR dans des cellules au sein de cette population n'entraîne pas une augmentation de la E-Cadhérine (résultat non montré).

Comment cette diminution de la E-Cadhérine est-elle induite ? Étant donné qu'elle fait suite à l'entrée en contact des cellules folliculaires avec l'ovocyte, cela suggère que l'ovocyte est responsable de cette diminution. Une hypothèse serait que l'ovocyte présente également moins de E-Cadhérine à sa membrane et que cette faible adhérence induise la baisse d'expression de *shotgun* dans les cellules folliculaires entrant en contact avec lui. En effet, il a déjà été démontré que la perte d'adhérence dans une cellule peut être transmise à ses voisines pour permettre un maintien de

l'homéostasie jonctionnelle dans un épithélium (Georgiou et al., 2008). De plus, une diminution de la E-Cadhérine à la membrane peut induire un rétrocontrôle négatif sur sa transcription (Ramirez Moreno et al., 2021). Cependant, d'après mes observations, une perte de fonction de la E-Cadhérine dans le cyste germinale n'entraîne pas une diminution de l'expression de *shotgun* dans l'épithélium folliculaire en contact avec les cellules nourricières. Cette observation n'exclut pas l'hypothèse proposée mais suggère que d'autres éléments seraient requis pour entraîner la diminution de la E-Cadhérine dans ces cellules. Il est notamment intéressant de noter que ces cellules entrant en contact avec l'ovocyte expriment *mirror (mirr)* et sont actives pour la voie BMP (Fregoso Lomas et al., 2016), deux pistes qu'il pourrait être intéressant d'étudier pour élucider le mécanisme derrière la diminution de la E-Cadhérine dans ces cellules.

2.1.3. Les conséquences de la diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires sur leur contact avec l'ovocyte

La fonction de la E-Cadhérine comme régulateur positif de la voie JAK-STAT suggère que sa diminution dans les cellules folliculaires postérieures conduit à la restriction du gradient d'activité de la voie JAK-STAT pour définir les CAP (voir 3). Mais cet événement précède d'autres phénomènes pour lesquels il serait intéressant d'étudier un lien éventuel avec une diminution de la E-Cadhérine.

Suite à leur différenciation, les CFP changent de forme en s'allongeant selon l'axe apico-basal (Kolahi et al., 2009). Jusqu'au stade 5, le gène codant la Cad99C est exprimé dans les cellules folliculaires terminales mais au stade 6, son expression devient restreinte aux CFP, induisant la formation de microvillosités à leurs membranes apicales, qui s'intercalent avec celles se formant simultanément à la surface de l'ovocyte (D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006; Riparbelli et al., 2022). En parallèle, une disparition des jonctions d'adhérence et un léger espacement entre la membrane de l'ovocyte et la membrane apicale des cellules folliculaires sont observés par microscopie électronique (Riparbelli et al., 2022). Entre les stades 6 et 10, l'espacement entre les membranes s'élargit du fait de la sécrétion de la membrane vitelline par les cellules folliculaires (D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006; Cavaliere et al., 2008) sauf au niveau des CAP (mes observations et Milas et al., 2022). Cette série d'évènements semble initiée par la voie Gurken/EGFR puisque les membranes de l'ovocyte et des CFP restent accolées (1) face à des clones perte de fonction de EGFR localisés dans la population des CFP et (2) en contexte de cyste germinale mutant pour *gurken*. De plus (3) lorsque l'ovocyte n'est pas ancré au pôle postérieur, induisant une diminution de la E-Cadhérine dans les cellules folliculaires adjacentes (résultat présenté dans le papier n°2), un espace est visible entre l'ovocyte et ces cellules (résultat non montré). Il est intéressant de noter que les cellules folliculaires entrant en contact avec l'ovocyte sans avoir reçu de ligand Gurken (Figure 2) commencent à exprimer la Cad99C, à former des microvillosités à leurs membranes apicales et présentent elles-aussi un espacement avec l'ovocyte ((D'Alterio et al.,

2005; Schlichting et al., 2006) et mes observations). Or, un des points communs entre ces cellules et les CFP est la baisse des niveaux de la E-Cadhérine, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur d'un lien entre la diminution de l'expression de *shotgun*, la formation des microvillosités et le changement de contact avec l'ovocyte, initiant l'écartement entre les membranes de l'ovocyte et des cellules folliculaires. Ainsi, il pourrait être intéressant d'étudier cette relation potentielle plus en profondeur. Dans un second temps, au sein des CFP, la différenciation des CAP permet le maintien d'un contact étroit avec l'ovocyte qui s'oppose à l'écartement des membranes et qui pourrait également dépendre des microvillosités (voir 3.2).

2.2. La E-Cadhérine comme cible de la voie JAK-STAT dans les CAP

2.2.1. L'expression de *shotgun* par la voie JAK-STAT dans les CAP ne dépend pas de *Slbo*

J'ai démontré que dans les CAP, la E-Cadhérine est une cible de la voie JAK-STAT. Dans l'épithélium folliculaire, cette régulation a déjà été démontrée au pôle antérieur, où elle est indirecte puisque *shotgun* est la cible du facteur de transcription *Slbo*, dont le gène *slbo* est la cible directe de Stat92E (Niewiadomska et al., 1999; Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002). Cependant, *slbo* n'est pas exprimé dans les cellules folliculaires du pôle postérieur (Montell et al., 1992). De plus, les expériences de perte de fonction de *slbo* que j'ai réalisées, bien qu'entraînant les phénotypes attendus de défauts de migration des cellules de bordure, n'ont pas entraîné de diminution de l'expression de *shotgun* dans les CAP (résultats non montrés). Ainsi, la E-Cadhérine serait une cible de la voie JAK-STAT selon deux mécanismes distincts dépendant et indépendant de *Slbo* dans les cellules de bordure et dans les CAP respectivement.

2.2.2. La E-Cadhérine et la voie JAK-STAT effectuent une boucle d'amplification dans les CAP

Au cours de ma thèse, j'ai démontré que la E-Cadhérine est à la fois un régulateur positif et une cible de la voie JAK-STAT. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une boucle d'amplification entre la voie JAK-STAT et la E-Cadhérine dans les CAP. Ce type de relation ne semble pas avoir déjà été décrit dans d'autres processus chez la drosophile, mais des indices suggèrent qu'il pourrait être conservé. Le plus évident serait d'étudier si ce rétrocontrôle positif s'applique également au pôle antérieur du follicule pour la différenciation et la migration des cellules de bordure. Un second exemple serait dans le système des niches de cellules souches, ce qui a même déjà été suggéré dans une revue, compte tenu de l'ensemble des connaissances actuelles sur les régulations mutuelles entre la E-Cadhérine et la voie JAK-STAT dans ces systèmes (Bausek, 2013).

2.3. Les conséquences de la régulation croisée de la E-Cadhérine sur le gradient d'activité de la voie JAK-STAT au pôle postérieur

La restriction du gradient d'activité de la voie JAK-STAT dans les CFP que j'ai identifié n'est pas sans rappeler le système ON/OFF décrit au pôle antérieur pour définir les cellules de bordure (Starz-Gaiano et al., 2008, 2009). Au pôle antérieur, les effets antagonistes d'Apontic et de Slbo permettent à la fois de définir précisément le nombre de cellules de bordure et d'empêcher une activation intermédiaire de la voie JAK-STAT et le recrutement de cellules de bordure anormales (voir Introduction-Partie 1, 4.3 et Starz-Gaiano et al., 2008). Mon modèle propose que (1) les régulations opposées de JAK-STAT et Gurken/EGFR sur les niveaux d'E-Cadhérine et (2) la boucle d'amplification entre la voie JAK-STAT et la E-Cadhérine permettent de définir une frontière nette entre activation et extinction de la voie JAK-STAT dans les CFP. Ainsi, la voie JAK-STAT étant nécessaire pour l'accumulation postérieure d'*oskar*/Staufen, le contrôle du gradient au pôle postérieur empêche la formation d'une zone d'ancrage trop grande et/ou la différenciation de CAP anormales en réponse à une activation intermédiaire de la voie JAK-STAT, deux éléments qui pourraient induire des défauts d'accumulation d'*oskar*/Staufen et avoir des conséquences sur le développement des cellules polaires du futur embryon.

CONCLUSION

Les deux processus de régulation des niveaux d'E-Cadhérine par la voie Gurken/EGFR (négative) et par la voie JAK-STAT (positive) que j'ai identifiés dans mon système trouvent un écho dans la littérature, me permettant de les proposer comme nouveaux exemples physiologiques de ces régulations.

De plus, la diminution physiologique de la E-Cadhérine dans les CFP que j'ai mise en évidence n'avait encore jamais été décrite et pourrait être prise en compte pour l'étude des événements de morphogenèse résultant de la différenciation de ces cellules.

Enfin, mes résultats ajoutent un aspect dynamique à la relation entre les voies de signalisation Gurken/EGFR et JAK-STAT au cours de l'ovogenèse. J'ai pu identifier que leurs actions conjointes pour la différenciation des CFP induit un rétrocontrôle négatif indirect via la diminution des niveaux d'E-Cadhérine sur la voie JAK-STAT menant à la restriction de son gradient d'activité et permet à la voie JAK-STAT d'assurer une fonction nouvellement identifiée : la différenciation des CAP.

3. Le rôle nouvellement identifié de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogenèse : la différenciation des CAP

Mes résultats ont démontré que la restriction de la voie JAK-STAT au pôle postérieur permet la différenciation d'un nombre précis de CAP, correspondant aux CFP comprises dans un rayon de deux cellules autour des cellules polaires. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du gène codant la E-Cadhérine, cible transcriptionnelle de la voie JAK-STAT, suffisante au maintien d'un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte et le nombre de CAP détermine ainsi la taille de la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen. Ce contrôle est crucial puisqu'une zone d'ancrage trop étendue du fait d'un agrandissement du gradient d'activité de la voie JAK-STAT au pôle postérieur mène à des défauts de formation des cellules polaires chez l'embryon. Les effets drastiques de la perte de fonction de *shotgun* ont empêché d'étudier les effets de ce contexte génétique sur le contact entre les membranes. Cependant, j'ai démontré que la surexpression de *shotgun* en contexte de perte de fonction d'*upd* sauve le phénotype d'écartement entre les membranes des CAP et de l'ovocyte, argument en faveur d'une nécessité de la E-Cadhérine dans le maintien de ce contact. Dans ce modèle, des zones d'ombre persistent sur le mécanisme de maintien du contact entre les membranes dépendant de la voie JAK-STAT et de la E-Cadhérine, que je vais tenter d'éclaircir.

3.1. Le maintien d'un contact étroit entre les membranes semble indépendant d'une interaction Cadhérine-Cadhérine

Dans le germarium, l'interaction entre les cellules folliculaires au pôle postérieur du follicule et l'ovocyte a été démontrée comme dépendante de l'expression du gène codant la E-Cadhérine par les deux types cellulaires (Godt and Tepass, 1998; Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998b). Cependant, mes expériences de perte de fonction de *shotgun* dans les cellules germinales suggèrent que le maintien du contact étroit entre les membranes de l'ovocyte et des CAP ne requiert pas la E-Cadhérine du côté de l'ovocyte. Il faut bien entendu modérer cette conclusion car il s'agit uniquement d'une perte de fonction, il est possible que la diminution de la E-Cadhérine ne soit pas totale et qu'il en reste suffisamment pour maintenir le contact étroit entre les membranes. Si à l'avenir, il était confirmé que l'interaction entre les membranes de l'ovocyte et des CAP est indépendante de la E-Cadhérine germinale, cela pourrait s'expliquer par le fait que les jonctions d'adhérence entre l'ovocyte et les CFP sont perdues au stade 6 (Riparbelli et al., 2022), suggérant que les mécanismes d'interaction entre ces cellules sont différents avant et après ce stade. Ainsi, soit la E-Cadhérine des CAP formerait des jonctions hétérophiles avec un autre type de Cadhérine présent à la membrane de l'ovocyte, soit son rôle résiderait dans une autre fonction que la formation de jonctions adhérentes avec la membrane de l'ovocyte.

3.2. Lien entre la E-Cadhérine, la polarité des CAP et le maintien d'un espace étroit entre les membranes

Pour poursuivre sur la seconde hypothèse émise juste avant, une possibilité serait que la E-Cadhérine soit impliquée dans le contrôle de la morphologie des CAP, elle-même requise pour le contact entre les membranes. En faveur de cette hypothèse, l'augmentation physiologique de l'expression du gène codant la E-Cadhérine dans les CAP entraîne son accumulation à la membrane apicale mais aussi aux membranes latérales. Cette observation suggère que son rôle ne réside pas uniquement en région apicale, au contact avec l'ovocyte, mais également dans d'autres domaines membranaires des CAP. De plus, cette accumulation est importante pour le maintien de leur morphologie puisqu'une perte de fonction de la E-Cadhérine entraîne des défauts de polarité apico-basale des CAP, illustrés par un domaine apical des CAP drastiquement réduit en taille et par la perte de contact avec l'ovocyte due à l'accumulation ectopique d'un composant de la matrice extracellulaire, la Laminine A, entre ces cellules et l'ovocyte. Il est intéressant de noter que ces phénotypes ne sont jamais observés avant le stade 9, suggérant que ce stade marque un tournant à partir duquel la E-Cadhérine est spécifiquement requise dans les CAP pour maintenir leur intégrité dans l'épithélium (voir 3.2.3).

Ces phénotypes sont intéressants car ils font écho à plusieurs études ayant fait un lien entre la polarité apico-basale des CFP et l'ancrage *d'oskar/Staufen*. La surexpression de Dystroglycan, un récepteur de la matrice extra-cellulaire, dans les CFP entraîne le même phénotype d'accumulation de la Laminine A entre ces cellules et l'ovocyte et l'absence d'ancrage *d'oskar/Staufen* dans l'ovocyte (Poulton and Deng, 2006). De même, en absence de Laminine A ou de son récepteur Lar, la localisation du déterminant au pôle postérieur de l'ovocyte est perdue (Deng and Ruohola-Baker, 2000; Frydman and Spradling, 2001). Les rôles de ces trois acteurs ont été analysés de façon globale dans toutes les CFP, il serait donc intéressant de se replonger dans ces études en se concentrant sur leurs rôles au niveau des CAP et leurs effets sur le contact étroit entre les CAP et l'ovocyte.

3.2.1. Lien entre polarité des CAP et les microvillosités apicales riches en Cad99C

Mes résultats préliminaires ont permis d'observer que les CAP semblent exprimer plus fortement la Cad99C que les autres cellules folliculaires entourant l'ovocyte et que des vésicules Cad99C positives s'accumulent en plus grand nombre au niveau de la zone d'ancrage *d'oskar/Staufen* dans l'ovocyte, et ce de façon dépendante de la voie JAK-STAT.

3.2.1.1. La détection inattendue de Cad99C dans les cellules germinales

La détection de protéine Cad99C dans les cellules germinales ne se restreint pas à l'ovocyte au stade 10a mais concerne tous les stades de l'ovogenèse (résultats non montrés). Cette observation est contradictoire avec les résultats d'hybridation *in situ* de l'ARNm de *cad99C* disponibles dans la littérature (D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006). Cependant, l'hybridation *in situ* n'étant pas sensible à des concentrations basses en ARNm, il est possible que la quantité d'ARNm de *cad99C* dans les cellules germinales soit inférieure au seuil de détection par cette technique. Pour confirmer que le signal observé correspond bien à la Cad99C et non pas à une détection aspécifique, il serait important de réaliser cet immunomarquage sur des follicules de femelles mutantes nulles pour *cad99C*, génotype viable jusqu'au stade adulte. Si la présence de la Cad99C dans les cellules germinales est confirmée, il serait intéressant d'étudier son rôle, et notamment si elle est impliquée dans la formation des microvillosités présentes à la surface de l'ovocyte, similairement à son rôle dans les cellules folliculaires.

3.2.1.2. Les rôles potentiels de la Cad99C au niveau des CAP

Ainsi, bien que ces résultats d'accumulation en plus forte quantité de la Cad99C dans les CAP et dans l'ovocyte nécessitent confirmation, ils suggèrent que la Cad99C pourrait être un des acteurs impliqués dans le maintien d'un contact étroit entre les membranes. Ainsi, il serait intéressant de tester en contexte mutant pour *cad99C* si le maintien de ce contact entre les membranes est affecté. Notamment, les microvillosités des CFP et de l'ovocyte s'entrelacent entre elles (Schlichting et al., 2006) et une adhérence par entrelacement entre microvillosités a été décrite récemment dans des cellules en culture (Li et al., 2021). Son action pourrait résider dans la formation et l'organisation des microvillosités dans les CAP, en accord avec ses rôles décrits dans la littérature (D'Alterio et al., 2005; Schlichting et al., 2006) et/ou dans une interaction entre les microvillosités des cellules d'ancrage postérieur et de l'ovocyte, ce qui validerait un modèle précédemment proposé mais qui lui, était ouvert à toutes les cellules folliculaires entourant l'ovocyte (Schlichting et al., 2006).

3.2.1.3. Lien entre la E-Cadhérine et la formation de microvillosités en région apicale des CAP

Pour en revenir à la E-Cadhérine, son rôle dans les CAP pourrait donc résider dans la formation et/ou l'organisation de ces microvillosités. Du fait de sa nécessité pour le maintien de la morphologie des CAP, son action pourrait être indirecte par l'organisation ou le maintien de la région apicale des CAP, assurant une zone adéquate de formation des microvillosités. Une autre hypothèse non exclusive serait une action directe sur la formation des microvillosités en agissant sur la localisation de la Cad99C au domaine apical ou en permettant le recrutement d'autres facteurs

impliqués dans le contrôle de la taille ou de l'orientation de microvillosités, tel que la Myosine VIIA (Glowinski et al., 2014).

3.2.2. Lien entre polarité des CAP et les filopodes en émanant

Mes résultats préliminaires de caractérisation de la zone d'ancrage ont permis de mettre en évidence la présence de filopodes émanant des CAP et pénétrant dans l'ovocyte, selon un modèle de poussée sur la membrane postérieure de l'ovocyte. Ils semblent formés notamment grâce à la protéine Enabled, présente à de forts niveaux dans les CAP et localisée en grande quantité dans leur région apicale en réponse à la voie JAK-STAT. Ces résultats permettent de placer *enabled* parmi les cibles de la voie JAK-STAT et de proposer qu'Enabled, par la formation des filopodes, participe au maintien du contact entre les membranes. Cette conclusion est appuyée par le fait que la surexpression d'*enabled-mcherry* dans les CFP induit les mêmes phénotypes sur la zone d'ancrage d'*oskar/Staufen* qu'une suractivation de la voie JAK-STAT dans ces mêmes cellules. Des filopodes ont déjà été décrits comme permettant une adhérence entre cellules lors du processus de fermeture dorsale chez l'embryon (Liu et al., 2008). Une suite logique à cette étude que je n'ai pas eu le temps de réaliser avant le rendu de ce manuscrit serait d'effectuer des expériences de perte de fonction d'*enabled* pour confirmer son rôle dans la formation des filopodes par les CAP et d'observer les effets sur le contact entre les membranes et sur l'ancrage d'*oskar/Staufen* dans l'ovocyte. Similairement aux hypothèses proposées pour les microvillosités ci-dessus, il serait intéressant d'étudier si la E-Cadhérine est impliquée dans la formation de ces filopodes et si oui quels seraient ses rôles. Notamment, la E-Cadhérine a déjà été démontrée comme nécessaire à l'orientation correcte de structures similaires à des filopodes dans les cellules nourricières, structures dont la formation requiert Enabled (Huelsmann et al., 2013; Logan et al., 2022).

3.2.3. Le cas particulier de la perte de fonction de la E-Cadhérine

Pourquoi les CAP adoptent-elles une morphologie anormale en contexte de perte de fonction de *shotgun*, et ce uniquement après le stade 9 ? En contexte mutant pour l' α -spectrine, une protéine impliquée dans l'architecture cellulaire, il a été observé que les cellules folliculaires mutantes des pôles sont plus enclines à se désorganiser que les cellules mutantes médiales, et ce du fait des forces exercées par la croissance du follicule et la courbure des pôles (Lee et al., 1997; Ng et al., 2016). Ainsi, les CAP déficientes pour la E-Cadhérine pourraient être affectées par une accumulation de forces au pôle postérieur générées par la croissance du follicule à partir du stade 9.

CONCLUSION

Mes travaux n'ont pas permis d'élucider le rôle exact de la E-Cadhérine dans les CAP mais placent cette protéine au cœur de l'organisation et de la fonction des CAP. De plus, le mécanisme précis responsable du maintien du contact entre les membranes de l'ovocyte et apicale des CAP reste encore à déterminer. La poursuite de ces études en se penchant sur le rôle des microvillosités des cellules folliculaires et de l'ovocyte ainsi que sur le lien entre la E-Cadhérine et ces microvillosités et/ou les filopodes pourrait permettre de préciser le processus permettant aux CAP de maintenir ce contact étroit avec l'ovocyte et ainsi de déterminer la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen.

4. Chronologie des évènements menant à l'ancrage initial d'*oskar/Staufen*

D'après les données de la littérature, l'envoi du « signal » retour des cellules folliculaires vers l'ovocyte au stade 6 permet l'accumulation de Par-1 au cortex de l'ovocyte faisant face aux CFP, de façon dépendante de la bi-phosphorylation de la Myosine II, ce qui induit la réorganisation du réseau de microtubules cortical et le transport polarisé d'*oskar/Staufen* au pôle postérieur, suivie de son ancrage. Mes résultats ajoutent une dynamique à ces évènements en démontrant que la différenciation des CAP dans l'épithélium folliculaire est nécessaire au transport d'*oskar/Staufen* dans l'ovocyte et mène à une restriction progressive de leur zone d'accumulation et d'ancrage. Dans cette partie, je vais discuter des mécanismes qui pourraient mener à cette dynamique en replaçant mes résultats avec les connaissances actuelles de la littérature.

4.1. Le lien entre la séparation des membranes et le transport d'*oskar/Staufen*

4.1.1. L'influence de la séparation des membranes sur le réseau de microtubules

Mes résultats indiquent qu'entre le stade où *oskar/Staufen* commence à être détecté au pôle postérieur (début du stade 9) et le stade 10, la taille de sa zone d'accumulation diminue pour se restreindre face aux CAP. Or, il est décrit que l'ancrage de *oskar/Staufen* est possible sur tout le cortex de l'ovocyte car il dépend de l'actine et de la Myosine V, localisés uniformément au cortex de l'ovocyte (Cha et al., 2002; Krauss et al., 2009). Comment expliquer alors sa restriction progressive ? Une piste serait par une modification touchant à son transport, via un changement dans la localisation de Par-1 au cortex de l'ovocyte par exemple.

Le recrutement de Par-1 à la membrane a lieu dès le stade 7, et ce en face de toutes les CFP (Doerflinger et al., 2006, 2022). Très récemment, dans un manuscrit déposé sur BioRxiv, une équipe a également remarqué l'espace étroit entre les membranes au niveau de la zone d'accumulation de *oskar/Staufen* et a montré que Par-1 est exclu du cortex de l'ovocyte si les membranes y sont séparées mécaniquement (Milas et al., 2022).

Mes observations indiquent que l'écartement des membranes hors de la zone d'ancrage a lieu de façon concomitante à la restriction d'*oskar/Staufen* au niveau de la zone où les membranes restent accolées. De plus, en condition sauvage, l'accumulation de Khc-βGal est restreinte face aux CAP au stade 10a. Enfin, mes expériences de perte de fonction de la voie JAK-STAT montrent une accumulation ectopique de Khc-βGal et d'*oskar/Staufen* dans le cytoplasme de l'ovocyte, combinée ou non avec une moindre localisation au pôle postérieur en fonction de la force de phénotype, et suggèrent donc un défaut d'organisation du réseau de microtubules. Ces observations corrélaient parfaitement aux phénotypes décrits en contexte mutant faible ou fort pour *par-1* (Shulman et al., 2000).

Combinés aux résultats de Milas *et al*, mes résultats suggèrent que face aux CFP, l'écartement progressif des membranes de l'ovocyte et des cellules folliculaires induit une exclusion de Par-1. Au contraire, au niveau des CAP, le maintien d'un contact étroit entre les membranes permet le maintien de Par-1 au cortex. Ainsi, la taille du croissant de Par-1 serait progressivement réduite entre les stades 7 et 10 pour n'être maintenu qu'en face des CAP, et ce grâce à la restriction de l'activité de la voie JAK-STAT. Ce changement mènerait ainsi à la limitation de la zone vers laquelle *oskar/Staufen* va être transporté et s'accumuler.

Une principale donnée manquante dans mes travaux pour confirmer ce modèle est l'étude de l'évolution de la taille du croissant de Par-1 en contexte sauvage entre les stade 7 et 10, mais mes données préliminaires semblent confirmer cette hypothèse. Il serait intéressant de poursuivre cette étude du lien entre l'écartement entre les membranes et le réseau de microtubules cortical en contexte de perte et de gain de fonction de la voie JAK-STAT et également de caractériser d'autres marqueurs connus, tels que la Myosine II bi-phosphorylée et Shot/Patronin (Nashchekin et al., 2016; Doerflinger et al., 2022).

4.1.2. Les mécanismes possibles de restriction des croissants de Par-1 et d'*oskar/Staufen*

Mes observations montrent que l'écartement entre les membranes pour la restriction de la zone d'accumulation d'*oskar/Staufen* (fin de stade 9) a lieu après le recrutement de Par-1 au cortex (stade 7) et l'initiation de l'ancrage d'*oskar/Staufen* (début de stade 9), suggérant que Par-1 et *oskar/Staufen* sont décrochés là où les membranes se séparent afin soit d'être relocalisés vers la zone d'ancrage, soit d'être dégradés. Dans les deux cas, leur exclusion du cortex mène à la diminution de la taille de leurs croissants.

Quel mécanisme pourrait être responsable de l'exclusion de Par-1 et *oskar/Staufen* de la membrane ? La Myosine II bi-phosphorylée a été proposée comme jouant le rôle de senseur de tension corticale qui permettrait le recrutement de Par-1. Cette tension corticale est pensée, bien que non démontrée, comme étant générée par l'interaction entre les microvillosités de l'ovocyte et des CFP (Doerflinger et al., 2022). Ainsi, l'écartement entre les membranes pourrait abolir cette tension entre les membranes et entraîner la perte de l'exposition des sites de liaison de Par-1 à la membrane. Au contraire, au niveau des CAP, le contact entre les membranes et la tension corticale seraient maintenus, et donc Par-1 également. Enfin, il a été montré que Oskar et Par-1 interagissent physiquement (Morais-de-Sá et al., 2013) et qu'une boucle d'amplification réside entre eux pour le recrutement de plus de Par-1 et d'Oskar au pôle postérieur (Zimyanin et al., 2007). Ainsi, si Oskar et Par-1 forment un complexe, l'exclusion de l'un (Par-1) pourrait mener à l'exclusion de l'autre (Oskar).

4.2. Le lien entre les CAP et l'ancrage d'*oskar*/Staufen

Les filopodes émanant des CAP ont la particularité d'envahir le croissant d'ancrage d'*oskar*/Staufen et semblent étroitement associés à ce dernier, ce qui pourrait suggérer leur implication dans le maintien du déterminant au pôle postérieur. Cette hypothèse serait cohérente avec plusieurs observations et données de la littérature :

(1) En introduction, j'ai mentionné les études montrant que l'ancrage d'*oskar*/Staufen dans l'ovocyte est restreint face aux CFP sauvages en contexte de pôle postérieur mosaïque présentant à la fois des cellules sauvages et des cellules mutantes pour la voie JAK-STAT ou pour des acteurs impliqués dans leur polarité (Frydman and Spradling, 2001; Xi et al., 2003; Poulton and Deng, 2006; Sun et al., 2011). Ces phénotypes mutants avaient soulevé l'hypothèse que les CFP stimuleraient l'accumulation et l'ancrage d'*oskar*/Staufen juste en face d'elle dans l'ovocyte par la formation d'une structure particulière (Xi et al., 2003).

(2) Le croissant d'ancrage d'*oskar*/Staufen n'est pas uniquement en contact avec la membrane de l'ovocyte, il présente une épaisseur selon l'axe antéro-postérieur. *oskar*/Staufen est stablement maintenu dans cette configuration par ancrage sur des structures riches en actine, proposées comme émanant du réseau cortical de l'ovocyte (Vanzo et al., 2007; Tanaka and Nakamura, 2011). Or ces protrusions ressemblent aux filopodes que j'ai observé, suggérant soit qu'il s'agisse des mêmes structures soit que ces deux types de structures co-existent au niveau de la zone d'ancrage, caractérisation que je suis en train de réaliser.

En plus du rôle proposé plus haut dans le maintien du contact entre les membranes des CAP et de l'ovocyte (voir 3.2.2), une hypothèse attrayante serait que les filopodes, sans être nécessaires à l'ancrage d'*oskar*/Staufen, puisque l'ancrage est possible sur tout le cortex de l'ovocyte (voir Introduction-Partie 2, 5.4.1), permettraient d'augmenter la surface de membrane disponible, générant une structure capable d'ancrer Par-1 et *oskar*/Staufen lors du processus d'amplification. Il serait intéressant de poursuivre l'étude fonctionnelle de ces filopodes en tentant d'empêcher leur formation et d'observer l'effet sur le croissant d'ancrage d'*oskar*/Staufen.

L'ensemble de ces résultats suggère que les CAP, par leur rôle sur la restriction de la zone d'ancrage et par la formation de filopodes, permettraient de concentrer *oskar*/Staufen dans une zone restreinte, tout en assurant la formation d'une structure fournissant une surface d'ancrage suffisante pour la constitution d'un plasmé germinatif correct (Ephrussi and Lehmann, 1992).

5. Ouverture sur le maintien de l'ancrage d'Oskar après le stade 10b

Au stade 10, le réseau de microtubule cortical est modifié (Theurkauf et al., 1992; Monteith et al., 2016; Quinlan, 2016), changeant le mécanisme de transport d'*oskar*/Staufen (Sinsimer et al., 2011). S'il était confirmé, mon modèle impliquant les filopodes pour l'ancrage d'*oskar*/Staufen s'appliquerait pour l'initiation de l'ancrage

d'*oskar*/Staufen, mais par pour son maintien au pôle postérieur après le stade 10. En effet, mon étude de la chronologie de l'espacement entre les membranes au niveau de la zone d'ancrage montre qu'il devient aussi large qu'en dehors de la zone à la fin du stade 10b, suggérant que l'interaction de l'ovocyte avec les CAP est perdue. Il semble alors peu probable que les filopodes soient maintenus et/ou capables d'atteindre l'ovocyte. En absence de filopodes, un autre mécanisme pourrait alors prendre le relai pour assurer la maintenance du plasmogerminal en formation. Plusieurs scénarios sont envisageables sur le maintien ou non des invaginations de la membrane de l'ovocyte après le départ des filopodes. Il est par exemple possible que par la croissance de l'ovocyte, les invaginations subissent un mouvement de type accordéon, menant *in fine* à une surface lisse au pôle postérieur de l'ovocyte où Oskar serait ancré. Ce modèle est compatible avec mes observations que le diamètre de la zone d'ancrage d'*oskar*/Staufen s'élargit entre le stade 10b et le stade 14 (résultats non montrés). L'ancrage à distance de la membrane (épaisseur du croissant selon l'axe antéro-postérieur) pourrait également être maintenu via l'actine-F qui entourait les invaginations, sur laquelle Oskar continuerait d'être ancré et de s'accumuler. Oskar pourrait être directement impliqué dans ce maintien des filaments d'actine, ce qui réconcilierait mon modèle avec les expériences ayant démontré qu'Oskar est requis pour le maintien de projections d'actine corticale dans l'ovocyte (Vanzo et al., 2007).

6. Ouverture à l'ancrage de l'ARNm *bicoid* au pôle antérieur de l'ovocyte

Dans mon introduction, j'ai brièvement présenté les connaissances actuelles sur l'ancrage de l'ARNm *bicoid* au pôle antérieur de l'ovocyte, qui se déroule en deux phases. La première phase reste la moins bien caractérisée puisque les intermédiaires impliqués dans l'accumulation de l'ARNm *bicoid* n'ont pas été identifiés (Trovisco et al., 2016). Il est intéressant de noter que ce premier ancrage a lieu dans une zone de l'ovocyte en contact avec l'épithélium folliculaire puisqu'il forme un anneau à la jonction antéro-latérale entre l'ovocyte et les cellules folliculaires.

Au cours de mes travaux, j'ai pu remarquer que plusieurs éléments caractéristiques de la zone d'ancrage postérieure étaient également présents au niveau de la zone d'ancrage de l'ARNm *bicoid*. En effet, les cellules folliculaires à la jonction antéro-latérale, futures cellules centripètes (Figure 1), semblent actives pour la voie JAK-STAT et accumulent fortement la E-Cadhérine, Cad99C et Enabled (bien qu'à des niveaux plus bas que dans les CAP pour ce dernier). De plus, l'espace entre leurs membranes apicales et celle de l'ovocyte semble étroit.

Ces observations n'ont pas fait l'objet d'une étude rigoureuse de ma part, mais pourraient suggérer que l'accumulation de l'ARNm *bicoid* partage un mécanisme commun avec celle d'*oskar*/Staufen et dépende également d'une interaction entre les cellules folliculaires et l'ovocyte. Un premier point à étudier serait la chronologie de l'accumulation de ces trois protéines, la E-Cadhérine, Cad99C et Enabled, dans les cellules folliculaires à la jonction antéro-latérale et de tenter d'identifier la ou les voies

de signalisation impliquées dans leur régulation. De même, il serait intéressant de tester si l'accumulation et/ou l'ancrage de l'ARNm *bicoid* dépend de ces acteurs. Cette étude pourrait aussi permettre d'observer si des structures similaires aux filopodes des CAP sont présentes au niveau de cette zone d'ancrage de l'ARNm *bicoid*. De même que pour *oskar/Staufen* à la zone d'ancrage postérieure, la formation d'une structure d'ancrage par les cellules folliculaires à la jonction antéro-latérale pourrait ne pas être nécessaire à l'ancrage de l'ARNm *bicoid* mais requise pour son accumulation et sa stabilité avant sa seconde phase de transport et d'ancrage.

CONCLUSION

L'ensemble de mes résultats met en avant une dynamique d'interaction entre l'ovocyte et les CFP qui n'avait encore jamais été décrite et qui, combiné aux données de la littérature, permet de proposer un modèle des événements se déroulant entre la différenciation des CFP et l'ancrage d'*oskar/Staufen*.

En réponse à la différenciation des CFP au stade 6, la Myosine II est bi-phosphorylée, possiblement suite à un changement de tension corticale, et permet le recrutement de Par-1 au cortex de l'ovocyte face à toutes les CFP (Doerflinger et al., 2022; Riparbelli et al., 2022). Du côté des CFP à lieu une diminution des niveaux d'E-Cadhérine.

Entre les stades 7 et 9, le gradient d'activité de la voie JAK-STAT est restreint en réponse à la diminution de la E-Cadhérine, pour atteindre seulement un rayon de deux cellules folliculaires autour des cellules polaires. La voie JAK-STAT induit alors la différenciation des CAP, seules CFP à maintenir un contact étroit avec la membrane de l'ovocyte. Plusieurs cibles de la voie JAK-STAT semblent impliquées dans le maintien de ce contact par un mécanisme encore inconnu : la E-Cadhérine, Enabled* et Cad99C*.

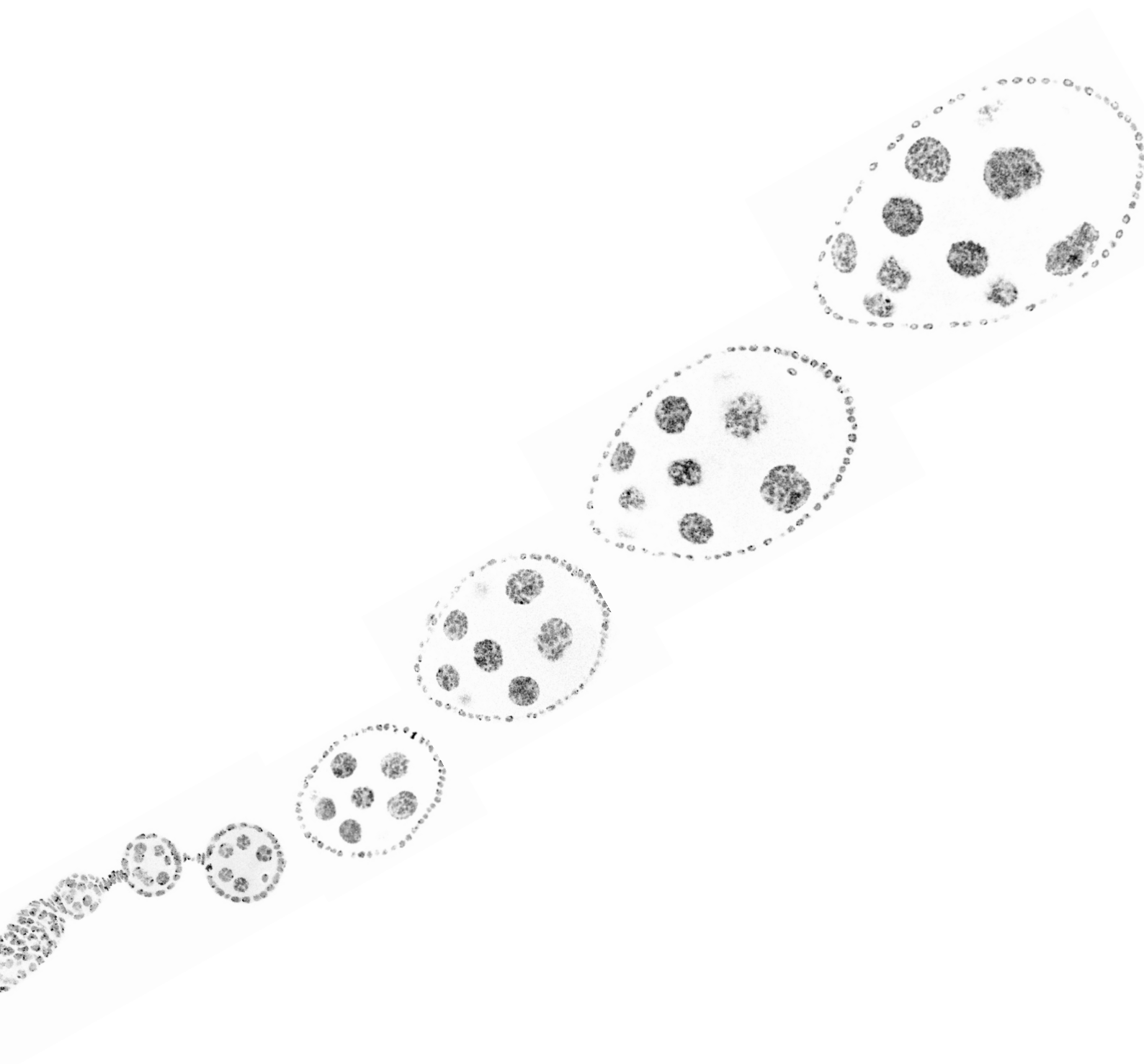
Entre les stades 9 et 10, Par-1 est maintenu par ce contact en face des CAP (appuyé par les résultats de (Milas et al., 2022)).

En revanche, hors de la zone d'ancrage, les membranes de l'ovocyte et des CFP s'écartent, entraînant l'exclusion de Par-1* et d'*oskar/Staufen* de la membrane. Cette dynamique entraîne à la fois la restriction de la zone vers laquelle va être transporté *oskar/Staufen* et permettre son accumulation en face des CAP, ce qui est crucial pour le développement du futur embryon.

Au niveau des CAP, les filopodes émanant de ces cellules pénètrent dans l'ovocyte et pourraient être impliqués dans la formation d'une structure membranaire de surface suffisante pour permettre l'ancrage d'*oskar/Staufen**.

*Résultats préliminaires

BIBLIOGRAPHIE



Noyau (DAPI) des cellules de l'épithélium folliculaire et des cellules germinales.

- Agrogiannis, G. D., Sifakis, S., Patsouris, E. S., and Konstantinidou, A. E. (2014). Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Molecular Medicine Reports* 10, 579–584. doi: 10.3892/mmr.2014.2258.
- Alégot, H., Pouchin, P., Bardot, O., and Mirouse, V. (2018). Jak-Stat pathway induces *Drosophila* follicle elongation by a gradient of apical contractility. *Elife* 7. doi: 10.7554/eLife.32943.
- Assa-Kunik, E., Torres, I. L., Schejter, E. D., Johnston, D. S., and Shilo, B.-Z. (2007). *Drosophila* follicle cells are patterned by multiple levels of Notch signaling and antagonism between the Notch and JAK/STAT pathways. *Development* 134, 1161–1169. doi: 10.1242/dev.02800.
- Auersperg, N., Wong, A. S. T., Choi, K.-C., Kang, S. K., and Leung, P. C. K. (2001). Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. 22, 34.
- Babu, K., Cai, Y., Bahri, S., Yang, X., and Chia, W. (2004). Roles of Bifocal, Homer, and F-actin in anchoring Oskar to the posterior cortex of *Drosophila* oocytes. *Genes Dev* 18, 138–143. doi: 10.1101/gad.282604.
- Bach, E. A., Vincent, S., Zeidler, M. P., and Perrimon, N. (2003). A Sensitized Genetic Screen to Identify Novel Regulators and Components of the *Drosophila* Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway. *Genetics* 165, 1149–1166. doi: 10.1093/genetics/165.3.1149.
- Baeg, G.-H., Zhou, R., and Perrimon, N. (2005). Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev.* 19, 1861–1870. doi: 10.1101/gad.1320705.
- Baehrecke, E. H. (2002). How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 779–787. doi: 10.1038/nrm931.
- Baker, J., Liu, J.-P., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73–82. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80085-6.
- Baksa, K., Parke, T., Dobens, L. L., and Dearolf, C. R. (2002). The *Drosophila* STAT Protein, Stat92E, Regulates Follicle Cell Differentiation during Oogenesis. *Developmental Biology* 243, 166–175. doi: 10.1006/dbio.2001.0539.
- Bausek, N. (2013). JAK-STAT signaling in stem cells and their niches in *Drosophila*. *JAKSTAT* 2. doi: 10.4161/jkst.25686.
- Becalska, A. N., and Gavis, E. R. (2009). Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* 136, 2493–2503. doi: 10.1242/dev.032391.
- Beccari, S., Teixeira, L., and Rørth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mechanisms of Development* 111, 115–123. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00615-3.
- Beebe, K., Lee, W.-C., and Micchelli, C. A. (2010). JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Developmental Biology* 338, 28–37. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.045.
- Benton, R., and Johnston, D. S. (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 Inhibit Bazooka/PAR-3 to Establish Complementary Cortical Domains in Polarized Cells.

Cell 115, 691–704. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00938-3.

Benton, R., Palacios, I. M., and Johnston, D. S. (2002). *Drosophila* 14-3-3/PAR-5 Is an Essential Mediator of PAR-1 Function in Axis Formation. *Developmental Cell* 3, 659–671. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00320-9.

Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., et al. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 7, 1749–1756. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03004.x.

Bernard, F., Jouette, J., Durieu, C., Le Borgne, R., Guichet, A., and Claret, S. (2021). GFP-Tagged Protein Detection by Electron Microscopy Using a GBP-APEX Tool in *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol* 9, 719582. doi: 10.3389/fcell.2021.719582.

Bernard, F., Lepesant, J.-A., and Guichet, A. (2018). Nucleus positioning within *Drosophila* egg chamber. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 82, 25–33. doi: 10.1016/j.semcd.2017.10.013.

Bertet, C., Rauzi, M., and Lecuit, T. (2009). Repression of Wasp by JAK/STAT signalling inhibits medial actomyosin network assembly and apical cell constriction in intercalating epithelial cells. *Development* 136, 4199–4212. doi: 10.1242/dev.040402.

Besse, F., and Pret, A.-M. (2003). Apoptosis-mediated cell death within the ovarian polar cell lineage of *Drosophila melanogaster*. *Development* 130, 1017–1027. doi: 10.1242/dev.00313.

Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., and Darnell, J. E. (2001). A *Drosophila* PIA5 homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9563–9568. doi: 10.1073/pnas.171302098.

Bina, S., Wright, V. M., Fisher, K. H., Milo, M., and Zeidler, M. P. (2010). Transcriptional targets of *Drosophila* JAK/STAT pathway signalling as effectors of haematopoietic tumour formation. *EMBO Rep* 11, 201–207. doi: 10.1038/embor.2010.1.

Binari, R., and Perrimon, N. (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, 300–312. doi: 10.1101/gad.8.3.300.

Bolívar, J., Huynh, J. R., López-Schier, H., González, C., St Johnston, D., and González-Reyes, A. (2001). Centrosome migration into the *Drosophila* oocyte is independent of BicD and egl, and of the organisation of the microtubule cytoskeleton. *Development* 128, 1889–1897. doi: 10.1242/dev.128.10.1889.

Borensztejn, A., Boissoneau, E., Fernandez, G., Agnès, F., and Pret, A.-M. (2013). JAK/STAT autocontrol of ligand-producing cell number through apoptosis. *Development* 140, 195–204. doi: 10.1242/dev.079046.

Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B., and Saxton, W. M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science* 289, 2120–2122. doi: 10.1126/science.289.5487.2120.

Brigaud, I., Duteyrat, J.-L., Chlasta, J., Le Bail, S., Couderc, J.-L., and Grammont, M. (2015). Transforming Growth Factor β /activin signalling induces epithelial cell flattening during *Drosophila* oogenesis. *Biology Open* 4, 345–354. doi:

10.1242/bio.201410785.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J. Clin. Invest.* 109, 1139–1142. doi: 10.1172/JCI0215617.

Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., et al. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell* 98, 295–303. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81959-5.

Brown, S., Hu, N., and Hombría, J. C.-G. (2003). Novel level of signalling control in the JAK/STAT pathway revealed by in situ visualisation of protein-protein interaction during *Drosophila* development. *Development* 130, 3077–3084. doi: 10.1242/dev.00535.

Brown, S., Hu, N., and Hombría, J. C.-G. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Current Biology* 11, 1700–1705. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00524-3.

Buk, D. M., Waibel, M., Braig, C., Martens, A. S., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (2004). Polarity and lipid raft association of the components of the ciliary neurotrophic factor receptor complex in Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Cell Science* 117, 2063–2075. doi: 10.1242/jcs.01049.

Burke, W. M., Jin, X., Lin, H.-J., Huang, M., Liu, R., Reynolds, R. K., et al. (2001). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 20, 7925–7934. doi: 10.1038/sj.onc.1204990.

Cáceres, L., and Nilson, L. A. (2005). Production of *gurken* in the nurse cells is sufficient for axis determination in the *Drosophila* oocyte. *Development* 132, 2345–2353. doi: 10.1242/dev.01820.

Cai, D., Chen, S.-C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choesmel-Cadamuro, V., et al. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* 157, 1146–1159. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.045.

Callus, B., and Mathey-Prevot, B. (2002). SOCS36E, a novel *Drosophila* SOCS protein, suppresses JAK/STAT and EGF-R signalling in the imaginal wing disc. *Oncogene* 21, 4812–21. doi: 10.1038/sj.onc.1205618.

Cavaliere, V., Bernardi, F., Romani, P., Duchi, S., and Gargiulo, G. (2008). Building up the *Drosophila* eggshell: First of all the eggshell genes must be transcribed. *Developmental Dynamics* 237, 2061–2072. doi: 10.1002/dvdy.21625.

Ceresa, B. P., and Schmid, S. L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 204–210. doi: 10.1016/S0955-0674(99)00077-0.

Cerqueira Campos, F., Dennis, C., Alégot, H., Fritsch, C., Isabella, A., Pouchin, P., et al. (2020). Oriented basement membrane fibrils provide a memory for F-actin planar polarization via the Dystrophin-Dystroglycan complex during tissue elongation. *Development* 147, dev186957. doi: 10.1242/dev.186957.

Cetera, M., Ramirez-San Juan, G. R., Oakes, P. W., Lewellyn, L., Fairchild, M. J., Tanentzapf, G., et al. (2014). Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation. *Nat Commun* 5, 5511. doi: 10.1038/ncomms6511.

- Cha, B.-J., Koppetsch, B. S., and Theurkauf, W. E. (2001). In Vivo Analysis of *Drosophila bicoid* mRNA Localization Reveals a Novel Microtubule-Dependent Axis Specification Pathway. *Cell* 106, 35–46. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00419-6.
- Cha, B.-J., Serbus, L. R., Koppetsch, B. S., and Theurkauf, W. E. (2002). Kinesin I-dependent cortical exclusion restricts pole plasm to the oocyte posterior. *Nat Cell Biol* 4, 592–598. doi: 10.1038/ncb832.
- Chanet, S., and Huynh, J.-R. (2020). Collective Cell Sorting Requires Contractile Cortical Waves in Germline Cells. *Curr Biol* 30, 4213-4226.e4. doi: 10.1016/j.cub.2020.08.045.
- Chang, J. S., Tan, L., and Schedl, P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol* 215, 91–106. doi: 10.1006/dbio.1999.9444.
- Chang, J. S., Tan, L., Wolf, M. R., and Schedl, P. (2001). Functioning of the *Drosophila orb* gene in gurken mRNA localization and translation. *Development* 128, 3169–3177. doi: 10.1242/dev.128.16.3169.
- Chen, D., and McKearin, D. (2003). Dpp Signaling Silences bam Transcription Directly to Establish Asymmetric Divisions of Germline Stem Cells. *Current Biology* 13, 1786–1791. doi: 10.1016/j.cub.2003.09.033.
- Chen, D.-Y., Lipari, K. R., Dehghan, Y., Streichan, S. J., and Bilder, D. (2016). Symmetry Breaking in an Edgeless Epithelium by Fat2-Regulated Microtubule Polarity. *Cell Reports* 15, 1125–1133. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.014.
- Chen, H.-W. (2002). mom identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes & Development* 16, 388–398. doi: 10.1101/gad.955202.
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W.-C. S., You, Z.-H., Iwamoto, Y., and Fu, X.-Y. (1996). Cell Growth Arrest and Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1 Mediated by STAT1. *Science* 272, 719–722. doi: 10.1126/science.272.5262.719.
- Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 281–282. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01237-7.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., et al. (1997). Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803–1805. doi: 10.1126/science.278.5344.1803.
- Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Current Biology* 4, 289–300. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00068-3.
- Corwin, H. O., and Hanratty, W. P. (1976). Characterization of a unique lethal tumorous mutation in *Drosophila*. *Molec. gen. Genet.* 144, 345–347. doi: 10.1007/BF00341734.

- Cox, D. N., Lu, B., Sun, T.-Q., Williams, L. T., and Jan, Y. N. (2001a). *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Current Biology* 11, 75–87. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00027-6.
- Cox, D. N., Seyfried, S. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001b). Bazooka and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the *Drosophila* ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14475–14480. doi: 10.1073/pnas.261565198.
- Cox, R. T., and Spradling, A. C. (2003). A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. *Development* 130, 1579–1590. doi: 10.1242/dev.00365.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D.-Y., Fletcher, D. A., and Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *eLife* 6, e24958. doi: 10.7554/eLife.24958.
- D’Alterio, C., Tran, D. D. D., Yeung, M. W. Y. A., Hwang, M. S. H., Li, M. A., Arana, C. J., et al. (2005). *Drosophila melanogaster* Cad99C, the orthologue of human Usher cadherin PCDH15, regulates the length of microvilli. *Journal of Cell Biology* 171, 549–558. doi: 10.1083/jcb.200507072.
- Darnell, J. E., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421. doi: 10.1126/science.8197455.
- de Cuevas, M., and Spradling, A. C. (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* 125, 2781–2789. doi: 10.1242/dev.125.15.2781.
- Dej, K. J., and Spradling, A. C. (1999). The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. *Development* 126, 293–303. doi: 10.1242/dev.126.2.293.
- Deng, W.-M., Althausen, C., and Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. *Development* 128, 4737–4746. doi: 10.1242/dev.128.23.4737.
- Deng, W.-M., and Ruohola-Baker, H. (2000). Laminin A is required for follicle cell–oocyte signaling that leads to establishment of the anterior–posterior axis in *Drosophila*. *Current Biology* 10, 683–686. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00514-5.
- Deng, W.-M., Schneider, M., Frock, R., Castillejo-Lopez, C., Gaman, E. A., Baumgartner, S., et al. (2003). Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Development* 130, 173–184. doi: 10.1242/dev.00199.
- Devergne, O., Ghiglione, C., and Noselli, S. (2007). The endocytic control of JAK/STAT signalling in *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* 120, 3457–3464. doi: 10.1242/jcs.005926.
- Dobens, L. L., Peterson, J. S., Treisman, J., and Raftery, L. A. (2000). *Drosophila* bunched integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary. *Development* 127, 745–754. doi: 10.1242/dev.127.4.745.
- Doerflinger, H., Benton, R., Torres, I. L., Zwart, M. F., and St Johnston, D. (2006). *Drosophila* Anterior-Posterior Polarity Requires Actin-Dependent PAR-1 Recruitment

to the Oocyte Posterior. *Current Biology* 16, 1090–1095. doi: 10.1016/j.cub.2006.04.001.

Doerflinger, H., Vogt, N., Torres, I. L., Mirouse, V., Koch, I., Nüsslein-Volhard, C., et al. (2010). Bazooka is required for polarisation of the *Drosophila* anterior-posterior axis. *Development* 137, 1765–1773. doi: 10.1242/dev.045807.

Doerflinger, H., Zimyanin, V., and St Johnston, D. (2022). The *Drosophila* anterior-posterior axis is polarized by asymmetric myosin activation. *Curr Biol* 32, 374-385.e4. doi: 10.1016/j.cub.2021.11.024.

Duhart, J. C., Parsons, T. T., and Rafferty, L. A. (2017). The repertoire of epithelial morphogenesis on display: Progressive elaboration of *Drosophila* egg structure. *Mechanisms of Development* 148, 18–39. doi: 10.1016/j.mod.2017.04.002.

Dumstrei, K., Wang, F., Shy, D., Tepass, U., and Hartenstein, V. (2002). Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis. *Development* 129, 3983–3994. doi: 10.1242/dev.129.17.3983.

Duncan, J. E., and Warrior, R. (2002). The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* 12, 1982–1991. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01303-9.

Ehret, G. B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C. M., Fritz, S., Nabholz, M., et al. (2001). DNA Binding Specificity of Different STAT Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6675–6688. doi: 10.1074/jbc.M001748200.

Eliazer, S., and Buszczak, M. (2011). Finding a niche: studies from the *Drosophila* ovary. *Stem Cell Res Ther* 2, 45. doi: 10.1186/scrt86.

Ephrussi, A., Dickinson, L. K., and Lehmann, R. (1991). oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37–50. doi: 10.1016/0092-8674(91)90137-N.

Ephrussi, A., and Johnston, D. S. (2004). Seeing Is Believing: The Bicoid Morphogen Gradient Matures. *Cell* 116, 143–152. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00037-6.

Ephrussi, A., and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358, 387–392. doi: 10.1038/358387a0.

Fasouli, E. S., and Katsantoni, E. (2021). JAK-STAT in Early Hematopoiesis and Leukemia. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 669363. doi: 10.3389/fcell.2021.669363.

Ferrao, R., and Lupardus, P. J. (2017). The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK–Receptor Interactions. *Front. Endocrinol.* 8. doi: 10.3389/fendo.2017.00071.

Firmbach-Kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R., and Krolewski, J. J. (1990). tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. 5, 1329–1336.

Fisher, K. H., Stec, W., Brown, S., and Zeidler, M. P. (2016). Mechanisms of JAK/STAT pathway negative regulation by the short coreceptor Eye Transformer/Latran. *MBoC* 27, 434–441. doi: 10.1091/mbc.e15-07-0546.

Forbes, A. J., Lin, H., Ingham, P. W., and Spradling, A. C. (1996). hedgehog is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg

- chamber formation in *Drosophila*. *Development* 122, 1125–1135. doi: 10.1242/dev.122.4.1125.
- Forrest, K. M., Clark, I. E., Jain, R. A., and Gavis, E. R. (2004). Temporal complexity within a translational control element in the nanos mRNA. *Development* 131, 5849–5857. doi: 10.1242/dev.01460.
- Forrest, K. M., and Gavis, E. R. (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* 13, 1159–1168. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00451-2.
- Fregoso Lomas, M., De Vito, S., Boisclair Lachance, J.-F., Houde, J., and Nilson, L. A. (2016). Determination of EGFR Signaling Output by Opposing Gradients of BMP and JAK/STAT Activity. *Current Biology* 26, 2572–2582. doi: 10.1016/j.cub.2016.07.073.
- Friedman, R. L., Manly, S. P., McMahon, M., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1984). Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* 38, 745–755. doi: 10.1016/0092-8674(84)90270-8.
- Frydman, H. M., and Spradling, A. C. (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase Lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination with *Drosophila* ovarian follicles. *Development* 128, 3209–3220. doi: 10.1242/dev.128.16.3209.
- Fu, X.-Y. (1992). A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon α -induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* 70, 323–335. doi: 10.1016/0092-8674(92)90106-M.
- Fu, X.-Y., Kessler, D. S., VEALSt, S. A., LEVYt, D. E., and Darnell, J. E. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon α , consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5. doi: 10.1073/pnas.87.21.8555.
- Gao, B., Shen, X., Kunos, G., Meng, Q., Goldberg, I. D., Rosen, E. M., et al. (2001). Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Letters* 488, 179–184. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02430-3.
- Gavis, E. R., and Lehmann, R. (1992). Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71, 301–313. doi: 10.1016/0092-8674(92)90358-j.
- Geisbrecht, E. R., and Montell, D. J. (2002). Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat Cell Biol* 4, 616–620. doi: 10.1038/ncb830.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., and Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC Regulate Arp2/3-Mediated Endocytosis to Control Local Adherens Junction Stability. *Current Biology* 18, 1631–1638. doi: 10.1016/j.cub.2008.09.029.
- Gergen, J. P., and Wieschaus, E. F. (1986). Localized requirements for gene activity in segmentation of *Drosophila* embryos: analysis of armadillo, fused, giant and unpaired mutations in mosaic embryos. *Roux's Arch Dev Biol* 195, 49–62. doi: 10.1007/BF00444041.
- Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballès, F., Médioni, C., Cerezo, D., et al. (2002). The *Drosophila* cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. *Development* 129, 5437–5447. doi: 10.1242/dev.00116.

- Glowinski, C., Liu, R.-H. S., Chen, X., Darabie, A., and Godt, D. (2014). Myosin VIIA regulates microvillus morphogenesis and interacts with cadherin Cad99C in *Drosophila* oogenesis. *Journal of Cell Science*, jcs.099242. doi: 10.1242/jcs.099242.
- Godt, D., and Tepass, U. (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* 395, 387–391. doi: 10.1038/26493.
- Goldstein, B., and Macara, I. G. (2007). The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Dev Cell* 13, 609–622. doi: 10.1016/j.devcel.2007.10.007.
- Gonzalez-Reyes, A., Elliott, H., and Johnston, D. S. (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* 375, 654–658. doi: 10.1038/375654a0.
- Gonzalez-Reyes, A., and St Johnston, D. (1998a). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development* 125, 2837–2846. doi: 10.1242/dev.125.15.2837.
- Gonzalez-Reyes, A., and St Johnston, D. (1998b). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* 125, 3635–3644. doi: 10.1242/dev.125.18.3635.
- Goodson, H. V., and Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a022608. doi: 10.1101/cshperspect.a022608.
- Grammont, M. (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Journal of Cell Biology* 177, 139–150. doi: 10.1083/jcb.200609079.
- Grammont, M., and Irvine, K. D. (2001). *fringe* and *Notch* specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development* 128, 2243–2253. doi: 10.1242/dev.128.12.2243.
- Grieder, N. C., de Cuevas, M., and Spradling, A. C. (2000). The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development* 127, 4253–4264. doi: 10.1242/dev.127.19.4253.
- Guichet, A., Peri, F., and Roth, S. (2001). Stable Anterior Anchoring of the Oocyte Nucleus Is Required to Establish Dorsoventral Polarity of the *Drosophila* Egg. *Developmental Biology* 237, 93–106. doi: 10.1006/dbio.2001.0354.
- Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611–620. doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9.
- Gutzeit, H. O. (1986). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *Journal of Cell Science* 80, 159–169. doi: 10.1242/jcs.80.1.159.
- Gutzeit, H. O., Eberhardt, W., and Gratwohl, E. (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *Journal of Cell Science* 100, 781–788. doi: 10.1242/jcs.100.4.781.
- Haigo, S. L., and Bilder, D. (2011). Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science* 331, 1071–1074. doi: 10.1126/science.1199424.

- Halbleib, J. M., and Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20, 3199–3214. doi: 10.1101/gad.1486806.
- Hanratty, W. P., and Dearolf, C. R. (1993). The *Drosophila* Tumorous lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Molec. Gen. Genet.* 238–238, 33–37. doi: 10.1007/BF00279527.
- Hanratty, W. P., and Ryerse, J. S. (1981). A genetic melanotic neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 83, 238–249. doi: 10.1016/0012-1606(81)90470-X.
- Harris, T. J. C., and Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* 170, 813–823. doi: 10.1083/jcb.200505127.
- Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M., and Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* 14, 2857–2865. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07285.x.
- Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M., and Perrimon, N. (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes & Development* 12, 3252–3263. doi: 10.1101/gad.12.20.3252.
- Hayashi, Y., Kobayashi, S., and Nakato, H. (2009). *Drosophila* glypicans regulate the germline stem cell niche. *Journal of Cell Biology* 187, 473–480. doi: 10.1083/jcb.200904118.
- Hayashi, Y., Sexton, T. R., Dejima, K., Perry, D. W., Takemura, M., Kobayashi, S., et al. (2012). Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. *Development* 139, 4162–4171. doi: 10.1242/dev.078055.
- Hayashi, Y., Yoshinari, Y., Kobayashi, S., and Niwa, R. (2020). The regulation of *Drosophila* ovarian stem cell niches by signaling crosstalk. *Current Opinion in Insect Science* 37, 23–29. doi: 10.1016/j.cois.2019.10.006.
- He, L., Wang, X., Tang, H. L., and Montell, D. J. (2010). Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat. Cell Biol.* 12, 1133–1142. doi: 10.1038/ncb2124.
- Hombría, J. C.-G., and Brown, S. (2002). The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr. Biol.* 12, R569-575.
- Hombría, J. C.-G., Brown, S., Häder, S., and Zeidler, M. P. (2005). Characterisation of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Dev. Biol.* 288, 420–433. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.040.
- Horne-Badovinac, S. (2020). The *Drosophila* micropyle as a system to study how epithelia build complex extracellular structures. *Phil. Trans. R. Soc. B* 375, 20190561. doi: 10.1098/rstb.2019.0561.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W. J., Ho, T. C., Bresseur, M., and McKnight, S. L. (1994). An Interleukin-4-Induced Transcription Factor: IL-4 Stat. *Science, New Series* 265, 1701–1706. doi: 10.1126/science.8085155.

- Hou, X. S., Melnick, M. B., and Perrimon, N. (1996). *marelle* Acts Downstream of the Drosophila HOP/JAK Kinase and Encodes a Protein Similar to the Mammalian STATs. *Cell* 84, 411–419. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81286-6.
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., and Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Sig Transduct Target Ther* 6, 402. doi: 10.1038/s41392-021-00791-1.
- Huelsmann, S., Ylänne, J., and Brown, N. H. (2013). Filopodia-like Actin Cables Position Nuclei in Association with Perinuclear Actin in Drosophila Nurse Cells. *Developmental Cell* 26, 604–615. doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.014.
- Hurd, T. R., Herrmann, B., Sauerwald, J., Sanny, J., Grosch, M., and Lehmann, R. (2016). Long Oskar Controls Mitochondrial Inheritance in Drosophila melanogaster. *Developmental Cell* 39, 560–571. doi: 10.1016/j.devcel.2016.11.004.
- Huynh, J. R., Petronczki, M., Knoblich, J. A., and St Johnston, D. (2001a). Bazooka and PAR-6 are required with PAR-1 for the maintenance of oocyte fate in Drosophila. *Curr Biol* 11, 901–906. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00244-5.
- Huynh, J. R., Shulman, J. M., Benton, R., and St Johnston, D. (2001b). PAR-1 is required for the maintenance of oocyte fate in Drosophila. *Development* 128, 1201–1209. doi: 10.1242/dev.128.7.1201.
- Huynh, J., and St Johnston, D. (2000). The role of BicD, egl, orb and the microtubules in the restriction of meiosis to the Drosophila oocyte. *Development* 127, 2785–2794. doi: 10.1242/dev.127.13.2785.
- Huynh, J.-R. (2006). “Fusome as a Cell-Cell Communication Channel of Drosophila Ovarian Cyst,” in *Cell-Cell Channels* (New York, NY: Springer New York), 217–235. doi: 10.1007/978-0-387-46957-7_16.
- Huynh, J.-R., and St Johnston, D. (2004). The Origin of Asymmetry: Early Polarisation of the Drosophila Germline Cyst and Oocyte. *Current Biology* 14, R438–R449. doi: 10.1016/j.cub.2004.05.040.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B* 147, 258–267. doi: 10.1098/rspb.1957.0048.
- 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. *Developmental Cell* 38, 47–60. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.009.
- Jankovics, F., Sinka, R., Lukácsovich, T., and Erdélyi, M. (2002). MOESIN Crosslinks Actin and Cell Membrane in Drosophila Oocytes and Is Required for OSKAR Anchoring. *Current Biology* 12, 2060–2065. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01256-3.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J. A., Lopez-Schier, H., Johnston, D. St., et al. (2002). Polar Transport in the Drosophila Oocyte Requires Dynein and Kinesin I Cooperation. *Current Biology* 12, 1971–1981. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01302-7.
- Januschke, J., Gervais, L., Gillet, L., Keryer, G., Bornens, M., and Guichet, A. (2006). The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the Drosophila oocyte. *Development* 133, 129–139. doi: 10.1242/dev.02179.

- Johansen, K. A., Iwaki, D. D., and Lengyel, J. A. (2003). Localized JAK/STAT signaling is required for oriented cell rearrangement in a tubular epithelium. *Development* 130, 135–145. doi: 10.1242/dev.00202.
- Jouette, J., Guichet, A., and Claret, S. B. (2019). Dynein-mediated transport and membrane trafficking control PAR3 polarised distribution. *eLife* 8, e40212. doi: 10.7554/eLife.40212.
- Kallio, J., Myllymäki, H., Grönholm, J., Armstrong, M., Vanha-Aho, L., Mäkinen, L., et al. (2010). Eye transformer is a negative regulator of *Drosophila* JAK/STAT signaling. *FASEB j.* 24, 4467–4479. doi: 10.1096/fj.10-162784.
- Kaplan, D. H., Greenlund, A. C., Tanner, J. W., Shaw, A. S., and Schreiber, R. D. (1996). Identification of an Interferon- γ Receptor α Chain Sequence Required for JAK-1 Binding. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9–12. doi: 10.1074/jbc.271.1.9.
- Karsten, P., Häder, S., and Zeidler, M. P. (2002). Cloning and expression of *Drosophila* SOCS36E and its potential regulation by the JAK/STAT pathway. *Mechanisms of Development* 117, 343–346. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00216-2.
- Kawase, E., Wong, M. D., Ding, B. C., and Xie, T. (2004). Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing *bam* transcription in the *Drosophila* testis. *Development* 131, 1365–1375. doi: 10.1242/dev.01025.
- Khammari, A., Agnès, F., Gandille, P., and Pret, A.-M. (2011). Physiological apoptosis of polar cells during *Drosophila* oogenesis is mediated by Hid-dependent regulation of Diap1. *Cell Death Differ* 18, 793–805. doi: 10.1038/cdd.2010.141.
- Khuc Trong, P., Doerflinger, H., Dunkel, J., St Johnston, D., and Goldstein, R. E. (2015). Cortical microtubule nucleation can organise the cytoskeleton of *Drosophila* oocytes to define the anteroposterior axis. *eLife* 4, e06088. doi: 10.7554/eLife.06088.
- Kiger, A. A., Jones, D., Schulz, C., Rogers, M. B., and Fuller, M. T. (2001). Stem Cell Self-Renewal Specified by JAK-STAT Activation in Response to a Support Cell Cue. *Science* 294, 2542–2545. doi: 10.1126/science.1066707.
- Kim-Ha, J., Smith, J. L., and Macdonald, P. M. (1991). oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* 66, 23–35. doi: 10.1016/0092-8674(91)90136-M.
- Knight, E., and Korant, B. D. (1979). Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1824–1827. doi: 10.1073/pnas.76.4.1824.
- Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science* 298, 1955–1959. doi: 10.1126/science.1072161.
- Kolahi, K. S., White, P. F., Shreter, D. M., Classen, A.-K., Bilder, D., and Mofrad, M. R. K. (2009). Quantitative analysis of epithelial morphogenesis in *Drosophila* oogenesis: New insights based on morphometric analysis and mechanical modeling. *Developmental Biology* 331, 129–139. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.04.028.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Jänne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002). PIAS Proteins Modulate Transcription Factors by Functioning as SUMO-1 Ligases. *Mol Cell Biol* 22, 5222–5234. doi: 10.1128/MCB.22.14.5222-5234.2002.

- Krauss, J., Quinto, S. L. de, Nüsslein-Volhard, C., and Ephrussi, A. (2009). Myosin-V Regulates oskar mRNA Localization in the Drosophila Oocyte. *Current Biology* 19, 1058–1063. doi: 10.1016/j.cub.2009.04.062.
- Lantz, V., Chang, J. S., Horabin, J. I., Bopp, D., and Schedl, P. (1994). The Drosophila orb RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. *Genes Dev* 8, 598–613. doi: 10.1101/gad.8.5.598.
- Larner, A. C., Jonak, G., Cheng, Y. S., Korant, B., Knight, E., and Darnell, J. E. (1984). Transcriptional induction of two genes in human cells by beta interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6733–6737. doi: 10.1073/pnas.81.21.6733.
- Le Roy, C., and Wrana, J. L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112–126. doi: 10.1038/nrm1571.
- Leatherman, J. L., and Dinardo, S. (2010). Germline self-renewal requires cyst stem cells and stat regulates niche adhesion in Drosophila testes. *Nat Cell Biol* 12, 806–811. doi: 10.1038/ncb2086.
- Lee, J. K., Brandin, E., Branton, D., and Goldstein, L. S. (1997). alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in Drosophila melanogaster. *Development* 124, 353–362. doi: 10.1242/dev.124.2.353.
- Lehmann, R., and Nüsslein-Volhard, C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in drosophila. *Cell* 47, 141–152. doi: 10.1016/0092-8674(86)90375-2.
- Leibfried, A., Müller, S., and Ephrussi, A. (2013). A Cdc42-regulated actin cytoskeleton mediates Drosophila oocyte polarization. *Development* 140, 362–371. doi: 10.1242/dev.089250.
- Letourneau, M., Lapraz, F., Sharma, A., Vanzo, N., Waltzer, L., and Crozatier, M. (2016). *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS Lett* 590, 4034–4051. doi: 10.1002/1873-3468.12327.
- Levine, R. L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B. L., Wernig, G., Huntly, B. J. P., et al. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387–397. doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.023.
- Levy, D. E., Kessler, D. S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, J. E. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev.* 2, 383–393. doi: 10.1101/gad.2.4.383.
- Levy, D. E., and Lee, C. (2002). What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* 109, 1143–1148. doi: 10.1172/JCI0215650.
- Li, J. X. H., Tang, V. W., Boateng, K. A., and Briehner, W. M. (2021). Cadherin puncta are interdigitated dynamic actin protrusions necessary for stable cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2023510118. doi: 10.1073/pnas.2023510118.
- Li, W. X. (2008). Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling., Canonical and non-canonical JAK–STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18, 545, 545–551. doi: 10.1016/j.tcb.2008.08.008.

- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59–72.
- Liu, R., Woolner, S., Johndrow, J. E., Metzger, D., Flores, A., and Parkhurst, S. M. (2008). Sisyphus, the *Drosophila* myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos. *Development* 135, 53–63. doi: 10.1242/dev.011437.
- Liu, X., Robinson, G. W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8831–8835. doi: 10.1073/pnas.92.19.8831.
- Logan, G., Chou, W.-C., and McCartney, B. M. (2022). A Diaphanous and Enabled-dependent asymmetric actin cable array repositions nuclei during *Drosophila* oogenesis. *Development* 149, dev197442. doi: 10.1242/dev.197442.
- López-Onieva, L., Fernández-Miñán, A., and González-Reyes, A. (2008). Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Development* 135, 533–540. doi: 10.1242/dev.016121.
- López-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis. *Genes & Development* 15, 1393–1405. doi: 10.1101/gad.200901.
- Lu, W., Lakonishok, M., Liu, R., Billington, N., Rich, A., Glotzer, M., et al. (2020). Competition between kinesin-1 and myosin-V defines *Drosophila* posterior determination. *eLife* 9, e54216. doi: 10.7554/eLife.54216.
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W. P., Lee, S., Roberts, T. M., et al. (1997). Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates *Drosophila* and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 17, 1562–1571. doi: 10.1128/MCB.17.3.1562.
- Mach, J. M., and Lehmann, R. (1997). An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 423–435. doi: 10.1101/gad.11.4.423.
- Maeda, K., Takemura, M., Umemori, M., and Adachi-Yamada, T. (2008). E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes to Cells* 13, 1219–1227. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01239.x.
- Mahowald, A. P. (1972). Ultrastructural observations on oogenesis in *Drosophila*. *J. Morphol.* 137, 29–48. doi: 10.1002/jmor.1051370103.
- Mahowald, A. P. (2001). Assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Int Rev Cytol* 203, 187–213. doi: 10.1016/s0074-7696(01)03007-8.
- Makki, R., Meister, M., Pernetier, D., Ubeda, J.-M., Braun, A., Daburon, V., et al. (2010). A Short Receptor Downregulates JAK/STAT Signalling to Control the *Drosophila* Cellular Immune Response. *PLoS Biol* 8, e1000441. doi: 10.1371/journal.pbio.1000441.

- Manning, L. A., Weideman, A. M., Percy, B. E., and Starz-Gaiano, M. (2015). Tissue landscape alters adjacent cell fates during *Drosophila* egg development. *Nat Commun* 6, 7356. doi: 10.1038/ncomms8356.
- Marchetti, M., Monier, M.-N., Fradagrada, A., Mitchell, K., Baychelier, F., Eid, P., et al. (2006). Stat-mediated Signaling Induced by Type I and Type II Interferons (IFNs) Is Differentially Controlled through Lipid Microdomain Association and Clathrin-dependent Endocytosis of IFN Receptors. *Mol Biol Cell* 17, 2896–2909. doi: 10.1091/mbc.E06-01-0076.
- Marengere, L. E. M., and Pawson, T. (1994). Structure and function of SH2 domains. *Journal of Cell Science* 1994, 97–104. doi: 10.1242/jcs.1994.Supplement_18.14.
- Margaritis, L. H., Kafatos, F. C., and Petri, W. H. (1980). The eggshell of *Drosophila melanogaster*. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. *Journal of Cell Science* 43, 1–35. doi: 10.1242/jcs.43.1.1.
- Markussen, F. H., Michon, A. M., Breitwieser, W., and Ephrussi, A. (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* 121, 3723–3732. doi: 10.1242/dev.121.11.3723.
- Matthews, J. R., Sansom, O. J., and Clarke, A. R. (2011). Absolute requirement for STAT3 function in small-intestine crypt stem cell survival. *Cell Death Differ* 18, 1934–1943. doi: 10.1038/cdd.2011.77.
- McGregor, J. R., Xi, R., and Harrison, D. A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development* 129, 705–717. doi: 10.1242/dev.129.3.705.
- McKearin, D. M., and Spradling, A. C. (1990). bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. *Genes & Development* 4, 2242–2251. doi: 10.1101/gad.4.12b.2242.
- Meignin, C., Alvarez-Garcia, I., Davis, I., and Palacios, I. M. (2007). The salvador-warts-hippo pathway is required for epithelial proliferation and axis specification in *Drosophila*. *Curr Biol* 17, 1871–1878. doi: 10.1016/j.cub.2007.09.062.
- Melamed, D., and Kalderon, D. (2020). Opposing JAK-STAT and Wnt signaling gradients define a stem cell domain by regulating differentiation at two borders. *eLife* 9, e61204. doi: 10.7554/eLife.61204.
- Metcalfe, D., Greenhalgh, C. J., Viney, E., Willson, T. A., Starr, R., Nicola, N. A., et al. (2000). Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 405, 1069–1073. doi: 10.1038/35016611.
- Micchelli, C. A., and Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439, 475–479. doi: 10.1038/nature04371.
- Mignotte, B., Colin, J., Brun, S., and Guéna, I. (2005). Apoptosis: the fly point of view. *Apoptosis*.
- Milas, A., de-Carvalho, J., and Telley, I. A. (2022). Follicle cell contact maintains main body axis polarity in the *Drosophila melanogaster* oocyte. *Developmental Biology* doi: 10.1101/2022.03.03.482911.
- Mische, S., Li, M., Serr, M., and Hays, T. S. (2007). Direct Observation of Regulated

- Ribonucleoprotein Transport Across the Nurse Cell/Oocyte Boundary. *MBoC* 18, 2254–2263. doi: 10.1091/mbc.e06-10-0959.
- Monahan, A. J., and Starz-Gaiano, M. (2013). Socs36E attenuates STAT signaling to optimize motile cell specification in the *Drosophila* ovary. *Developmental Biology* 379, 152–166. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.03.022.
- Monahan, A. J., and Starz-Gaiano, M. (2015). Socs36E limits STAT signaling via Cullin2 and a SOCS-box independent mechanism in the *Drosophila* egg chamber. *Mech. Dev.* 138 Pt 3, 313–327. doi: 10.1016/j.mod.2015.08.003.
- Monteith, C. E., Brunner, M. E., Djagaeva, I., Bielecki, A. M., Deutsch, J. M., and Saxton, W. M. (2016). A Mechanism for Cytoplasmic Streaming: Kinesin-Driven Alignment of Microtubules and Fast Fluid Flows. *Biophys J* 110, 2053–2065. doi: 10.1016/j.bpj.2016.03.036.
- Montell, D. J., Rorth, P., and Spradling, A. C. (1992). slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* CEBP. *Cell* 71, 51–62. doi: 10.1016/0092-8674(92)90265-E.
- Morais-de-Sá, E., Vega-Rioja, A., Trovisco, V., and St Johnston, D. (2013). Oskar Is Targeted for Degradation by the Sequential Action of Par-1, GSK-3, and the SCF-Slimb Ubiquitin Ligase. *Developmental Cell* 26, 303–314. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.011.
- Morin-Poulard, I., Vincent, A., and Crozatier, M. (2013). The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity. *JAK-STAT* 2, e25700. doi: 10.4161/jkst.25700.
- Müller, M., Briscoe, J., Laxton, C., Guschin, D., Ziemiecki, A., Silvennoinen, O., et al. (1993). The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- α/β and - γ signal transduction. *Nature* 366, 129–135. doi: 10.1038/366129a0.
- Müller, P., Kutteneuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M. P., and Boutros, M. (2005). Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 436, 871–875. doi: 10.1038/nature03869.
- Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., et al. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 11349–11353. doi: 10.1073/pnas.88.24.11349.
- Myers, M. P., Andersen, J. N., Cheng, A., Tremblay, M. L., Horvath, C. M., Parisien, J.-P., et al. (2001). TYK2 and JAK2 Are Substrates of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry* 276, 47771–47774. doi: 10.1074/jbc.C100583200.
- Naora, H., and Montell, D. J. (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat. Rev. Cancer* 5, 355–366. doi: 10.1038/nrc1611.
- Nashchekin, D., Busby, L., Jakobs, M., Squires, I., and Johnston, D. (2021). Symmetry breaking in the female germline cyst. *Science* 374, 874–879. doi: 10.1126/science.abj3125.
- Nashchekin, D., Fernandes, A. R., and St Johnston, D. (2016). Patronin/Shot Cortical

- Foci Assemble the Noncentrosomal Microtubule Array that Specifies the Drosophila Anterior-Posterior Axis. *Developmental Cell* 38, 61–72. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.010.
- Navarro, C., Puthalakath, H., Adams, J. M., Strasser, A., and Lehmann, R. (2004). Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. *Nat Cell Biol* 6, 427–435. doi: 10.1038/ncb1122.
- Neuman-Silberberg, F. S., and Schüpbach, T. (1993). The drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell* 75, 165–174. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80093-5.
- Ng, B. F., Selvaraj, G. K., Santa-Cruz Mateos, C., Grosheva, I., Alvarez-Garcia, I., Martín-Bermudo, M. D., et al. (2016). α -Spectrin and integrins act together to regulate actomyosin and columnarization, and to maintain a monolayered follicular epithelium. *Development* 143, 1388–1399. doi: 10.1242/dev.130070.
- Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). DE-Cadherin Is Required for Intercellular Motility during Drosophila Oogenesis. *Journal of Cell Biology* 144, 533–547. doi: 10.1083/jcb.144.3.533.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* 287, 795–801. doi: 10.1038/287795a0.
- Ohlstein, B., and Spradling, A. (2006). The adult Drosophila posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439, 470–474. doi: 10.1038/nature04333.
- O’Keefe, D. D., Prober, D. A., Moyle, P. S., Rickoll, W. L., and Edgar, B. A. (2007). Egfr/Ras signaling regulates DE-cadherin/Shotgun localization to control vein morphogenesis in the Drosophila wing. *Developmental Biology* 311, 25–39. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.08.003.
- Onishi, A., Chen, Q., Humtsoe, J. O., and Kramer, R. H. (2008). STAT3 signaling is induced by intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 314, 377–386. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.09.018.
- Palacios, I. M., and St Johnston, D. (2002). Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the Drosophila oocyte. *Development* 129, 5473–5485. doi: 10.1242/dev.00119.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch–ligand interactions. *Nature* 387, 908–912. doi: 10.1038/43191.
- Parton, R. M., Hamilton, R. S., Ball, G., Lei Yang, Cullen, C. F., Lu, W., et al. (2011). A PAR-1–dependent orientation gradient of dynamic microtubules directs posterior cargo transport in the Drosophila oocyte. *Journal of Cell Biology* 194, 121–135. doi: 10.1083/jcb.201103160.
- Peron, M., Dinarello, A., Meneghetti, G., Martorano, L., Facchinello, N., Vettori, A., et al. (2020). The stem-like STAT3-responsive cells of zebrafish intestine are WNT/ β -catenin dependent. *Development*, dev.188987. doi: 10.1242/dev.188987.
- Perrimon, N., and Mahowald, A. P. (1986). I(1)hopscotch, a larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in Drosophila. *Developmental Biology* 118, 28–41. doi: 10.1016/0012-1606(86)90070-9.

- Pokrywka, N. J., and Stephenson, E. C. (1991). Microtubules mediate the localization of bicoid RNA during *Drosophila* oogenesis. *Development* 113, 55–66. doi: 10.1242/dev.113.1.55.
- Polesello, C., and Tapon, N. (2007). Salvador-Warts-Hippo Signaling Promotes *Drosophila* Posterior Follicle Cell Maturation Downstream of Notch. *Current Biology* 17, 1864–1870. doi: 10.1016/j.cub.2007.09.049.
- Popkova, A., Rauzi, M., and Wang, X. (2021). Cellular and Supracellular Planar Polarity: A Multiscale Cue to Elongate the *Drosophila* Egg Chamber. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 645235. doi: 10.3389/fcell.2021.645235.
- Popkova, A., Stone, O. J., Chen, L., Qin, X., Liu, C., Liu, J., et al. (2020). A Cdc42-mediated supracellular network drives polarized forces and *Drosophila* egg chamber extension. *Nat Commun* 11, 1921. doi: 10.1038/s41467-020-15593-2.
- Poulton, J. S., and Deng, W.-M. (2006). Dystroglycan down-regulation links EGF receptor signaling and anterior-posterior polarity formation in the *Drosophila* oocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12775–12780. doi: 10.1073/pnas.0603817103.
- Quinlan, M. E. (2016). Cytoplasmic Streaming in the *Drosophila* Oocyte. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 173–195. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125416.
- Ramírez Moreno, M., and Bulgakova, N. A. (2022). The Cross-Talk Between EGFR and E-Cadherin. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 828673. doi: 10.3389/fcell.2021.828673.
- Ramírez Moreno, M., Stempor, P. A., and Bulgakova, N. A. (2021). Interactions and Feedbacks in E-Cadherin Transcriptional Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.701175> [Accessed September 20, 2022].
- Rane, S. G., and Reddy, E. P. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19, 5662–5679. doi: 10.1038/sj.onc.1203925.
- Reilein, A., Melamed, D., Park, K. S., Berg, A., Cimetta, E., Tandon, N., et al. (2017). Alternative direct stem cell derivatives defined by stem cell location and graded Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 19, 433–444. doi: 10.1038/ncb3505.
- Riechmann, V., and Ephrussi, A. (2004). Par-1 regulates *bicoid* mRNA localisation by phosphorylating Exuperantia. *Development* 131, 5897–5907. doi: 10.1242/dev.01515.
- Riechmann, V., Gutierrez, G. J., Filardo, P., Nebreda, A. R., and Ephrussi, A. (2002). Par-1 regulates stability of the posterior determinant Oskar by phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4, 337–342. doi: 10.1038/ncb782.
- Riparbelli, M. G., Persico, V., and Callaini, G. (2022). Cell-to-Cell Interactions during Early *Drosophila* oogenesis: An Ultrastructural Analysis. 12. *Cells* 26;11(17):2658. doi: 10.3390/cells11172658.
- RND Systems A Reference Guide for Jak/STAT Signaling. doi: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/reference-guide-jak-stat-signaling>.
- Rojas-Ríos, P., Guerrero, I., and González-Reyes, A. (2012). Cytoneme-Mediated Delivery of Hedgehog Regulates the Expression of Bone Morphogenetic Proteins to

- Maintain Germline Stem Cells in *Drosophila*. *PLoS Biol* 10, e1001298. doi: 10.1371/journal.pbio.1001298.
- Röper, K., and Brown, N. H. (2004). A Spectraplakins Is Enriched on the Fusome and Organizes Microtubules during Oocyte Specification in *Drosophila*. *Current Biology* 14, 99–110. doi: 10.1016/j.cub.2003.12.056.
- Roth, S., Jordan, P., and Karess, R. (1999). Binuclear *Drosophila* oocytes: consequences and implications for dorsal-ventral patterning in oogenesis and embryogenesis. *Development* 126, 927–934. doi: 10.1242/dev.126.5.927.
- Roth, S., Shira Neuman-Silberberg, F., Barcelo, G., and Schüpbach, T. (1995). *cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967–978. doi: 10.1016/0092-8674(95)90016-0.
- Ruohola, H., Bremer, K. A., Baker, D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1991). Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66, 433–449. doi: 10.1016/0092-8674(81)90008-8.
- Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., et al. (1999). Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *The EMBO Journal* 18, 4657–4668. doi: 10.1093/emboj/18.17.4657.
- Saxton, W. M. (2001). Microtubules, Motors, and mRNA Localization Mechanisms. *Cell* 107, 707–710. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00602-X.
- Schaefer, T. S., Sanders, L. K., and Nathans, D. (1995). Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9097–9101. doi: 10.1073/pnas.92.20.9097.
- Schlichting, K., Wilsch-Bräuninger, M., Demontis, F., and Dahmann, C. (2006). Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. *Journal of Cell Science* 119, 1184–1195. doi: 10.1242/jcs.02831.
- Schönherr, E., and Hausser, H.-J. (2000). Extracellular Matrix and Cytokines: A Functional Unit. *Developmental Immunology* 7, 89–101. doi: 10.1155/2000/31748.
- Shen, Y., Schlessinger, K., Zhu, X., Meffre, E., Quimby, F., Levy, D. E., et al. (2004). Essential Role of STAT3 in Postnatal Survival and Growth Revealed by Mice Lacking STAT3 Serine 727 Phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24, 407–419. doi: 10.1128/MCB.24.1.407-419.2004.
- Shi, S., Calhoun, H. C., Xia, F., Li, J., Le, L., and Li, W. X. (2006). JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing. *Nat Genet* 38, 1071–1076. doi: 10.1038/ng1860.
- Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S. J., Dutta, P., Yan, S.-J., et al. (2008). *Drosophila* STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol* 10, 489–496. doi: 10.1038/ncb1713.
- Shu, Z., Row, S., and Deng, W.-M. (2018). Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends in Cell Biology* 28, 465–474. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.006.

- Shulman, J. M., Benton, R., and St Johnston, D. (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101, 377–388. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80848-x.
- Silver, D. L., Geisbrecht, E. R., and Montell, D. J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development* 132, 3483–3492. doi: 10.1242/dev.01910.
- Silver, D. L., and Montell, D. J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* 107, 831–841.
- Silver, D. L., Naora, H., Liu, J., Cheng, W., and Montell, D. J. (2004). Activated Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3. *Cancer Research* 64, 3550–3558. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3959.
- Sinsimer, K. S., Jain, R. A., Chatterjee, S., and Gavis, E. R. (2011). A late phase of germ plasm accumulation during *Drosophila* oogenesis requires *lost* and *rumpelstiltskin*. *Development* 138, 3431–3440. doi: 10.1242/dev.065029.
- Song, X., Wong, M. D., Kawase, E., Xi, R., Ding, B. C., McCarthy, J. J., et al. (2004). Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, *bag of marbles*, in germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 131, 1353–1364. doi: 10.1242/dev.01026.
- Song, X., Zhu, C.-H., Doan, C., and Xie, T. (2002). Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the *Drosophila* Ovary Niches. *Science* 296, 1855–1857. doi: 10.1126/science.1069871.
- Sotillos, S., Díaz-Meco, M. T., Moscat, J., and Castelli-Gair Hombría, J. (2008). Polarized subcellular localization of Jak/STAT components is required for efficient signaling. *Curr. Biol.* 18, 624–629. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.055.
- Sotillos, S., Krahn, M., Espinosa-Vázquez, J. M., and Hombría, J. C.-G. (2013). Src kinases mediate the interaction of the apical determinant Bazooka/PAR3 with STAT92E and increase signalling efficiency in *Drosophila* ectodermal cells. *Development* 140, 1507–1516. doi: 10.1242/dev.092320.
- Spradling, A. C. (1993). “Developmental genetics of oogenesis,” in *The Development of Drosophila melanogaster.*, eds. M. Bate and A. Martinez Arias (Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1–70.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 363–375. doi: 10.1038/nrm1643.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1991). *staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51–63. doi: 10.1016/0092-8674(91)90138-O.
- St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S., and Nüsslein-Volhard, C. (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 107 Suppl, 13–19. doi: 10.1242/dev.107.Supplement.13.
- Stark, G. R., and Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*

36, 503–514. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.013.

Starz-Gaiano, M., Melani, M., Meinhardt, H., and Montell, D. (2009). Interpretation of the UPD/JAK/STAT morphogen gradient in *Drosophila* follicle cells. *Cell Cycle* 8, 2917–2925. doi: 10.4161/cc.8.18.9547.

Starz-Gaiano, M., Melani, M., Wang, X., Meinhardt, H., and Montell, D. J. (2008). Feedback inhibition of Jak/STAT signaling by apontic is required to limit an invasive cell population. *Dev. Cell* 14, 726–738. doi: 10.1016/j.devcel.2008.03.005.

Sun, J., and Deng, W.-M. (2007). Hindsight Mediates the Role of Notch in Suppressing Hedgehog Signaling and Cell Proliferation. *Developmental Cell* 12, 431–442. doi: 10.1016/j.devcel.2007.02.003.

Sun, Y., Yan, Y., Deneff, N., and Schüpbach, T. (2011). Regulation of somatic myosin activity by Protein Phosphatase 1 β controls *Drosophila* oocyte polarization. *Development* 138, 1991–2001. doi: 10.1242/dev.062190.

Sundfeldt, K., Ivarsson, K., Carlsson, M., Enerbäck, S., Janson, P. O., Brännström, M., et al. (1999). The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBP β during epithelial tumour progression. *Br J Cancer* 79, 1240–1248. doi: 10.1038/sj.bjc.6690199.

Suyama, R., Jenny, A., Curado, S., Pellis-van Berkel, W., and Ephrussi, A. (2009). The actin-binding protein Lasp promotes Oskar accumulation at the posterior pole of the *Drosophila* embryo. *Development* 136, 95–105. doi: 10.1242/dev.027698.

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., et al. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573–581. doi: 10.1016/0092-8674(89)90438-8.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., et al. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 3801–3804. doi: 10.1073/pnas.94.8.3801.

Tan, L., Chang, J. S., Costa, A., and Schedl, P. (2001). An autoregulatory feedback loop directs the localized expression of the *Drosophila* CPEB protein Orb in the developing oocyte. *Development* 128, 1159–1169. doi: 10.1242/dev.128.7.1159.

Tanaka, T., and Nakamura, A. (2011). Oskar-induced endocytic activation and actin remodeling for anchorage of the *Drosophila* germ plasm. *BioArchitecture* 1, 122–126. doi: 10.4161/bioa.1.3.17313.

Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016295–a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.

Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J., and Tepass, U. (2000). Apical, Lateral, and Basal Polarization Cues Contribute to the Development of the Follicular Epithelium during *Drosophila* Oogenesis. *Journal of Cell Biology* 151, 891–904. doi: 10.1083/jcb.151.4.891.

Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L., and Alberts, B. M. (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* 115, 923–936. doi: 10.1242/dev.115.4.923.

- Timmons, A. K., Mondragon, A. A., Schenkel, C. E., Yalonetskaya, A., Taylor, J. D., Moynihan, K. E., et al. (2016). Phagocytosis genes nonautonomously promote developmental cell death in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113. doi: 10.1073/pnas.1522830113.
- Tissot, N., Lepesant, J.-A., Bernard, F., Legent, K., Bosveld, F., Martin, C., et al. (2017). Distinct molecular cues ensure a robust microtubule-dependent nuclear positioning in the *Drosophila* oocyte. *Nat Commun* 8, 15168. doi: 10.1038/ncomms15168.
- Tiwari, R. K., Kusari, J., Kumar, R., and Sen, G. C. (1988). Gene induction by interferons and double-stranded RNA: selective inhibition by 2-aminopurine. *Mol Cell Biol* 8, 4289–4294. doi: 10.1128/mcb.8.10.4289-4294.1988.
- Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K. C., Kempthues, K. J., and Ephrussi, A. (2000). A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol* 2, 458–460. doi: 10.1038/35017101.
- Torres, A. Y., Malartre, M., Pret, A.-M., and Agnès, F. (2017). JAK/STAT signaling is necessary for cell monosis prior to epithelial cell apoptotic extrusion. *Cell Death Dis* 8, e2814. doi: 10.1038/cddis.2017.166.
- Torres, I. L., López-Schier, H., and Johnston, D. S. (2003). A Notch/Delta-Dependent Relay Mechanism Establishes Anterior-Posterior Polarity in *Drosophila*. *Developmental Cell* 5, 547–558. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00272-7.
- Trovisco, V., Belaya, K., Nashchekin, D., Irion, U., Sirinakis, G., Butler, R., et al. (2016). bicoid mRNA localises to the *Drosophila* oocyte anterior by random Dynein-mediated transport and anchoring. *eLife* 5, e17537. doi: 10.7554/eLife.17537.
- TwoRoger, M., Larkin, M. K., Bryant, Z., and Ruohola-Baker, H. (1999). Mosaic analysis in the *drosophila* ovary reveals a common hedgehog-inducible precursor stage for stalk and polar cells. *Genetics* 151, 739–748. doi: 10.1093/genetics/151.2.739.
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y., and Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes & development* 10, 659–71. doi: 10.1101/gad.10.6.659.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomäki, S., Jänne, O. A., et al. (2003). PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 102, 3311–3313. doi: 10.1182/blood-2002-12-3816.
- Ungureanu, D., Wu, J., Pekkala, T., Niranjana, Y., Young, C., Jensen, O. N., et al. (2011). The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol* 18, 971–976. doi: 10.1038/nsmb.2099.
- Vaccari, T., and Ephrussi, A. (2002). The Fusome and Microtubules Enrich Par-1 in the Oocyte, Where It Effects Polarization in Conjunction with Par-3, BicD, Egl, and Dynein. *Current Biology* 12, 1524–1528. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01079-5.
- Vachias, C., Couderc, J.-L., and Grammont, M. (2010). A two-step Notch-dependant

- mechanism controls the selection of the polar cell pair in *Drosophila* oogenesis. *Development* 137, 2703–2711. doi: 10.1242/dev.052183.
- Vachias, C., Fritsch, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Mirouse, V. (2014). Tight Coordination of Growth and Differentiation between Germline and Soma Provides Robustness for *Drosophila* Egg Development. *Cell Reports* 9, 531–541. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.035.
- Van de Bor, V., Zimniak, G., Cérézo, D., Schaub, S., and Noselli, S. (2011). Asymmetric localisation of cytokine mRNA is essential for JAK/STAT activation during cell invasiveness. *Development* 138, 1383–1393. doi: 10.1242/dev.056184.
- Vanzo, N. F., and Ephrussi, A. (2002). Oskar anchoring restricts pole plasm formation to the posterior of the *Drosophila* oocyte. *Development* 129, 3705–3714. doi: 10.1242/dev.129.15.3705.
- Vanzo, N., Oprins, A., Xanthakis, D., Ephrussi, A., and Rabouille, C. (2007). Stimulation of Endocytosis and Actin Dynamics by Oskar Polarizes the *Drosophila* Oocyte. *Developmental Cell* 12, 543–555. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.002.
- Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G. R., and Pellegrini, S. (1992). A protein tyrosine kinase in the interferon $\alpha\beta$ signaling pathway. *Cell* 70, 313–322. doi: 10.1016/0092-8674(92)90105-L.
- Vidal, O. M., Stec, W., Bausek, N., Smythe, E., and Zeidler, M. P. (2010). Negative regulation of *Drosophila* JAK–STAT signalling by endocytic trafficking. *J Cell Sci* 123, 3457–3466. doi: 10.1242/jcs.066902.
- Viktorinová, I., and Dahmann, C. (2013). Microtubule Polarity Predicts Direction of Egg Chamber Rotation in *Drosophila*. *Current Biology* 23, 1472–1477. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.014.
- Wang, H., Singh, S. R., Zheng, Z., Oh, S.-W., Chen, X., Edwards, K., et al. (2006). Rap-GEF signaling controls stem cell anchoring to their niche through regulating DE-cadherin-mediated cell adhesion in the *Drosophila* testis. *Dev. Cell* 10, 117–126. doi: 10.1016/j.devcel.2005.11.004.
- 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. doi: 10.1038/nature07214.
- Wang, X., and Page-McCaw, A. (2018). Wnt6 maintains anterior escort cells as an integral component of the germline stem cell niche. *Development*, dev.158527. doi: 10.1242/dev.158527.
- Wang, Z., Sandiford, S., Wu, C., and Li, S. S.-C. (2009). Numb regulates cell–cell adhesion and polarity in response to tyrosine kinase signalling. *EMBO J* 28, 2360–2373. doi: 10.1038/emboj.2009.190.
- Waring, G. L. (2000). “Morphogenesis of the eggshells in *Drosophila*,” in *International Review of Cytology* (Elsevier), 67–108. doi: 10.1016/S0074-7696(00)98003-3.
- Wathelet, M. G., Clauss, I. M., Paillard, F. C., and Huez, G. A. (1989). 2-Aminopurine selectively blocks the transcriptional activation of cellular genes by virus, double-stranded RNA and interferons in human cells. *Eur J Biochem* 184, 503–509. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15043.x.

- Wei, S.-Y., Escudero, L. M., Yu, F., Chang, L.-H., Chen, L.-Y., Ho, Y.-H., et al. (2005). Echinoid Is a Component of Adherens Junctions That Cooperates with DE-Cadherin to Mediate Cell Adhesion. *Developmental Cell* 8, 493–504. doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.015.
- Weil, T. T., Forrest, K. M., and Gavis, E. R. (2006). Localization of bicoid mRNA in late oocytes is maintained by continual active transport. *Dev Cell* 11, 251–262. doi: 10.1016/j.devcel.2006.06.006.
- Weil, T. T., Xanthakis, D., Parton, R., Dobbie, I., Rabouille, C., Gavis, E. R., et al. (2010). Distinguishing direct from indirect roles for bicoid mRNA localization factors. *Development* 137, 169–176. doi: 10.1242/dev.044867.
- Wilks, A. F. (1989). Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1603–1607.
- Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zürcher, G., and Ziemiecki, A. (1991). Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 11, 2057–2065.
- Wright, V. M., Vogt, K. L., Smythe, E., and Zeidler, M. P. (2011). Differential activities of the *Drosophila* JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3. *Cellular Signalling* 23, 920–927. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.020.
- Xi, R., McGregor, J. R., and Harrison, D. A. (2003). A Gradient of JAK Pathway Activity Patterns the Anterior-Posterior Axis of the Follicular Epithelium. *Developmental Cell* 4, 167–177. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00412-4.
- Xie, T., and Spradling, A. C. (2000). A Niche Maintaining Germ Line Stem Cells in the *Drosophila* Ovary. *Science* 290, 328–330. doi: 10.1126/science.290.5490.328.
- Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A. F., et al. (2002). Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Developmental Cell* 2, 363–375. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00126-0.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R., and Darnell, J. E. (1996). Identification of a Stat Gene That Functions in *Drosophila* Development. *Cell* 84, 421–430. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81287-8.
- Yoshida, H., Cheng, W., Hung, J., Montell, D., Geisbrecht, E., Rosen, D., et al. (2004). Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8144–8149. doi: 10.1073/pnas.0400400101.
- Yu, J., Poulton, J., Huang, Y.-C., and Deng, W.-M. (2008). The hippo pathway promotes Notch signaling in regulation of cell differentiation, proliferation, and oocyte polarity. *PLoS One* 3, e1761. doi: 10.1371/journal.pone.0001761.
- Zarani, F. E., and Margaritis, L. H. (1986). The eggshell of *Drosophila melanogaster*. V. Structure and morphogenesis of the micropylar apparatus. *Can. J. Zool.* 64, 2509–2519. doi: 10.1139/z86-372.
- Zeidler, M. P., Perrimon, N., and Strutt, D. I. (1999). Polarity determination in the *Drosophila* eye: a novel role for Unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes & Development* 13, 1342–1353. doi: 10.1101/gad.13.10.1342.

- Zhang, Y., and Kalderon, D. (2000). Regulation of cell proliferation and patterning in *Drosophila* oogenesis by Hedgehog signaling. *Development* 127, 2165–2176. doi: 10.1242/dev.127.10.2165.
- Zhao, T., Graham, O. S., Raposo, A., and St Johnston, D. (2012). Growing Microtubules Push the Oocyte Nucleus to Polarize the *Drosophila* Dorsal-Ventral Axis. *Science* 336, 999–1003. doi: 10.1126/science.1219147.
- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E. (1994). Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4806–4810. doi: 10.1073/pnas.91.11.4806.
- Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A., Davis, I., et al. (2008). In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization. *Cell* 134, 843–853. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.053.
- Zimyanin, V., Lowe, N., and St Johnston, D. (2007). An oskar-dependent positive feedback loop maintains the polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* 17, 353–359. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.044.