



HAL
open science

Étude du rôle du complexe Dystrophine/Dystroglycan au cours de l'élongation tissulaire du follicule ovarien chez la drosophile

Fabiana Cerqueira Campos

► **To cite this version:**

Fabiana Cerqueira Campos. Étude du rôle du complexe Dystrophine/Dystroglycan au cours de l'élongation tissulaire du follicule ovarien chez la drosophile. Biologie du développement. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT: 2018CLFAC106 . tel-04144283

HAL Id: tel-04144283

<https://theses.hal.science/tel-04144283>

Submitted on 28 Jun 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.

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

Thèse

Présentée à l'université Clermont-Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

CERQUEIRA CAMPOS Fabiana

**Étude du rôle du complexe
Dystrophine/Dystroglycan au cours de l'élongation
tissulaire du follicule ovarien chez la drosophile.**

Spécialité : Biologie du développement

Soutenue publiquement le vendredi 31 août 2018

Membres du jury :

Rapporteurs : DR. RUGGIERO Florence
DR. VAN DE BOR Véronique
DR. VINCENT Stéphane
Directeur de thèse : DR. MIROUSE Vincent

Remerciements

“Rédaction du manuscrit de thèse, remerciements”. Je ne pensais que cela surviendrait si rapidement. Et, pourtant, j’ai eu souvent hâte de voir ce “bout” arriver. C’est donc ça, la fin de thèse ! Faire le bilan de quatre ans, mêlée de sentiments contradictoires, déboussolée par le terme de cette aventure riche en émotions et par l’excitation du départ vers d’autres histoires... Je me sens mélancolique, partagée entre le soulagement du travail plus ou moins accompli et la tristesse de finir ce projet et quitter cette chouette équipe.

J’ai passé quatre très belles années (et même un peu plus si je compte mon stage en master1 chez Philippe) au sein du GReD ! J’ai appris des milliards de choses, scientifiques, relationnelles, anecdotiques, j’ai appris des mots dans plusieurs langues, plein d’expressions françaises et des mots en patois, j’ai aussi appris à faire confiance, à vivre en communauté, à me surpasser. Et tout cela, je le dois, en grande partie, à vous, GRedins et autres personnes rencontrées parfois ponctuellement au cours de ce parcours intense.

Je souhaite, tout d’abord remercier les membres du jury, Véronique Van de Bor, Florence Ruggiero et Stéphane Vincent pour avoir accepté notre invitation. Merci par avance pour la lecture de ce manuscrit, votre expertise et les discussions à venir.

Je me sens très fière et très chanceuse d’avoir pu intégrer ton équipe, Vincent. Je te remercie pour ce sujet passionnant. Je me souviendrai toujours de cet entretien pour le stage de master 2 que j’avais demandé sans grande conviction. La drosophile, à l’époque, ne m’était pas très attrayante. Et pourtant, après ton exposé de plus d’une heure, je suis ressortie, les yeux pleins d’étoiles ou plutôt de jolies images de confocal. “Nous gagnons chaque année le concours de la plus belle photo aux journées du GReD !” m’avais-tu même donné comme argument ! J’aime bien ces petites remarques un peu naïves que tu emploies parfois ! J’ai donc finalement choisi la droso avec toi et, par chance, tu m’as également désignée ! J’ai adoré mon stage de M2 durant lequel je me suis vraiment épanouie. Tu es pédagogue, disponible, extrêmement patient, débordant d’idées et un peu illuminé. Tes remarques, tes corrections sont justes ! Tu sais exactement comment prendre chacun d’entre nous et tu comprends ce que nous ne saisissons pas pour nous l’expliquer simplement. Tu sais nous encourager, maladroitement parfois, mais c’est ce qui te rend parfois un peu agaçant mais drôle aussi. Tu es l’encadrant qu’on nous envie, celui qui nous accompagne de loin, nous laissant de la liberté mais toujours là pour nous aider. Je te remercie en particulier pour cette dernière étape de rédaction et la soutenance à venir.

Caro, merci pour ton écoute, ton partage de sentiments, d’expériences visant à nous rassurer. Merci pour le réconfort et l’aide que tu apportes. Merci pour les madeleines, les gâteaux, le chocolat chaud... Merci pour ta compréhension surtout, et pour tout ce que tu fais pour notre bien-être. Merci aussi pour nos discussions sur les enfants, sur ta facilité à mettre des mots sur nos tracas, à accepter nos doutes, nos failles. Merci enfin pour les partages de “ras-le-bol” ! Si tu n’as pas confiance en toi, fais-moi confiance à moi : tu es une femme géniale et surtout une super maman ! Et tu es, pour moi, la plus cool ! Pas vraiment zen, mais tout le reste du “cool” ! Merci de m’avoir si bien accompagnée au cours de ces années !

Graziella, tu es la première que j’ai cotoyée dans cette équipe, pour le CRISPR ! C’était top ! Tu es comme une maîtresse de maternelle : tu expliques tout très méthodiquement et calmement avec une voix douce et tu montres comment faire, patiemment. Je suis super contente d’être sur le bureau en face de toi pour tes yeux magnifiques et surtout pour partager tout ce qui nous passe par la tête. Tu es toujours souriante et toujours partante pour faire l’idiotie. Merci pour ta fausse légèreté et ta sérénité.

Olivier, je t’ai demandé une fois d’être à mes côtés lors de mes réunions pour te piéger pour ta fête d’anniversaire, certes, mais il est pourtant vrai que tu me rassures toujours. Bien que nous ne nous parlions pas forcément beaucoup lorsque je suis arrivée en m2, c’est toi qui m’as permis de me sentir intégrée dans l’équipe. Tu es toujours à l’écoute, bienveillant, prêt à répondre à n’importe quelle question, même la plus idiote ! Tu as une capacité à t’intéresser à tout et n’importe quoi, à aller chercher l’info insolite ! Et tu as une aptitude à jouer de l’humour avec beaucoup de délicatesse pour apaiser en cas de stress. Merci pour ça !

Cynthia, que je suis contente de te revoir au labo et en plus, dans notre équipe, sur le projet dystrophine. C’est comme un rêve ! C’est super de pouvoir partager cela avec toi. Et au-delà du projet, tu es attentive, apaisante, compréhensive et tu as beaucoup d’humour. Merci beaucoup pour ton aide et ton soutien !

Lisa, tu l'étudiante de master2 parfaite : cool, passionnée, enthousiaste, bosseuse ! J'espère vraiment que tu resteras dans l'équipe parce que tu le mérites et qu'ils méritent une thésarde comme toi.

Corinne, je te remercie pour nos discussions. C'est un peu grâce à toi que j'ai postulé en post-doc et je suis contente de continuer encore un peu en recherche.

Pierre, merci pour tes crêpes, tes pouchinades, ton amour pour la Bretagne et surtout merci pour les softwares, les quantifs, les stats...

Clothilde, je te remercie pour tous tes conseils, ta rigueur, ton organisation, ton excessivité, tes discussions sans fin, ton aptitude à débattre et dissenter sur tout. Je te remercie surtout pour tout ce que m'as appris et ton soutien. Pour reprendre tes mots "Tu es magique, je suis fan de toi !".

Jean-Louis, merci pour tes conseils, pour ton rire que j'adore, pour le regard tendre que tu portes sur tes anciens étudiants et les thésards actuels, pour ton expérience et le partage de tes connaissances scientifiques mais aussi et surtout épicuriennes...

Hervé, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris. Tu m'as accompagné comme un grand frère en me brusquant un peu parfois mais toujours présent pour répondre à mes questions et surtout passionné par la science. Avec Nina, vous êtes des très belles personnes.

Ma fidèle confidente, ma sœur de coeur, mon amie, Amandine. Je n'ai jamais rencontré quelqu'un comme toi. Tout est simple ! On se comprend sans rien se dire. Pas de doute, pas de questionnement ! Nous savons que nous sommes là, que nous pouvons compter l'une sur l'autre (sauf un repiquage que j'ai oublié!). Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et ma thèse n'aurait pas été la même sans toi, sans nos séances de "pfff, j'en ai marre !", sans nos commentaires, nos petites histoires, nos commérages qui détendent bien. Je sais qu'on se reverra mais je suis triste de te quitter, de ne pas être à tes côtés pour tes derniers mois de thèse. Mais je sais que tu t'en sortiras à merveille et j'espère pouvoir être présente à ta soutenance.

Manue, mon guide ! Que je me sens perdue sans toi pour cette fin de parcours. Dès le premier instant, nous avons été comme attirées l'une vers l'autre et je me suis toujours réfugiée vers toi en période de doute, de stress. Tu as toujours su employer les mots justes, rassurants. Merci pour ton écoute, tous les bons moments partagés, les discussions interminables au labo tard le soir, et les fous rires. A bientôt, j'espère, à Edimbourg !

Lilia, je te remercie pour tes bizarreries, de partager avec moi des sensations incomprises par les autres, dans un univers plus ou moins parallèle ou perché à quelques pieds au-dessus de la Terre. Et je te remercie d'être toujours présente à mes côtés. Je t'adore.

Cécilia, Lorena, Marti et Nico, je vous remercie pour les repas partagés pleins de bonne humeur et de rires. Ce sont toujours des bons moments. Vous êtes formidables, toujours souriants, pleins d'énergie et attentifs également. J'espère que nous nous recroiserons ici, à Barcelone, à Paris, à Limoges ou ailleurs...

Michaela, Emilie, Bertille, Marlène, Laura : 5 perles découvertes à différents stades de ma thèse mais qui ont été très importantes pour moi. Je vous remercie pour votre sensibilité et votre gentillesse. Je vous aime beaucoup !

Merci également à Nathalie, Steph, Emilie, Claire, Cyrille, Anissa, Islem, Nadège, Fanfan, Silke, Capucine, Coline, Parvathy, Arpita, Lucie, Sabine, Cécile, Irina, Preethi, Charles, Hadrien, les 2 Guillaume, Quentin, Cédric, Loïc, Marion, Régine, Geoffroy, Pierre, Ouarda, Benjamin, Catherine, David, Philippe, Mélanie, Anne, Isabelle, Marie-Diane, Jérémy, Catarina, Mafalda... et j'en oublie certainement.

Je souhaite également remercier des personnes rencontrées au cours de cette thèse, les amis des JED et des Olympiades, Maxime, une personne remarquable, avec qui j'ai enseigné, Cécile, Laurie-Anne, Léo et d'autres étudiants rencontrés au cours de meetings. Merci à l'équipe de Romain qui m'accueillera bientôt en post-doc, pour la journée formidable à Pasteur.

Merci également à Caroline Médioni et Véronique Van De Bor pour mon comité de thèse qui s'est avéré être un réel point de re-départ dans mon projet en stimulant mon envie et ma confiance pour avancer.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans mes parents. Je vous remercie de m'avoir donnée cette opportunité, de m'avoir toujours suivie dans mes choix, d'avoir accepté tous mes caprices, de me soutenir toujours quoi qu'il arrive, d'être toujours là, à n'importe quelle heure, à l'écoute, à mon service. Au-delà des études que vous m'avez payées, de cet enfant que j'ai eu et que vous prenez souvent en charge lorsque je dois être au labo, en congrès, écrire... vous êtes mes confidents, ceux auprès de qui je peux craquer, je peux me défouler. Ceux qui vont toujours savoir quoi faire pour me remonter le moral, qui auront toujours une petite attention, un petit mot, toujours du temps à me consacrer. Je vous remercie aussi pour la culture et l'ouverture d'esprit que vous m'avez transmise, même si je suis encore loin du compte. Merci tout simplement d'être mes parents !

Enfin, mon petit garçon, mon Tatinou, je te remercie ! Ce n'est pas toujours facile d'avoir une maman qui doit écrire une thèse, partir en congrès, qui doit faire une manip le week-end, qui rentre tard, fatiguée, énervée parce que la manip n'a pas marché ! Je te remercie de supporter ça, de m'accompagner parfois trier des mouches, de me faire répéter mes topos en me mettant des raisins en plastique dans la bouche, de me dessiner des follicules, je te remercie de me dire "bonne chance pour ton travail !" avec un gros bisou chaque matin. Je te remercie de me donner autant de force, autant d'amour ! Tu es ma plus belle réussite ! Je t'aime très très fort, mon Augustin !

Résumé

L'élongation du follicule ovarien de *Drosophila melanogaster* constitue un modèle élégant de morphogenèse tissulaire impliquant la polarisation planaire basale de l'épithélium folliculaire dépendante de Fat2. Celle-ci induit une rotation des follicules qui participe à l'orientation polarisée des fibres d'actine basales et permet une sécrétion des fibrilles de matrice extracellulaire (MEC). Ces structures formeraient un corset moléculaire contraignant la croissance médio-latérale du follicule et favorisant ainsi son élongation selon l'axe antéro-postérieur. Cependant, les relations entre les fibrilles de MEC et les fibres d'actine-F ne sont pas connues. Nous avons identifié un défaut d'élongation chez les mutants *dystrophine* (*Dys*) et *dystroglycan* (*Dg*). *Dys* et *Dg* forment un complexe transmembranaire interagissant avec l'actine-F et la MEC, et sont impliqués dans des maladies génétiques neuromusculaires telles que la myopathie de Duchenne. J'ai identifié deux fonctions nouvelles du complexe *Dys/Dg* : il n'est pas impliqué dans la rotation mais s'avère indispensable au dépôt des fibrilles polarisées de MEC et est également requis, tardivement, pour orienter les fibres d'actine-F. J'ai, par ailleurs, révélé que ces deux fonctions successives sont interdépendantes, suggérant que *Dys/Dg* emploie les fibrilles de MEC comme trame pour orienter les fibres d'actine-F. Des résultats préliminaires d'une étude structure-fonction de *Dys* ont également révélé une dimérisation de la protéine, ainsi qu'une interaction physique avec des acteurs du trafic cellulaire. L'ensemble de ces résultats amènent une vision nouvelle de l'organisation de l'adhésion cellule/MEC orchestrée par le complexe *Dys/Dg* et conduisent à une appréhension différente de son rôle, notamment en contexte pathologique.

Mots-clés : adhésion cellule/matrice extracellulaire, fibres d'actine-F, dystrophine, dystroglycan, morphogenèse tissulaire

Abstract

The elongation of the *Drosophila melanogaster* ovarian follicle offers a nice model of tissue morphogenesis involving the extracellular matrix (ECM). Following a fat2-dependent planar polarization of the basal domain of the epithelial follicular cells, follicles undergo rotations that allow the polarized secretion of ECM fibrils and participate in the orientation of F-actin stress fibers. ECM fibrils and stress fibers are proposed to act as a molecular corset, constraining the medio-lateral growth of the follicle and so promoting its elongation. However, the relationships between these fibrils and stress fibers are unclear. We found that Dystrophin (*Dys*) and Dystroglycan (*Dg*), which form a transmembrane complex interacting with F-actin and ECM, are involved in follicle elongation. They are implicated in genetics neuromuscular degenerative diseases as Duchenne Myopathy Disorder. I have found that they are not required for rotation but for ECM fibril deposition. Moreover, they orient in a cell autonomous manner F-actin fibers at late stages and this function also relies on the previous ECM fibril deposition, indicating two successive and interdependent functions of *Dys/Dg* complex. Moreover, preliminary results from a *Dys* structure-function study revealed a dimerization of the protein and we also identified a direct interaction between *Dys* and cell traffic actors. Together, our data show *Dys/Dg* complex works as a critical organizer of the basal domain of the cells, acting on both F-actin and ECM, and suggest that ECM fibrils act as a template for F-actin fiber orientation.

Keywords: cell/matrix adhesion, F-actin fibers, dystrophin, dystroglycan, tissue morphogenesis

Table des matières

Introduction Bibliographique	20
I-Morphogenèse – élongation tissulaire	22
A) Introduction générale.....	22
B) Les épithéliums	22
1. Structure générale	22
2. Matrice extracellulaire	22
3. Adhésion cellules - matrice extracellulaire	24
C) Morphogenèse épithéliale.....	26
1. Les signaux : gradient de morphogène et polarité planaire	26
a- Les morphogènes	26
b- Les voies polarité planaire	28
2. Origine moléculaire des forces	30
a- Le cytosquelette d'actine	30
b- Le moteur moléculaire, la myosine II	32
c- Les jonctions d'adhérence.....	34
3. Comportements cellulaires associés à l'élongation.....	34
II- Elongation tissulaire du follicule ovarien	36
A) Structure et développement du follicule ovarien	36
1. L'ovogenèse chez <i>Drosophila melanogaster</i> : développement du follicule ovarien	36
2. Le follicule ovarien de drosophile	36
3. Du germarium au follicule mature : description des stades du développement	38
a- Germarium	38
b- Stades 1 à 3.....	40
c- Stades 4 à 8.....	40
d- Stades 9 à 10B	42
e- Stades 11 à 14.....	42
B) Elongation du follicule ovarien chez la drosophile.....	44
1. Phase I : l'élongation précoce	44
a- La voie Jak-Stat oriente l'élongation précoce du follicule.....	44
b- Etablissement d'un gradient de contractions apicales.....	46
c- Comportements cellulaires associés à l'élongation précoce	46
2. Seconde phase d'élongation.....	46
a- Le signal : mise en place d'une polarité planaire basale	46
a1 Fat2 contrôle l'établissement de la polarité planaire basale.....	46
*Fat2 contrôle la PCP basale dans l'épithélium folliculaire.....	48
*Fat2 agit sur l'orientation des microtubules	48

*Fat2 contrôle la mise en place des protrusions d'actine	50
* Une voie de polarité planaire Fat2/Lar ?	50
a2 Relation entre Fat2 et la migration collective des cellules folliculaires.....	52
a3 Evénements induits par la rotation.....	54
*Alignement des fibres d'actine	54
*Sécrétion polarisée de matrice extracellulaire	56
a4 Conclusion.....	60
b-La force générant l'élongation: le modèle du corset moléculaire.....	60
b1 Dynamique et fonction des fibres de stress	62
*Etablissement et maintien des fibres d'actine : le rôle des intégrines.....	62
*Oscillations basales	62
*Orientation tardive des fibres d'actine.....	64
b2 Impact de la MEC sur l'élongation	66
*Les fibrilles de MEC agissent-elles comme corset moléculaire ?.....	66
*La rigidité de la MEC joue-t-elle un rôle dans l'élongation du follicule ?	68
b3 Conclusion.....	70
c- Comportements cellulaires associés à l'élongation tardive	70
III Le complexe Dystrophine/Dystroglycan	72
A) Description du complexe.....	72
1. La dystrophine.....	72
2. Le dystroglycan	72
3. Le complexe DGC	74
4. Dystrophine et Dystroglycan et pathologies associées	74
B) La dystrophine chez la drosophile.....	76
C) L'isoforme courte de la dystrophine, Dp116.....	80
Préambule	84
Résultats.....	90
I Article Scientifique : Oriented ECM fibrils contribute to tissue elongation by promoting F-actin planar polarization via the Dystrophin-Dystroglycan complex.....	92
II Localisation de la dystrophine dans le follicule ovarien de drosophile	132
A) La dystrophine est planaire polarisée pendant la phase de rotation.....	132
B) Une relation complexe entre dystrophine et cytosquelette.....	134
1. La polarisation planaire de la dystrophine est-elle dépendante de Fat2 ?	134
2. La polarisation planaire de la dystrophine implique-t-elle l'actine?	134
3. Relation entre orientation des fibres d'actine et polarisation planaire de la Dystrophine	134
4. Les microtubules sont-ils impliqués dans la polarisation planaire de la Dystrophine ?	136

C) La MEC est-elle nécessaire à la localisation basale planaire polarisée de la Dystrophine ?	136
D) Localisation de la Dystrophine en phase tardive.....	138
III- Etude structure-fonction de la Dystrophine : étude de l'isoforme courte, Dp116.....	142
A) L'expression de l'isoforme courte de Dystrophine, Dp116, dans le follicule ovarien de drosophile <i>Dys</i> sauve-t-elle son élongation ?.....	142
1. Dystrophine et Dp116 interagissent avec l'exocyste.....	142
2. Une interaction Dystrophine-exocyste est-elle requise pour le dépôt des fibrilles de MEC ?	142
B) Etude de la transcomplémentation entre <i>Dys</i> ^{E17} et Dp116 : résultats préliminaires..	146
Discussion	150
I- Implication indirecte des fibrilles de matrice extracellulaire dans le corset moléculaire..	152
A) Les fibrilles de matrice extracellulaire agissent tardivement et indirectement sur l'allongement du follicule.....	152
B) Les fibrilles de matrice extracellulaire sont requises pour l'orientation tardive des fibres d'actine constituant la phase tardive de l'élongation du follicule.....	154
II- Fonctions du complexe <i>Dys/Dg</i> dans le follicule ovarien de <i>Drosophile</i>.....	156
A) Le complexe <i>Dys/Dg</i> participe à l'organisation de la matrice extracellulaire en promouvant le dépôt de fibrilles polarisées de matrice	156
B) Le complexe <i>Dys/Dg</i> participe à l'orientation des fibres d'actine.....	158
1. Interaction génétique entre <i>Fat2</i> et Dystrophine.....	158
2. Le complexe <i>Dys/Dg</i> contrôlerait une voie de PCP.....	160
3. Le complexe <i>Dys/Dg</i> formerait des projections entre les fibrilles de MEC et l'extrémité des fibres d'actine pour orienter ces dernières	160
C) Transcomplémentation entre l'extrémité Cter et les répétitions spectrines de dystrophine	162
III-Conclusion	164
Références bibliographiques.....	168

Abréviations

Abi : Abelson Interacting Protein
Actine-F : Actine-Filamenteuse
AFM : Atomic Force Microscopy
AP : Antéro-Postérieur
Arp : Actin related protein
BMD : Becker Myopathy Disorder
Col IV : Collagène IV
Crag : calmodulin binding protein related to a Rab3 GDP/GTP exchange protein
Db : dystrobrévine
Dg : dystroglycan
DGC : Dystrophin Glycoprotein Complex
Dia : Diaphanous
Dgo : Diego
DMD : Duchenne Myopathy Disorder
DRP2 : Dystrophin Related Protein 2
Ds : Dachsous
Dys: dystrophine
Ehbp1 : EH-domain Binding Protein 1
Ena : enabled
Fj : Four-jointed
Ft : Fat
Fz : Frizzled
GFP : Green Fluorescent Protein
Int : intégrines
kDa : kiloDalton
Kug : kugelei
Lan : laminine
Lar : Leukocyte antigen related
MEC : Matrice ExtraCellulaire
msn : misshapen
Myo II : myosine II
mys : myosphéroïd
nNOS : neural Neutric Oxyde Synthase
Pak : p21-activated kinase
PBS : Phosphate Buffer Saline
Pcan : perlecan
PCP : polarité cellulaire planaire
PFA : ParaFormAldéhyde
Plod : pro-collagen lysyl hydroxylase
RABIF : RAB Interacting Factor
RFP : Red Fluorescent Protein
Syn : syntrophines
Utrn : utrophine

Vang : Van Gogh

Vkg : Viking

WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE : WASP family verprolin-homologous protein

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Introduction bibliographique

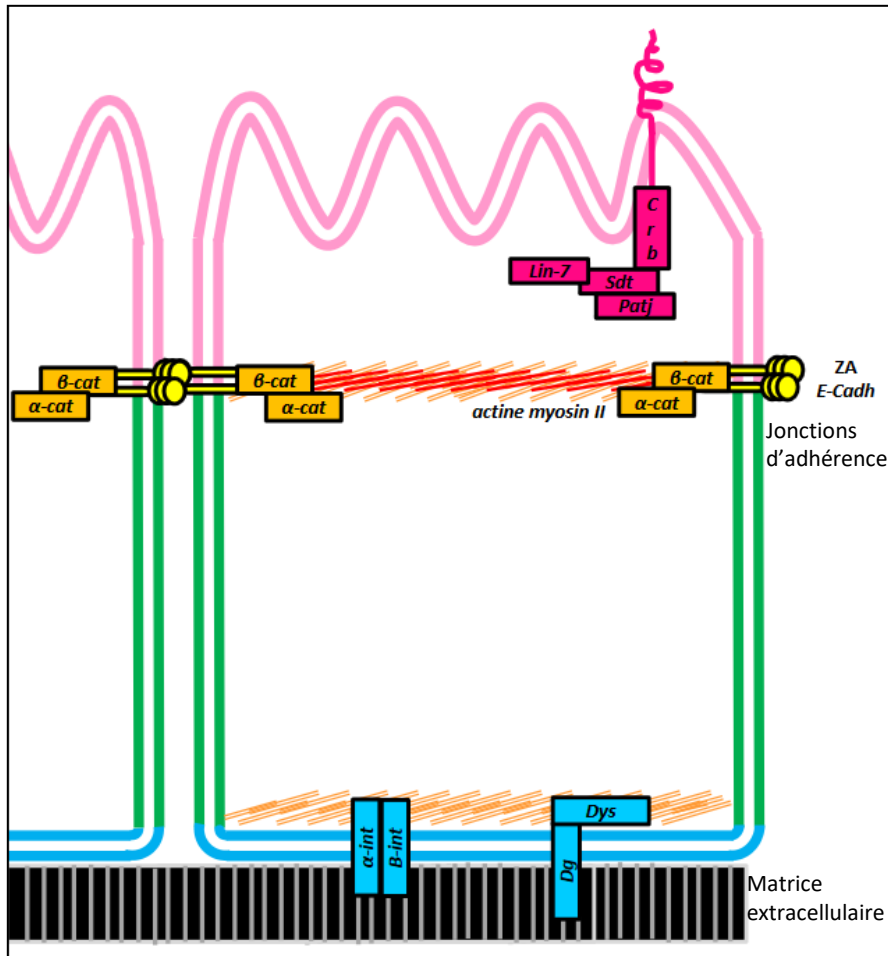


Figure 1 : Schéma d'un épithélium chez la drosophile : polarité apico-basale.

Les cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale avec un domaine basal (en bleu) en contact avec la matrice extracellulaire avec laquelle elles interagissent via des complexes transmembranaires tels que les intégrines et le complexe dystrophine-dystroglycan. Ces complexes lient le cytosquelette (en orange). Le domaine apical (en rose) est notamment défini par la présence du complexe crumbs (Crb)-stardust(Sdt)-patj. Les cellules sont étroitement liées par des jonctions cellulaires impliquant les E-cadhérines, α-caténine, β-caténine qui lient le cytosquelette (orange).

I-Morphogénèse – élongation tissulaire

Le monde vivant offre une riche diversité d'architectures de tissus, d'organes et d'organismes. Mais, bien qu'elles puissent être appréciées pour leur esthétisme, ces innombrables formes leur confèrent, avant tout, une aptitude fonctionnelle.

A) Introduction générale

L'appréhension de la physiologie des organismes et du fonctionnement des tissus et des organes requiert une description de leurs formes et structures dont l'acquisition s'effectue au cours du développement. La morphogénèse constitue l'ensemble des mécanismes participant à la détermination de ces architectures. Elle implique une coordination de multiples processus tels que la migration cellulaire, des réarrangements cellulaires, des changements morphologiques des cellules.

B) Les épithéliums

1. Structure générale

Les épithéliums sont des tissus composés d'une couche de cellules juxtaposées et étroitement liées par des jonctions. Ils constituent des barrières physiologiques et participent à la régulation des échanges entre les deux compartiments ainsi séparés. Les cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale définie par une répartition asymétrique de complexes protéiques définissant trois domaines corticaux exclusifs (St Johnston et Ahringer, 2010 ; fig 1). Le domaine basal se trouve au contact de la matrice extracellulaire (MEC) et est déterminé par la présence d'intégrines et de dystroglycan (Yurchenco, 2011). Le domaine apical, situé du côté opposé, est défini par la présence des complexes Crumbs/Stardust/Patj et PAR6/PAR3/aPKC (Knust *et al*, 1993 ; Bachmann *et al*, 2001). Les membranes latérales sont, quant à elles, impliquées dans les jonctions d'adhérence entre les cellules épithéliales, via la présence de molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine, qui assurent la stabilisation des contacts cellulaires. Cette polarité apico-basale est essentielle au maintien de l'intégrité du tissu épithélial et à la régulation des échanges entre les cellules ou entre la cellule et son environnement.

2. Matrice extracellulaire

Les épithéliums sont étroitement liés à la MEC, ce qui favorise leur rôle de barrière semi-perméable. Ils sont soutenus par la lame basale sous-jacente qui constitue une couche de la MEC. Celle-ci est composée de protéines fibreuses telles que le collagène IV, spécifique des lames basales épithéliales, de protéines de liaison et de polysaccharides complexes : des protéoglycanes tels que le perlecan, et des glycoprotéines adhérentes telles que la laminine. Ces constituants sont sécrétés, au moins en partie, par les cellules épithéliales. Ils interagissent les uns avec les autres et ce, de façon très spécifique, pour former un réseau fibrillaire (Hohenester et Yurchenco, 2013). Les laminines

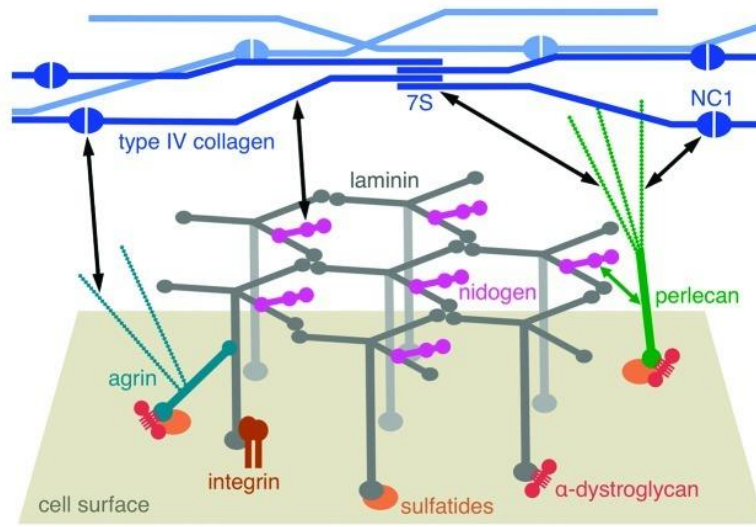


Figure 2 : Schéma de la structure des lames basales. Un réseau de laminines est ancré à la membrane cellulaire via des interactions avec des protéines transmembranaires (intégrines, dystroglycan). Un réseau de molécules de collagène IV est formé. Des interconnexions entre le réseau de laminines et celui de collagène IV sont réalisées par des molécules d'héparanes sulfates telles que le perlecan. D'après Hohenester et Yurchenco, 2013

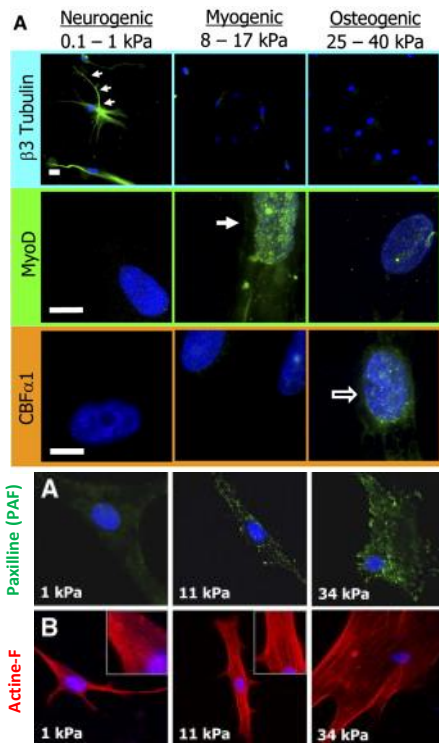


Figure 3 : Différenciation de cellules souches mésenchymateuses en culture selon la rigidité du support matriciel.

Les cellules souches mésenchymateuses sont dites naïves : elles sont indifférenciées au départ. Elles sont toutes mises en culture dans un milieu de culture classique, sans adjonction de substance visant à orienter la différenciation des cellules. Seule la rigidité du support varie d'un échantillon à l'autre. Les adhésions cellulaires au support matriciel (paxilline) et l'organisation du cytosquelette d'actine augmentent avec la rigidité du support. Le marqueur neuronal $\beta 3$ tubuline n'est exprimé que lorsque la matrice est souple. Le facteur de transcription spécifique du muscle MyoD1 est exprimé par les cellules en culture sur matrice de rigidité moyenne. Enfin, sur un support plus rigide, une identité ostéoblastique est détectée par la présence du facteur CBF $\alpha 1$. D'après Engler *et al*, 2006.

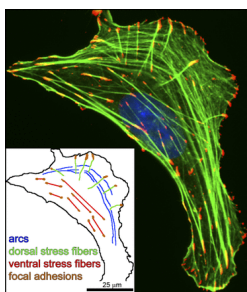


Figure 4 : Fibres de stress. Cellules d'ostéosarcome humaine en culture. Les fibres d'actine sont marquées par de la phalloïdine (en vert) et les points d'adhésion focaux sont révélés par immunomarquage (en rouge). Le noyau cellulaire est visualisé grâce au DAPI (en bleu). Les fibres d'actine sont tendues et plus ou moins alignées. Elles sont maintenues à leurs extrémités par les points d'adhésion focaux. D'après Burridge et Wittchen, 2013).

interagissent avec des récepteurs membranaires tels que les intégrines ou le dystroglycan et s'auto-assemblent en premier lieu pour former les fondations de la lame basale. Cet ancrage initial permet l'accumulation des autres constituants de la MEC : un réseau secondaire formé par le collagène IV est adjoint au réseau de laminines auquel il est connecté grâce aux molécules de Pcan (fig 2). Les macromolécules constituant la MEC présentent de nombreuses isoformes et subissent diverses modifications post-traductionnelles dont des glycosylations. Chaque MEC a ainsi une composition biochimique différente et, en conséquence, des propriétés biophysiques différentes qui influencent son architecture et sa dynamique. Les molécules de la MEC peuvent également être dégradées par des enzymes protéolytiques telles que les cathepsines et surtout les métalloprotéases. La MEC agit sur le comportement des cellules sus-jacentes et est nécessaire à la physiologie et à la dynamique cellulaire, notamment durant la morphogenèse, en participant à l'élasticité du tissu, l'adhésion des cellules, la migration cellulaire, la différenciation cellulaire, la rétention de facteurs de croissance... Les relations entre la MEC et les cellules impliquent souvent des phénomènes de mécanotransduction. Par exemple, la rigidité de la MEC influence la différenciation cellulaire ; ainsi des cellules souches mésenchymateuses en culture sur une MEC souple et lâche émettent des fibres d'actine fines tandis que les connexions et les fibres d'actine sont beaucoup plus importantes et les cellules, plus étalées sur un support rigide comme le verre. Selon, la rigidité de la MEC, ces cellules se différencient en neuroblastes, myoblastes ou ostéoblastes (Engler *et al*, 2006 ; fig 3).

3. Adhésion cellules - matrice extracellulaire

Les tissus épithéliaux sont étroitement liés à la MEC via des complexes transmembranaires dits "points d'adhésion focale" (PAFs), tels que les intégrines, qui établissent ainsi un lien physique direct entre MEC et cytosquelette. De larges fibres d'actine associées à la myosine II, dites fibres de stress, ont été visualisées pour la première fois en 1924 sur des cellules en culture (Lewis et Lewis, 1924). Elles sont ancrées à la MEC via les PAFs qui leur permettent de répondre aux signaux extracellulaires et d'agir notamment comme mécanosenseurs (Burrige et Wittchen, 2013 ; fig 4). Ces interactions dynamiques avec le réseau contractile d'actomyosine, en particulier, permettent à la MEC de jouer, outre son rôle de soutien mécanique, un rôle fondamental au cours de la morphogenèse, en guidant notamment la migration des cellules (Miner et Yurchenco, 2004). En effet, pour se mouvoir, une cellule doit se désolidariser de la MEC soit par modification de la composition de celle-ci, soit en abaissant le niveau d'accumulation des complexes d'adhésion à cette MEC. Ces interactions bidirectionnelles entre cellule et MEC agissent ainsi comme des signaux susceptibles de réguler la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaires contrôlant ainsi le comportement et le devenir des cellules. Une perturbation de ces interfaces

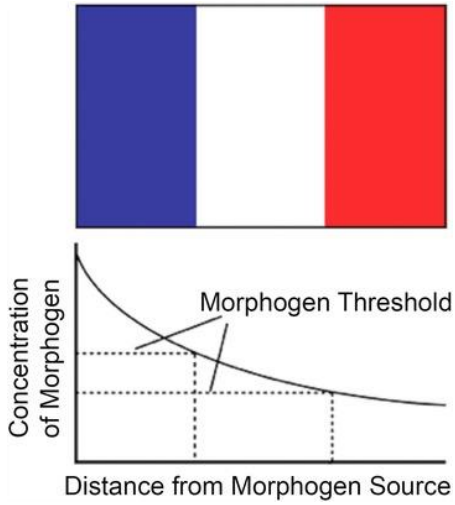


Figure 5 : Schéma du “french flag model” de Wolpert, 1969

Gradient de diffusion d’un morphogène et établissement de 3 zones : une très concentrée proche de la source de production du morphogène (zone bleue), une de concentration moyenne (en blanc) et une zone éloignée où la teneur en morphogènes est faible (en rouge).

MEC/cellule intervient fréquemment dans les cancers pour favoriser la croissance tumorale et promouvoir la migration des cellules à l'origine des métastases (Kelley *et al*, 2014).

C) Morphogenèse épithéliale

Les épithéliums sont constamment remodelés au cours du développement. Ces changements morphologiques impliquent des réorganisations et des changements de forme des cellules (Lecuit et Le Goff, 2007). Par exemple, lorsqu'il se développe, l'épithélium subit une prolifération de cellules qui doivent alors réadapter leurs contacts, voire se déplacer les unes par rapport aux autres, notamment dans le cas des intercalations cellulaires menant à l'extension d'un tissu comme la bandelette germinative de l'embryon de drosophile (Levayer et Lecuit, 2012). Des événements de migrations cellulaires interviennent également ; par exemple, chez l'embryon de xénope, les cellules de la crête neurale effectuent une migration collective (Barriga *et al*, 2018). Enfin, les cellules épithéliales sont susceptibles de subir des modifications morphologiques comme la constriction d'un de leur pôle pour mener à une invagination du tissu qui survient lors de la gastrulation chez les Vertébrés et les ascidies, par exemple (Ramkumar *et al*, 2016 ; Sherrard *et al*, 2010).

Tous ces événements morphogénétiques, bien que variés, mettent en jeu des mécanismes intracellulaires impliquant le cytosquelette des cellules épithéliales. Un signal biochimique constitue l'information qui va guider et orienter la géométrie et la dynamique des cellules. Ce signal biochimique est transformé en énergie mécanique par des moteurs moléculaires qui vont alors déformer les molécules du cytosquelette. Il en résulte une réponse cellulaire avec une orientation et une coordination des comportements, dans le temps et dans l'espace, menant à l'acquisition de la forme du tissu.

1. Les signaux : gradient de morphogène et polarité planaire

a- Les morphogènes

Les morphogènes ont été initialement décrits comme des molécules de signalisation secrétées par des cellules sources qui diffusent dans l'espace extracellulaire en formant un gradient de concentration. Des domaines tissulaires sont ainsi définis. Wolpert propose en 1969, le modèle du "French flag" avec 3 zones : un groupe de cellules où la concentration en morphogène est élevée, une intermédiaire et enfin, une zone de concentration faible de morphogène (Wolpert, 1969 ; fig 5). Le gradient de morphogène ainsi établi constitue un patron définissant des zones tissulaires, chez l'embryon, aux devenir différents. Le gradient de morphogène est régulé par 3 événements : la synthèse des morphogènes, leur diffusion et leur dégradation.

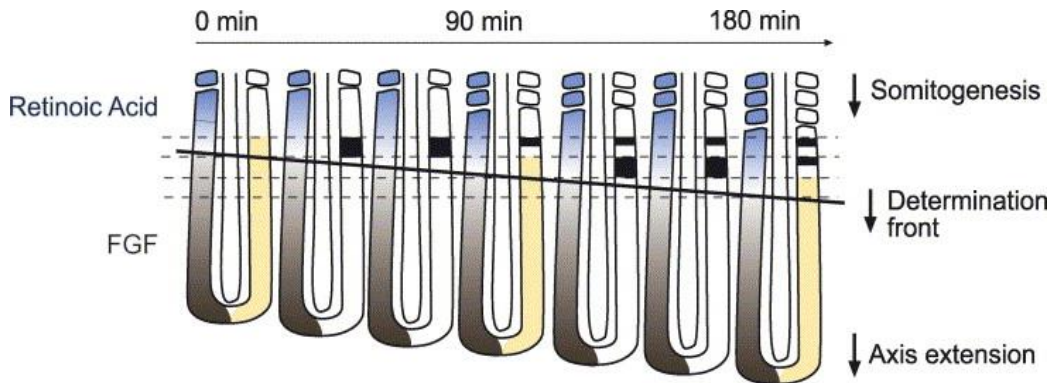


Figure 6 : Modèle de segmentation de l'embryon de poulet. Gradients antagonistes d'acide rétinoïque en bleu et de FGF en gris définissant le front de détermination. La segmentation s'effectue progressivement au cours du temps avec expression de gènes de segmentations en noir et individualisation des somites. D'après Pourquoié, 2004.

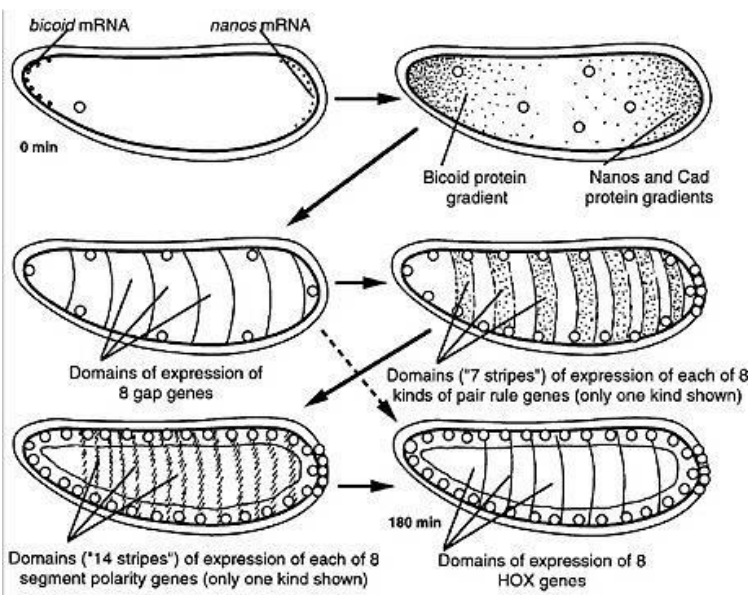


Figure 7 : Diffusion de morphogènes maternels menant à la segmentation de l'embryon de drosophile. Nanos et bicoid sont exprimés chacun à un pôle de l'œuf. Les protéines diffusent dans l'œuf qui constitue un syncytium engendrant des gradients protéiques antagonistes. Les gènes gap vont alors être activés sur 7 segments, puis 14 domaines stripes vont être définis... jusqu'à aboutir à la segmentation finale de la larve. D'après Nüsslein-Volhard *et al*, 1991.

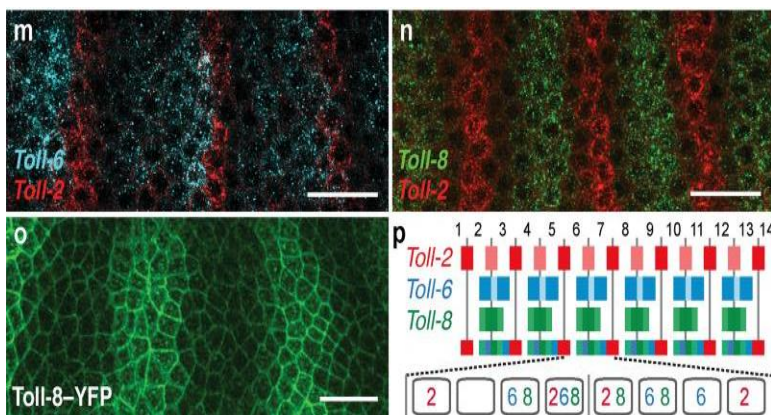


Figure 8 : Profil d'expression des récepteurs Toll dans l'embryon de drosophile. Dans chaque segment, les récepteurs Toll2, Toll6 et Toll8 s'expriment graduellement et c'est la combinaison des trois qui définit des interfaces différentes induisant la polarisation planaire du tissu. D'après Paré *et al*, 2014.

Exemples de gradients de morphogènes orientant une élongation

Lors de la somitogénèse chez le poulet, un gradient antéro-postérieur d'ARNm de Fgf8 et un gradient antagoniste d'acide rétinoïque sont nécessaires à la segmentation et à la détermination de l'axe d'extension de l'embryon (Pourquié, 2004 ; fig 6). Dans le follicule ovarien chez la drosophile, un gradient Jak-Stat est établi de façon précoce et joue un rôle important dans l'élongation folliculaire (Alegot *et al*, 2018). Enfin, des gradients de morphogènes maternels, tels que bicoïd et nanos, vont conduire à la segmentation de l'embryon (Nüsslein-Volhard et Wieschaus, 1980 ; fig 7). Ces segments vont à leur tour déterminer une expression graduelle en bandes de 3 récepteurs Toll : Toll2, Toll6 et Toll8. La combinaison de ces trois protéines induit une polarité planaire qui gouverne l'extension de la bandelette germinative (Paré *et al*, 2014 ; fig 8).

b- Les voies polarité planaire

Si les épithéliums présentent une polarité apico-basale, une polarisation perpendiculaire à cet axe apico-basal peut être nécessaire pour coordonner les comportements de chaque cellule et définir ainsi l'orientation et la géométrie du tissu (Zallen *et al*, 2007). Cette polarité s'établit dans le plan du tissu et est appelée polarité cellulaire planaire (PCP). Elle est essentielle à la morphogénèse et, *in fine*, à la fonction correcte du tissu.

Les voies de PCP ont d'abord été identifiées et largement étudiées chez la drosophile : dans l'aile, l'œil, la cuticule de l'abdomen ou dans l'épiderme ventral de l'embryon. Mais elles sont présentes chez tous les animaux et contribuent à la riche variété des processus morphogénétiques. Les protéines et les mécanismes de PCP sont hautement conservés dans le règne animal. Chez les vertébrés, la signalisation PCP est mise en jeu, par exemple, dans l'extension convergente durant l'élongation antéro-postérieure, le positionnement de cils sensoriels et moteurs, la guidance des axones, la polarisation de l'épiderme (Wang *et al*, 2006 ; Wallingford, 2012). Des défauts de PCP sont à l'origine de malformations et de pathologies comme la non fermeture du tube neural, des malformations cardiaques, la surdité (Montcouquiol *et al*, 2003; Simons et Mlodzik, 2008 ; Matis et Axelrod, 2013) ou encore le cancer puisque la PCP peut influencer la migration des cellules malignes durant l'invasion et les métastases (Luga *et al*, 2012).

La communication locale entre cellules voisines est essentielle pour la transmission du signal de PCP mais doit être également transmise dans le tissu dans sa globalité pour orienter des événements morphogénétiques collectifs tels que l'orientation de structures subcellulaires, des réarrangements cellulaires orientés et/ou la migration collective de cellules. Cette propagation à distance du signal PCP fait intervenir des gradients d'expression de gènes, des gradients de sécrétion de protéines ou encore des tensions anisotropiques (Aigouy *et al*, 2010 ; Chien *et al*, 2015). Ces divers signaux vont réguler la dynamique et la distribution subcellulaire des protéines de PCP qui

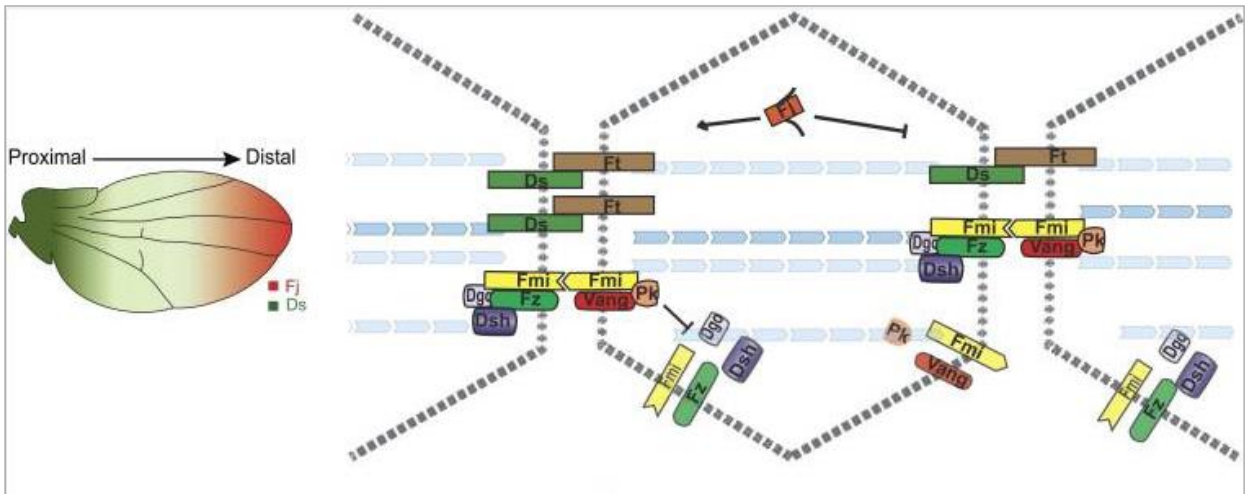


Figure 9 : Schéma d'établissement de polarité planaire dans l'aile de drosophile. A gauche, gradients antagonistes de Dachshous (Ds) et de Four-jointed (Fj) sur l'axe proximo-distal de l'aile. Localisation asymétrique des modules transmembranaires de PCP : interactions entre cellules voisines et répulsions dans une même cellule. D'après Matis et Axelrod, 2013.

s'assemblent dans des complexes transmembranaires distincts effectuant des interactions intercellulaires, mais s'excluant de façon mutuelle à des pôles opposés dans une même cellule. Ainsi, ces interactions entre cellules voisines et la distribution asymétrique des complexes protéiques de PCP sont transmises de cellule à cellule.

Deux voies de PCP classiques ont été décrites. D'une part, la voie globale constituée par le complexe Fat/Dachsous/Four-jointed (Ft/Ds/Fj) est chargée de transmettre le signal à distance, et dirige ainsi l'axe de polarisation du tissu notamment dans l'aile ou l'œil de la drosophile. Ds et Ft sont exprimés selon des gradients opposés dans le tissu et Fj module l'interaction de Ft/Ds (Reddy et Irvine, 2008 ; Simon *et al*, 2010 ; fig 9). Leurs homologues sont retrouvés chez les Vertébrés. D'autre part, les modules centraux agissent plus localement et ségrègent dans deux complexes distincts séparés spatialement dans une cellule. Ils sont constitués de six protéines : Frizzled (Fz), Dishevelled (Dsh), Diego (Dgo), Van Gogh (Vang), Prickle (Pk) et Flamingo (Fmi) qui communiquent via des interactions entre cellules voisines pour coordonner leur polarisation et ainsi amplifier l'asymétrie d'une cellule à sa voisine (Goodrich et Strutt, 2011 ; fig 9). Les microtubules interviendraient dans la distribution asymétrique de ces protéines ; ils sont orientés de façon planaire polarisée et interagissent via leur extrémité "plus" avec les protéines Fz et Dsh (Vladar *et al*, 2012). Une communication entre les modules globaux et les modules centraux serait nécessaire : des modules effecteurs, tissu-spécifiques, vont médier la polarisation du tissu en intégrant les signaux des modules globaux et des modules centraux (Matis et Axelrod, 2013).

D'autres voies de PCP existent. Par exemple, chez la drosophile, une voie impliquant Fat2 organise le domaine basal de l'épithélium folliculaire ovarien et est indispensable à son élongation (Gutzeit *et al*, 1991 ; Viktorinová *et al*, 2009). Aussi, les récepteurs Toll répartis graduellement sur des bandes transversales dans l'embryon de drosophile agissent ensemble pour établir une PCP d'accumulation de MyoII aux jonctions DV des cellules (Paré *et al*, 2014).

2. Origine moléculaire des forces

Les forces à l'origine des mécanismes morphogénétiques sont typiquement générées par des moteurs moléculaires puis transmises dans la cellule par le cytosquelette, et enfin, propagées aux cellules avoisinantes via les jonctions d'adhérence et les complexes de liaison à la MEC.

a- Le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette est un réseau protéique formé de filaments contractiles, les filaments d'actine et les microtubules. Ces structures sont formées par des processus de polymérisation/dépolymérisation ATP-dépendantes.

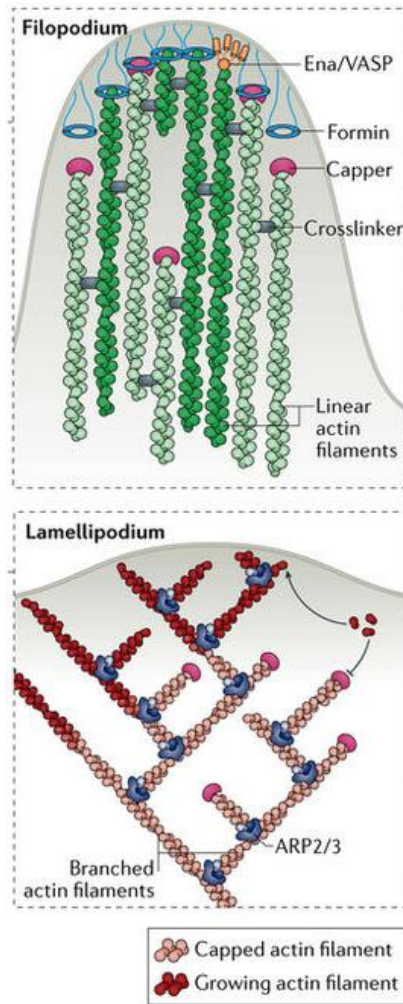


Figure 10 : Schémas d'un filopode et d'un lamellipode. Filaments d'actine linéaires polymérisés par les formines et ena/VASP pour former le filopode. Filaments d'actine branchés, formés par Arp2/3 dans la structure du lamellipode. D'après Carlier et Shekhar, 2017

L'actine-F (filamenteuse) forme des filaments flexibles de structure hélicoïdale d'environ 10nm de diamètre. Ces filaments sont polarisés : ils présentent une extrémité positive par laquelle le filament se polymérise et s'allonge de façon rapide et, une extrémité négative qui correspond à l'extrémité d'initiation du filament dite aussi extrémité de polymérisation lente. La polymérisation de l'actine est contrôlée par de nombreuses protéines, dites nucléateurs de l'actine, comme les formines ou le complexe Arp2/3 (ARP pour Actin Related Protein).

Les formines forment des faisceaux contractiles d'actine présents au niveau des jonctions cellulaires, au pôle apical des cellules, pour assurer leur contractilité. Les faisceaux d'actine sont également retrouvés dans les filopodes des cellules en migration (fig 10). Ce sont aussi les constituants des fibres de stress. Celles-ci sont constituées de filaments d'actine reliés entre eux par des filaments de myosine qui, lorsqu'elle est activée, glisse sur les filaments d'actine et engendre leur contraction. Ces fibres de stress sont capables de se lier à la MEC via des complexes de liaison transmembranaires tels que les intégrines, permettant aux cellules de se mouvoir par traction sur la MEC.

Arp2/3 forme des réseaux branchés d'actine formant des extensions membranaires dynamiques, les lamellipodes, à l'origine des phénomènes de migration cellulaire (fig 10). Arp2/3 est ainsi fréquemment retrouvée localisée au front de migration des cellules. Au fur et à mesure de la migration cellulaire, une coordination successive de mécanismes de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine est nécessaire pour maintenir leur longueur constante par effet de "tapis roulant"; tandis qu'ils s'allongent au front de migration, ils se dépolymérisent à l'arrière. Arp2/3 est activé par des protéines de la famille WASP/WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein / WASP family verprolin-homologous protein) telles que SCAR (Ridley *et al*, 2003). WAVE interagit avec Ena/VASP qui sont des régulateurs de la dynamique de l'actine, retrouvés aux protrusions cellulaires pour favoriser la migration des cellules (Moeller *et al*, 2004 ; Cetera *et al*, 2014 ; Chen *et al*, 2014).

b- Le moteur moléculaire, la myosine II

La myosine II (MyoII) non musculaire est une protéine motrice constituée de deux chaînes lourdes et de quatre chaînes légères dont deux régulatrices. Elle est capable de se lier et de se déplacer le long des filaments d'actine engendrant leur contraction. MyoII provoque, par exemple, des oscillations anisotropiques favorisant les phénomènes d'intercalation cellulaire lors de l'extension de la bandelette germinative chez la drosophile (Rauzi et Lecuit, 2009). Des phénomènes d'oscillations apicales précoces et basales tardives impliquant MyoII surviennent également dans le

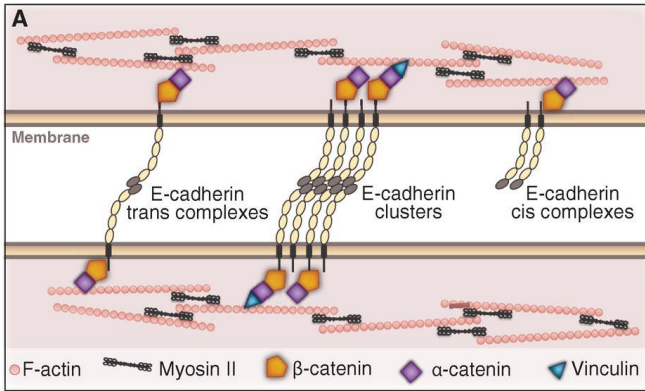


Figure 11 : Jonctions d'adhérence impliquant les E-cadhérines. Les E-cadhérines effectuent des interactions homophiliques dans l'espace intercellulaire. Elles lient les alpha-caténines et bêta-caténines qui interagissent avec le cytosquelette d'actine. D'après Guillot et Lecuit, 2013.

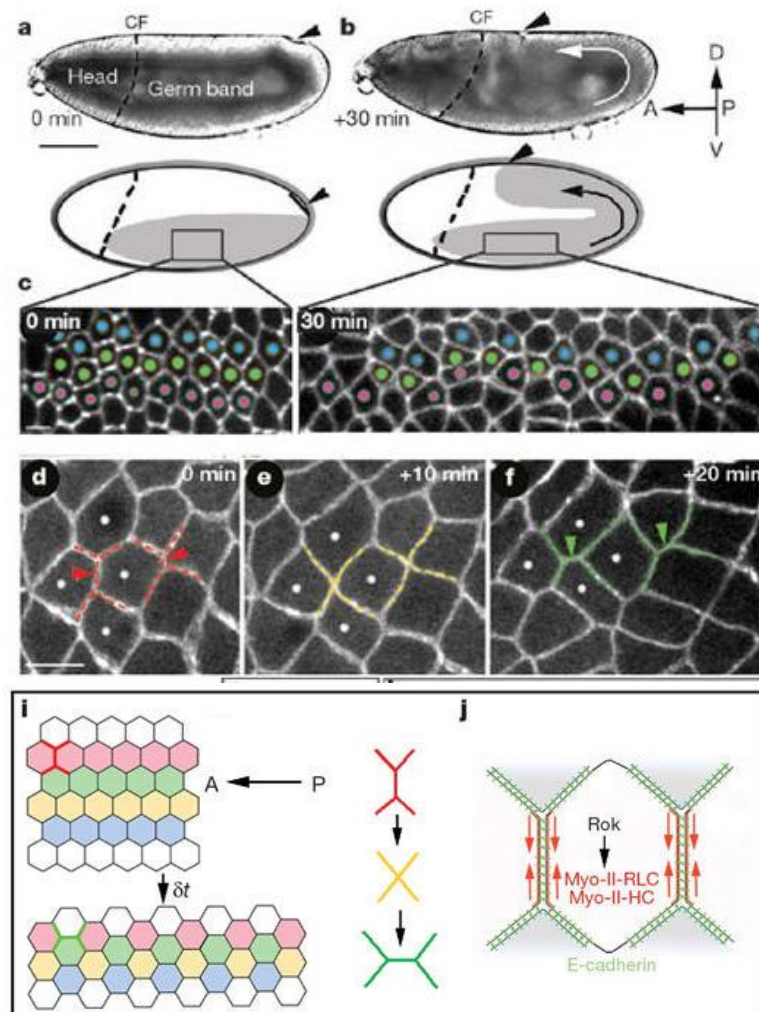


Figure 12 : Intercalations cellulaires lors de l'extension de la bandelette germinative chez l'embryon de drosophile. Contraction des jonctions cellulaires dorso-ventrales liées à une accumulation de myosine II et réadaptation des contacts cellulaires avec formation de jonctions orientées selon l'axe antéro-postérieur. D'après Bertet *et al*, 2004

follicule ovarien chez la drosophile et sont impliquées dans son élongation (He *et al*, 2010 ; Alegot *et al*, 2018).

La transmission des forces induites par le cytosquelette d'actomyosine aux cellules voisines implique les jonctions d'adhérence connectant les cellules les unes aux autres mais aussi les complexes d'adhésion à la MEC qui recouvre le tissu épithélial. Par exemple, lors du développement de la larve de xénope, la rigidité de la MEC constitue un signal mécanique transmis par le complexe intégrines-vinculine-taline au cytosquelette qui favorise la migration des cellules de la crête neurale (Barriga *et al*, 2018).

c- Les jonctions d'adhérence

Les jonctions cellulaires assurent la cohésion du tissu ; elles doivent maintenir les contacts cellulaires tout en autorisant leur plasticité nécessaire au remodelage du tissu en développement. Ces jonctions servent de points d'ancrage au cytosquelette. Lors de la contraction de celui-ci, la force générée induit ainsi une modification de la forme de la cellule, mais est également propagée aux cellules voisines via ces connections cellulaires adhérentes. La protéine majeure impliquée dans ces jonctions d'adhérence et la transmission de tension est l'E-cadhérine. Elle constitue des interactions homophiliques aux jonctions cellulaires (fig 11). Par ailleurs, elle interagit avec la β -caténine et l' α -caténine liant les filaments d'actine. Un remodelage de ces jonctions, notamment par modulation des taux d'E-cadhérine à la membrane par le contrôle de leur trafic cellulaire, est nécessaire pour le changement topologique des cellules ou leur réarrangement. Par exemple, lors de l'extension de la bandelette germinative, chez la drosophile, les cellules se réarrangent spatialement et les jonctions cellulaires subissent un remodelage polarisé : les jonctions parallèles à l'axe dorso-ventral (DV) rétrécissent et de nouvelles jonctions parallèles à l'axe antéro-postérieur (AP) se forment simultanément. La rétraction des jonctions DV est due à un enrichissement anisotrope de MyoII, corrélé à une diminution d'E-cadhérine, qui induit une anisotropie de tension (Rauzi *et al*, 2008 ; Levayer et Lecuit, 2008 ; fig 12). L'extension de la nouvelle jonction cellulaire implique, quant à elle, des impulsions de MyoII dans les cellules voisines qui exercent des forces tirant de part et d'autre de la jonction (Collinet *et al*, 2015).

3. Comportements cellulaires associés à l'élongation

En réponse à la force orientée par le gradient de morphogènes et/ou par un signal PCP, les cellules vont adopter un comportement particulier. Divers comportements cellulaires sont associés à l'élongation tissulaire. Des réarrangements cellulaires comme des intercalations cellulaires peuvent survenir. Ces événements sont impliqués dans des phénomènes d'élongation ou d'extension convergente. Par exemple, dans l'embryon de drosophile, la PCP de MyoII induite par les protéines



Figure 13 : Schéma des ovaires de *Drosophila melanogaster*. Chez la femelle, il y a deux ovaires, constitués chacun d'une quinzaine d'ovarioles dans lesquels les follicules se développent depuis le pôle antérieur, dans le germarium, vers le pôle postérieur où les follicules matures sont expulsés dans l'oviducte. Les follicules sont fécondés lors de leur transit dans l'oviducte grâce à la connexion avec la spermathèque et les oeufs sont ensuite pondus (photo de gauche). D'après Miller, 1950, The Internal Anatomy and Histology of the Imago of *Drosophila Melanogaster*.

Stage	1	2	3	4	5	6	7
Identification	reside in the region R3 of germarium (arrow)	karyosome not formed yet, similar sizes of oocyte and nurse cell	Karyosome (arrowhead) and endbody detectable in germinal vesicle	nurse cell nuclei has similar DNA amount and show five-blob phenotype	no five-blob phenotype, posterior nurse cells contain more DNA	follicle cells cease mitosis, equal nurse cell ploidy	more obviously elongated shape of egg chamber, higher nurse cell ploidy at posterior, no oocyte yolk visible
DAPI image							
Area (μm^2)	N/A	579<	579-970	970-2026	2026-4043	4043-4690	4690-6751
Time of Growth (h)	N/A	8	8	6	5	3	6
Stage	8	9	10a	10b	11		
Identification	oocyte yolk visible, still uniformed follicle cell layer	anterior follicle cells start to migrate, including border cell migration (arrowhead) and stretched cell flattening (arrow)	anterior follicle cells complete migration, including border cells' arrival at the anterior side of oocyte (arrow), oocyte takes half of egg chamber volume	centripetal follicle cells migrate towards the anterior of oocyte (arrow), oocyte still takes half of egg chamber volume	nurse cells begin dumping process and oocyte gets larger, taking more than half of egg chamber volume		
DAPI image							
Area (μm^2)	6751-9482	9482-20933	20933-50200		>50200		
Time of Growth (h)	6	6	6	4	0.5		
Stage	12	13	14				
Identification	nurse cells complete dumping process and 15 nurse cell nuclei remains at the anterior	dorsal filaments visible, some nurse cell nuclei remains at the anterior	dorsal filaments complete elongation, no nurse cell nuclei remains				
DAPI image							
Area (μm^2)	N/A	N/A	N/A				
Time of Growth (h)	2	1	>2				

Figure 14 : Identification des 14 stades du développement folliculaire ovarien chez *Drosophila melanogaster*, définis par Spradling *et al*, 1993. (d'après Jia *et al*, 2016)

Toll engendre une intercalation des cellules à l'origine de l'allongement antéro-postérieur de l'embryon (Paré *et al*, 2014). Chez l'embryon de poulet, le front d'extension défini par Fgf oriente les intercalations pour allonger le tissu (Pourquié *et al*, 2004). Les cellules peuvent également subir des changements morphologiques et s'étirer de façon anisotropique pour allonger le tissu. C'est le cas lors de la morphogénèse des glandes salivaires chez la drosophile (Bradley et Andrew, 2001). Chez la plante, une croissance dirigée des cellules est contrôlée par l'organisation des microtubules et liée à l'élasticité du réseau de cellulose (Bringmann *et al*, 2012). Des divisions cellulaires orientées induisent également une croissance dans un axe plutôt que dans l'autre et mènent à l'élongation d'un tissu. Ces phénomènes ont lieu lors de la formation des reins chez la souris (Saburi *et al*, 2008) ou lors de l'embryogenèse précoce chez le poisson zèbre (Campinho *et al*, 2013). Enfin, des migrations cellulaires peuvent également être associées à des processus d'élongation, comme dans le cas de l'extension convergente dans l'embryon de poulet (Bénazéraf et Pourquié, 2013).

II- Elongation tissulaire du follicule ovarien

A) Structure et développement du follicule ovarien

*1. L'ovogenèse chez *Drosophila melanogaster* : développement du follicule ovarien*

Chez la drosophile, les follicules ovariens se forment et se développent dans les ovaires de la femelle adulte. Chaque ovaire est constitué d'une quinzaine d'ovarioles renfermant des successions de follicules à des stades de maturité croissants (fig 13). Les follicules ovariens se forment, en antérieur, dans le germarium qui contient les cellules souches germinales et somatiques à l'origine des deux types cellulaires constituant les follicules, puis, évoluent vers l'oviducte, en postérieur, dans lequel les follicules matures sont expulsés pour être fécondés et pondus (King, 1970) (fig 13). Quatorze stades de développement ont été déterminés selon des caractères morphologiques tels que la taille du follicule, le comportement des cellules folliculaires et la maturité de l'ovocyte (Spradling *et al*, 1993 ; fig 14). Chaque ovariole est entouré d'une gaine musculaire. Celle-ci n'intervient pas dans les mécanismes mêmes d'élongation du follicule ovarien mais aurait néanmoins un impact sur son volume, et donc sa forme, en participant à l'influx de vitellus dans l'ovocyte (Andersen et Horne-Badovinac, 2016).

2. Le follicule ovarien de drosophile

Chaque follicule est constitué d'un cyste germinal de seize cellules dont l'une forme, au pôle postérieur, l'ovocyte, les autres constituant les cellules nourricières (Spradling *et al*, 1993). Ces cellules germinales sont entourées d'une monocouche de cellules d'origine somatique qui constitue l'épithélium folliculaire (fig 15). Les cellules de cet épithélium, dites cellules folliculaires, présentent un domaine apical au contact des cellules germinales et un domaine basal interagissant avec la MEC

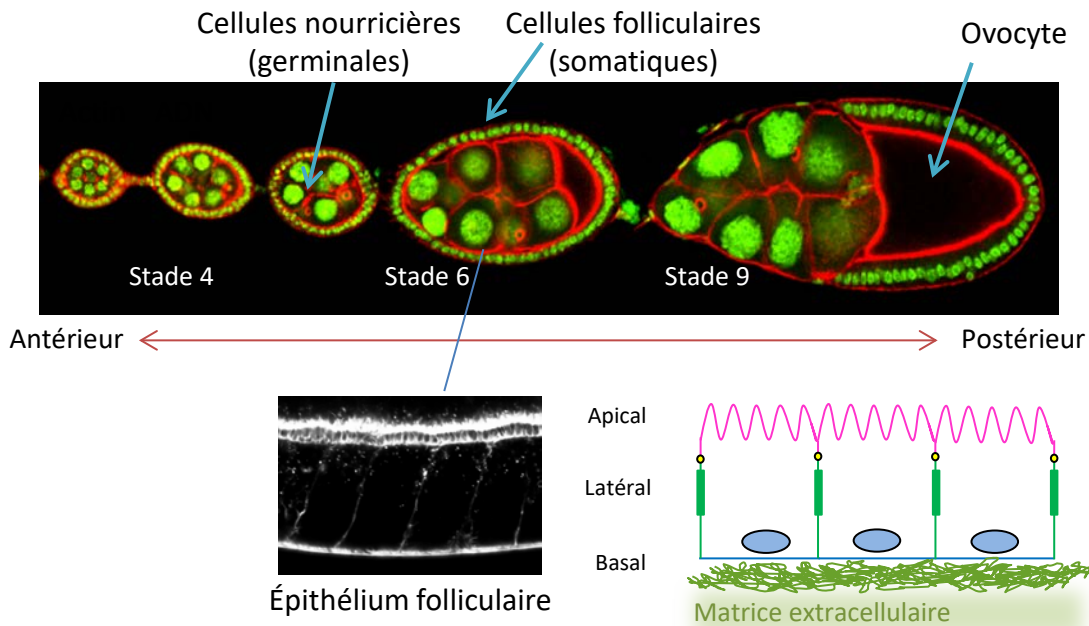


Figure 15 : Structure d'un follicule ovarien.

En haut, image médiane d'un ovariole. Marqueur membranaire en rouge, marqueur nucléaire en vert. Le follicule ovarien chez la drosophile est constitué de 16 cellules germinales au centre : l'une forme l'ovocyte au pôle postérieur et les autres constituent les cellules nourricières. Une monocouche de cellules somatiques entoure les cellules germinales et forme l'épithélium folliculaire. Les cellules folliculaires ont leur pôle apical (en rose) en regard des cellules germinales. Leur pôle basal interagit avec la matrice extracellulaire (en vert sur le schéma).

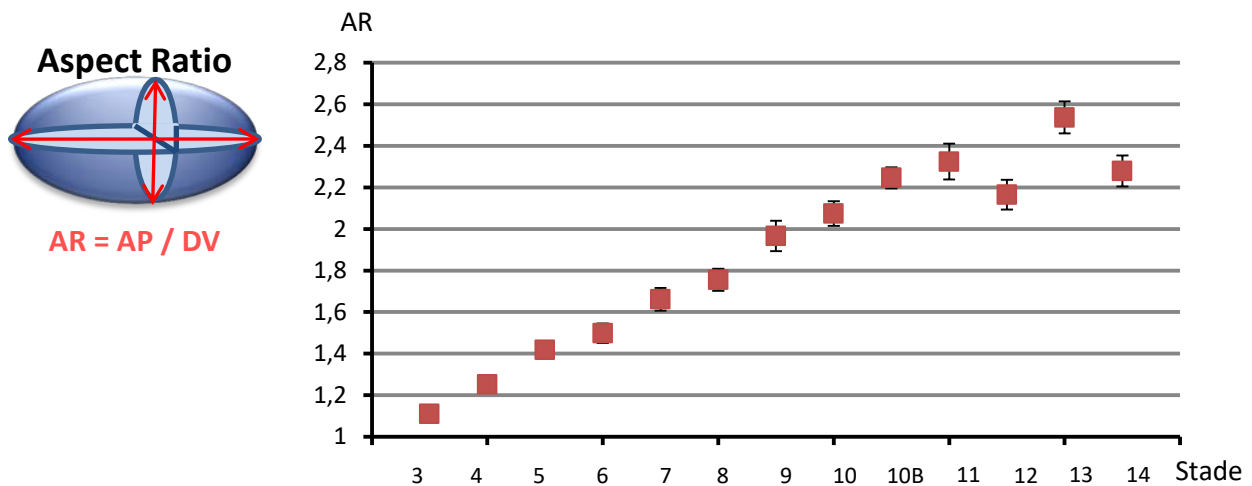


Figure 16 : Les follicules ovariens s'allongent progressivement au cours de leur développement - mesure de l'Aspect Ratio (AR). L'AR est le rapport de la largeur médio-latérale (DV) du follicule sur sa longueur antéro-postérieure (AP). L'AR augmente de façon linéaire au cours du développement. D'après Alegot *et al*, 2018.

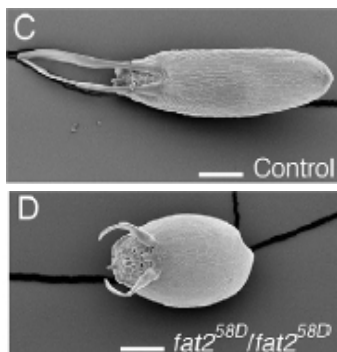


Figure 17 : Phénotype "œuf rond" : exemple du mutant Fat2. Œuf mature WT en haut, œuf mature d'une drosophile mutante pour Fat2 présentant un défaut d'élongation. D'après Viktorinová *et al*, 2009

sous-jacente (fig 15). La MEC entourant les follicules ovariens et le germarium est composée de collagène IV (Col IV), de laminine (Lan) et de perlecan (Pcan) (Yurchenco *et al*, 2011). Elle est produite en majorité par les cellules folliculaires, mais une partie provient du corps gras, un organe métabolique des insectes impliqué dans le stockage d'énergie et la synthèse de métabolites, et par les hémocytes. Les hémocytes participent à la sécrétion de MEC entourant plutôt le germarium (Van de Bor *et al*, 2015).

Au cours de leur développement, les follicules ovariens croissent et s'allongent progressivement selon l'axe AP. La forme allongée des follicules matures préfigure la forme ovale de l'embryon (Frydman et Spradling, 2001 ; fig 14, 15). L'"aspect ratio" (AR) est le rapport de la longueur AP du follicule rapporté à sa largeur, constituée par son axe médio-latéral ; il augmente de façon continue au cours de l'ovogenèse (fig 16). L'élongation du follicule est liée à sa croissance; un blocage de celle-ci engendre un arrêt de la morphogenèse du follicule et, réciproquement, son accélération induit un développement plus rapide avec, *in fine*, acquisition d'une forme correcte (Vachias *et al*, 2014). Les défauts d'élongation engendrent la formation d'œufs arrondis voire ronds ; on parle de phénotype "œufs ronds" (fig 17).

Le domaine basal présente une organisation planaire polarisée qui s'avère indispensable à l'élongation du follicule. D'ailleurs, la majorité des mutations affectant la morphogenèse du follicule ovarien touche des gènes codant des acteurs impliqués dans l'interface MEC-épithélium, nécessaires à cette polarisation planaire (Bateman *et al*, 2001 ; Frydman et Spradling, 2001 ; Viktorinová *et al*, 2009 ; Barlan *et al*, 2017). Cet épithélium folliculaire joue donc un rôle primordial dans le processus de morphogenèse folliculaire et constitue un excellent modèle d'étude d'élongation tissulaire.

3. Du germarium au follicule mature : description des stades du développement

a- Germarium

Des fibres d'actine similaires à des fibres de stress sont présentes au cortex basal des cellules folliculaires (Gutzeit *et al*, 1991). Ces fibres d'actine basales sont déjà établies dans le germarium et seraient mises en place lors de la différenciation des cellules somatiques à partir des cellules souches somatiques, lors de l'encapsulation des cystes germinaux (Cetera *et al*, 2014). A ce stade, les fibres d'actine sont orientées perpendiculairement à l'axe AP (fig 18) mais les mécanismes et les acteurs nécessaires à cet alignement précoce ne sont pas connus. Au niveau du domaine basal, les microtubules sont aussi alignés perpendiculairement à l'axe AP et tous orientés de la même façon dès le stade 1. La chiralité varie cependant d'un follicule à l'autre (Chen *et al*, 2016).

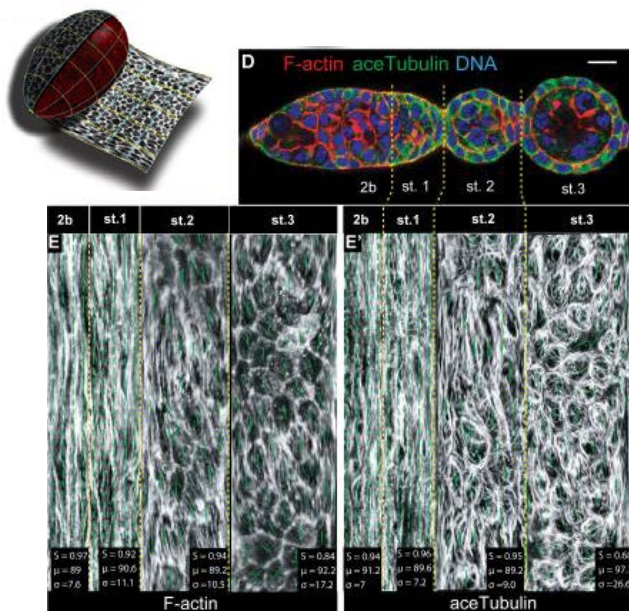


Figure 18 : Orientation et alignement des microtubules et des fibres d'actine du germarium au stade 3. Application d'un algorithme permettant d'obtenir une image de la surface totale du tissu "déroulée". Schéma représentant le principe de reconstitution des images obtenues en bas. Le stade 2b correspond à la partie postérieure du germarium et le stade 1 constitue le follicule en sortie de germarium. A ces stades, les microtubules et les fibres d'actine sont alignés et orientés perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur. Aux stades 2 et 3, les fibres d'actine et les microtubules sont désorientés. D'après Chen *et al*, 2016

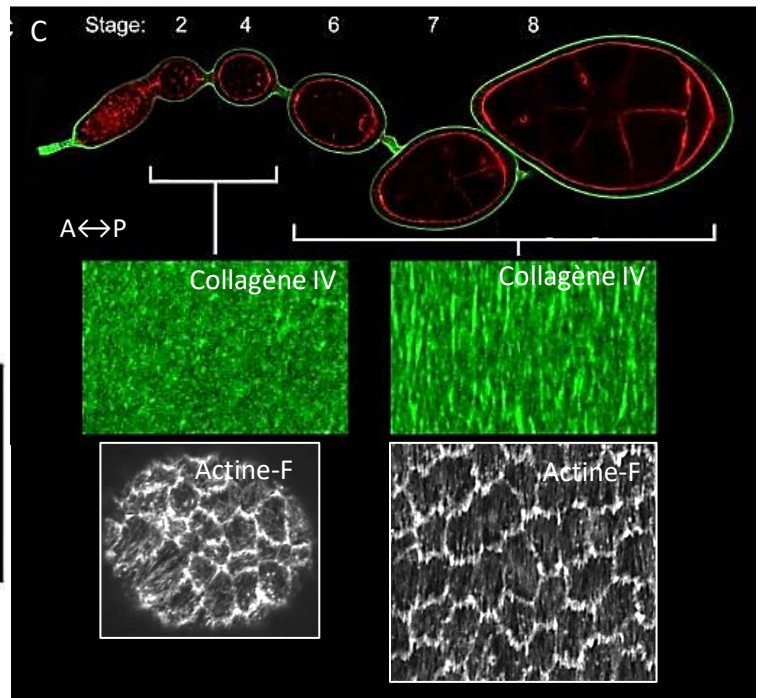
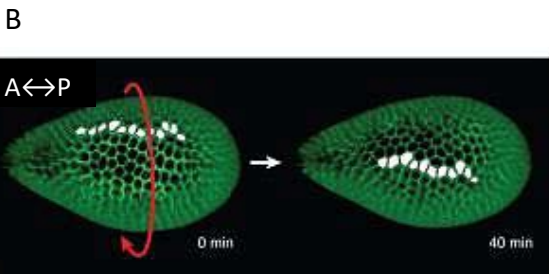
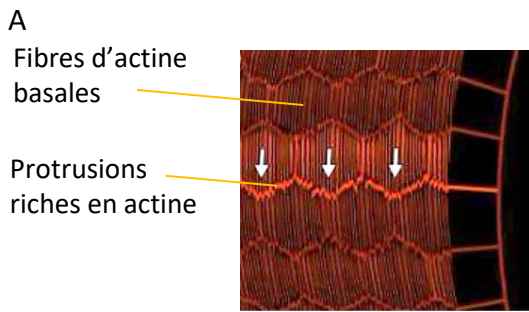


Figure 19 : Développement des follicules ovariens du stade 4 au stade 8 : établissement d'une polarité planaire basale.

A- Protrusions riches en actine basales, orientées perpendiculairement à l'axe AP, situées au front de migration des cellules folliculaires. D'après Cetera et Horne-Badovinac, 2015.

B- Rotation des follicules autour de leur axe AP résultant d'une migration collective des cellules folliculaires. La rotation s'effectue du stade 1 au stade 8. Observation *ex vivo*, d'après Bilder et Haigo, 2012.

C- Dépôt de fibrilles de matrice extracellulaire dès le stade 5. Les fibrilles de MEC sont orientées perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur du follicule. Leur dépôt cesse au stade 8. D'après Isabella et Horne-Badovinac, 2016.

Les fibres d'actine sont progressivement orientées perpendiculairement à l'axe AP du stade 4 au stade 8. Des fibres d'actine sont alignées au niveau du domaine basal. Au stade 4, l'orientation des fibres d'actine varie d'une cellule à l'autre. Peu à peu, les fibres adoptent toute la même orientation. Au stade 7, la polarité planaire des fibres d'actine est totalement établie.

b- Stades 1 à 3

Aussitôt après la sortie du follicule du germarium, les fibres d'actine au cortex basal sont maintenues, mais leur orientation change. Ainsi, au stade 3, les fibres d'actine d'une même cellule restent alignées, parallèles les unes aux autres ; en revanche, d'une cellule à l'autre, les fibres suivent des directions différentes (Cetera *et al*, 2014 ; fig 18). A la sortie du germarium, le follicule ne compte qu'un nombre restreint de cellules folliculaires et celles-ci se divisent massivement, de façon non orientée. Il est possible que les divisions cellulaires successives soient à l'origine de cette perturbation d'orientation des fibres de stress basales.

De plus, des protrusions riches en actine apparaissent, dès le stade 3, au cortex basal des cellules folliculaires. Elles sont localisées de façon planaire polarisée, d'un côté des cellules (fig 19A). Elles sont indépendantes des fibres de stress ; les protrusions ne résultent pas d'une extension des fibres d'actine (Cetera *et al*, 2014).

Ces protrusions d'actine marquent une migration des cellules folliculaires. Celles-ci se déplacent de façon collective, perpendiculairement à l'axe AP, en demeurant solidaires les unes aux autres (Haigo et Bilder, 2011). L'épithélium folliculaire constituant un tissu continu, de forme tubulaire, cette migration se traduit par une rotation du follicule autour de son axe AP (fig 19B). Les cellules germinales sont entraînées par les cellules folliculaires et effectuent donc aussi des mouvements rotatoires autour de l'axe AP. En revanche, la MEC reste statique. La migration collective des cellules folliculaires a été filmée, *ex vivo*, sur des ovarioles en culture, pour la première fois en 2011 (Haigo et Bilder, 2011) puis, démontrée *in vivo*, en 2017 (Chen *et al*, 2017). La chiralité de ce mouvement rotatoire est aléatoire, mais, une fois la rotation initiée, celle-ci ne changera plus de sens. Si les premières études ont décrit que la rotation commençait au stade 4, il a récemment été démontré que celle-ci débutait en fait dès la sortie du germarium (Cetera *et al*, 2014 ; Chen *et al*, 2016).

c- Stades 4 à 8

C'est à partir du stade 4 que le follicule commence à réellement s'allonger ; son AR alors égal à 1 en sortie de germarium, augmente progressivement, de façon linéaire (fig 14, 16). Durant ces premiers stades, le tissu folliculaire est homogène : les cellules sont toutes de forme cubique et de même taille. Elles continuent à se diviser abondamment jusqu'au stade 6 de l'ovogenèse.

Les fibres d'actine sont de nouveau orientées, peu à peu, toutes, perpendiculairement à l'axe AP. Dès le stade 6, la polarisation planaire de l'actine basale est totalement établie et elle demeure maintenue jusqu'à la fin de la migration folliculaire en fin de stade 8 (fig 19C). Les protrusions d'actine se retrouvent également orientées perpendiculairement à l'axe AP. Elles sont présentes à l'avant des cellules et marquent ainsi le front de migration des cellules folliculaires (fig 19A). La

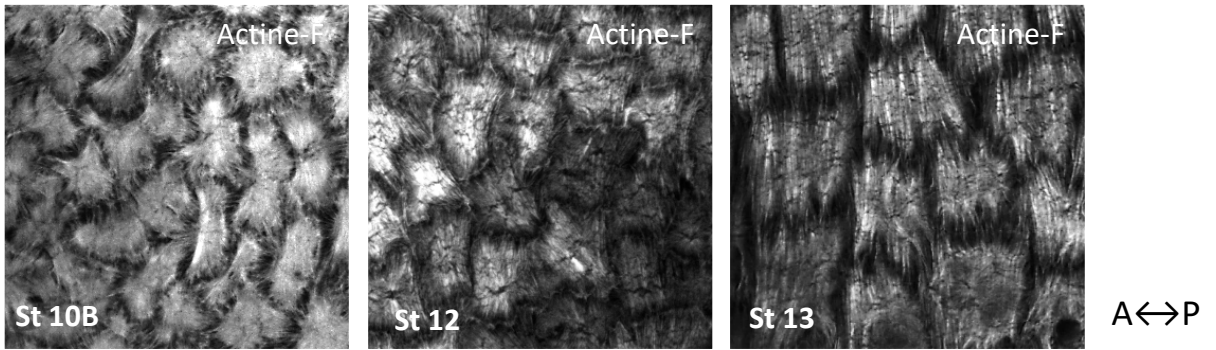


Figure 20 : Dynamique de l'actine basale au cours du développement folliculaire. Au stade 10B, les fibres d'actine perdent leur orientation et suivent diverses directions. Au stade 12, les fibres d'actine sont réorientées perpendiculairement à l'axe AP et cette orientation est maintenue jusqu'en fin de développement. Les fibres changent d'aspect et paraissent plus denses et intenses en fin de développement.

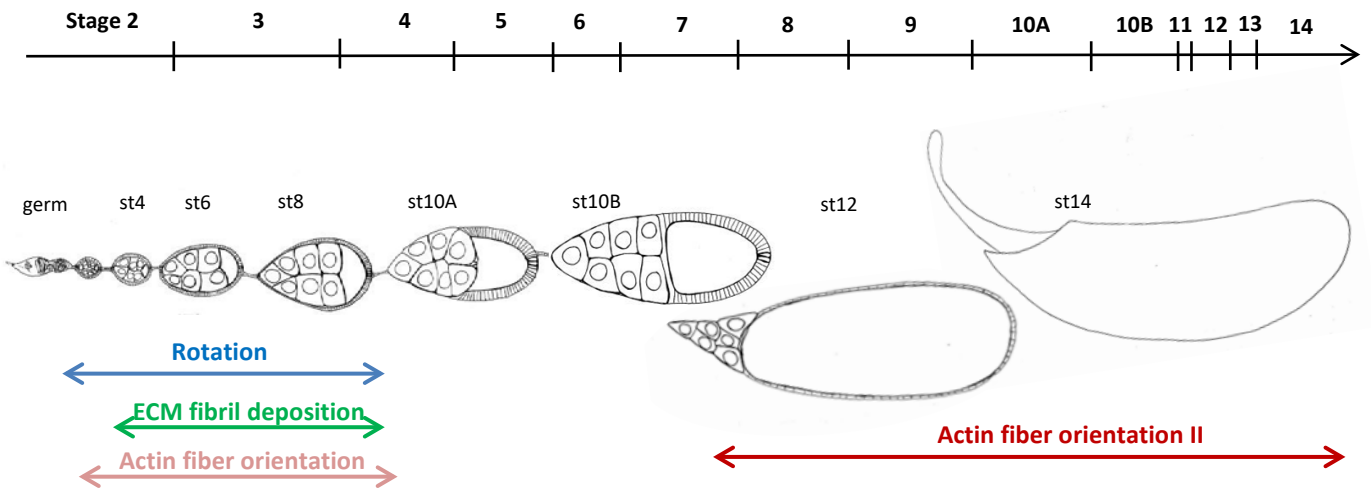


Figure 21 : Schéma récapitulatif des événements survenant au cours du développement folliculaire. La frise chronologique au-dessus représente les stades; leur longueur est proportionnelle à leur durée. La rotation s'effectue du stade 1 au stade 8. Le dépôt des fibrilles de matrice extracellulaire survient du stade 4 au stade 8. Deux phases d'orientation des fibres d'actine se succèdent : la première, du stade 3 au stade 8 et la deuxième, du stade 12 au stade 14.

rotation des follicules accélère à partir du stade 5 puis, s'arrête en fin de stade 8 (Cetera *et al*, 2014 ; Chen *et al*, 2016).

La MEC entourant les follicules ovariens est uniforme jusqu'au stade 5 à partir duquel apparaissent des fibrilles de MEC polarisées, orientées perpendiculairement à l'axe AP (Gutzeit *et al*, 1990 ; Haigo et Bilder, 2011 ; Isabella et Horne-Badovinac, 2015) (fig 19C). Les fibrilles de MEC sont composées de Col IV, de Lan et de Pcan, mais leur structure exacte n'a pas encore été décrite (Isabella et Horne-Badovinac, 2016). Ces trois composants sont aussi ceux qui constituent la MEC classique uniforme autour des follicules. Les fibrilles de MEC sont secrétées du stade 4 au stade 8.

d- Stades 9 à 10B

A partir du stade 9, différentes sous-populations de cellules folliculaires se mettent en place. Les cellules situées au-dessus des cellules nourricières s'aplatissent progressivement, depuis l'antérieur jusqu'à la frontière de l'ovocyte, et deviennent squameuses (fig 14). Ce changement morphologique est associé à un désassemblage des jonctions d'adhérence et serait induit par la pression exercée par la croissance de la lignée germinale (Grammont, 2007). L'ovocyte, quant à lui, croît considérablement et s'avance sous les cellules folliculaires médiales. Les cellules ainsi au contact de l'ovocyte (cellules médiales et postérieures) adoptent une forme en colonne (fig 14, 21). Enfin, au niveau antérieur, un groupe de huit cellules folliculaires, adjacentes aux cellules polaires se détache du reste du tissu, au stade 9, et migre en postérieur, entre les cellules nourricières, jusqu'à atteindre l'ovocyte au stade 10A (Silver et Montell, 2001). Des cellules folliculaires périphériques, situées à la frontière ovocyte/cellules nourricières, vont alors migrer de façon centripète, entre les cellules nourricières et l'ovocyte, pour rejoindre les cellules de bordure. L'ovocyte se retrouve ainsi entouré, de toutes parts, par des cellules folliculaires cuboïdes (fig 14, 21).

Les cellules folliculaires effectuent des contractions basales oscillatoires et anisotropiques, orientées dorso-ventralement, du stade 9 au stade 10b (He *et al*, 2010). Ces oscillations sont liées à un enrichissement médio-basal de MyoII et d'actine.

e- Stades 11 à 14

A partir du stade 10b, les fibres d'actomyosine changent d'orientation pour être réorientées perpendiculairement à l'axe AP dès le stade 12 (Gutzeit *et al*, 1990 ; fig 20). Ces événements sont rapides et sont associés à des modifications d'interactions MEC/cellule (Delon et Brown, 2009 ; Wahlström *et al*, 2006). Dès le stade 11, les cellules nourricières déversent leur contenu dans l'ovocyte afin d'apporter les nutriments et les ARN maternels nécessaires au développement du futur embryon (Spradling, 1993 ; fig 14). Il en résulte une augmentation considérable du volume de l'ovocyte qui va, en fin de développement occuper tout l'espace interne du follicule (fig 14, 21). En réponse à la croissance importante de l'ovocyte, les cellules folliculaires qui l'entourent s'étirent et

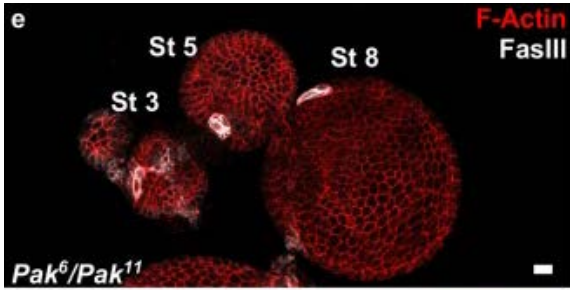


Figure 22 : Les cellules polaires définissent l'axe d'élongation. Chez le mutant Pak, un seul cluster de cellules polaires marquées par fascicline III (FasIII) ou deux clusters proches sont présents. Un défaut d'élongation précoce est également observé. D'après Alegot *et al*, 2018

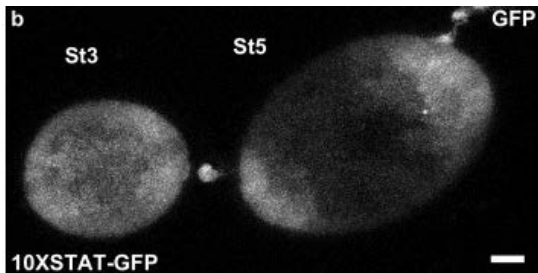


Figure 23 : Gradient d'activation de la voie Jak-Stat visualisé grâce au rapporteur Stat-GFP, sur chaque hémisphère du follicule depuis les pôles. Le gradient s'établit progressivement au cours du développement avec la croissance du follicule. D'après Alegot *et al*, 2018

deviennent très minces. Elles doivent donc remodeler leur cytosquelette en conservant néanmoins leur adhérence entre elles pour assurer le maintien de l'intégrité du tissu épithélial. Aussi, les images de MEC, à ce stade, montrent peu de fibrilles.

Le chorion, tissu rigide de soutien et protecteur de l'embryon, débute sa mise en place dès le stade 12, entre l'ovocyte, qui occupe alors tout le volume du follicule, et les cellules folliculaires. Au stade 14, avant expulsion dans l'oviducte, les fibres d'actine disparaissent (Gutzeit 1991).

B) Elongation du follicule ovarien chez la drosophile

Initialement, lorsqu'il sort du germarium, le follicule ovarien est sphérique. Il croît de façon continue et s'allonge progressivement selon l'axe AP au cours de son développement. La plupart des mutations affectant l'élongation ne présente un défaut d'allongement qu'à partir des stades 7-8 et quelques rares exemples montrent une inhibition totale d'élongation. Cela signifie que l'élongation du follicule présente au moins deux phases qui reposent sur des mécanismes différents.

1. Phase I : l'élongation précoce

a- La voie Jak-Stat oriente l'élongation précoce du follicule

Le mutant *Pak* (p21-activated kinase) présente un phénotype d'œuf rond très expressif puisqu'aucune élongation n'est entamée (Conder *et al*, 2007). Chez ce mutant, les cellules polaires sont réunies en un seul cluster ou alors en deux clusters très proches (Alegot *et al*, 2018 ; fig 22). L'induction de clones mutants pour myospheroïd (*mys*, gène codant la β -intégrine) peut conduire au même phénotype lorsque les cellules polaires sont mutées. Cela signifie que les intégrines et Pak interviennent dans le positionnement des cellules polaires mais ce mécanisme reste inconnu. Les cellules polaires se différencient très tôt au cours du développement. Elles sont indispensables, dans le germarium, à l'encapsulation du cyste germinale (Grammont et Irvine, 2001). Cela montre également que le positionnement des cellules polaires est indispensable à l'élongation précoce et à la définition de l'axe d'élongation (Alegot *et al*, 2018).

Les cellules polaires secrètent unpaired (Upd), le ligand de la voie Jak-Stat (McGregor 2002). Celui-ci diffuse dans les cellules épithéliales. Quand le follicule croît, l'activation de la voie Jak-Stat par les cellules polaires devient anisotropique dans chaque hémisphère ; un gradient d'activation de Jak-Stat depuis les pôles est observé dès le stade 6 grâce à un rapporteur de cette voie, Stat-GFP (Alegot *et al*, 2018 ; fig 23). Ce gradient est indispensable à l'élongation précoce puisque la perte de fonction mais aussi l'activation constitutive de Jak-Stat dans toutes les cellules folliculaires bloque l'élongation du follicule. Le contrôle spatial de l'activation de Jak-Stat constitue donc le signal orientant l'élongation précoce du follicule.

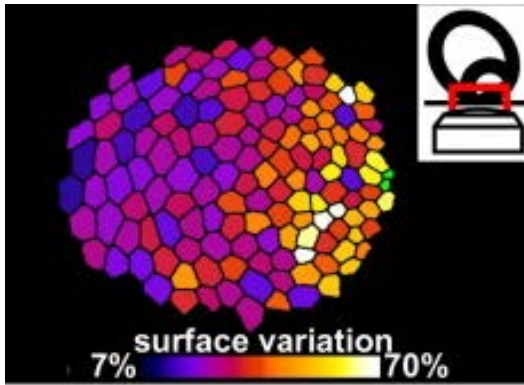


Figure 24 : Gradient de pulsations apicales depuis les pôles. Mesure de la variation de surface apicale des cellules folliculaires. Follicule filmé au pôle postérieur. Les cellules polaires sont indiquées en vert. D'après Alegot *et al*, 2018

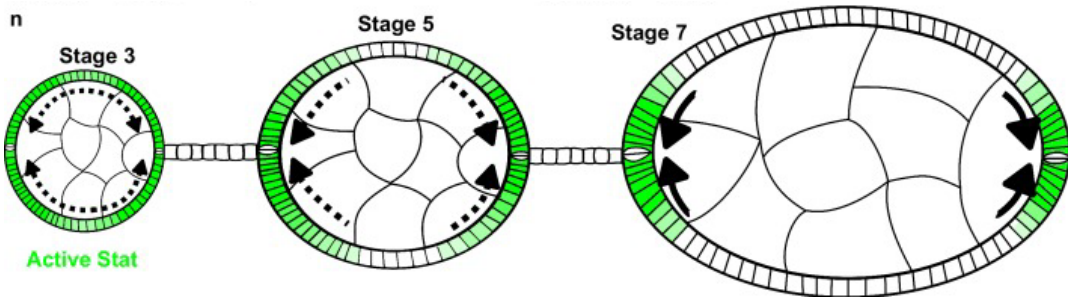


Figure 25 : Courbure plus importante des pôles favorisant l'élongation folliculaire liée au gradient d'activité de la voie Jak-Stat. Les cellules folliculaires proches des pôles subissent une constriction de leur domaine apical. D'après Alegot *et al*, 2018

b- Etablissement d'un gradient de contractions apicales

Durant cette phase du développement, des contractions pulsatiles du domaine apical des cellules folliculaires ont été observées (Alegot *et al*, 2018 ; fig 24). Elles sont liées à un enrichissement apical de myosine II (MyoII) (Wang et Riechmann, 2007). L'inhibition de Rho-kinase, régulant MyoII, diminue l'intensité de ces pulsations montrant que MyoII est bien impliquée dans cette activité pulsatile (Alegot *et al*, 2018). La perte de fonction de la sous-unité régulatrice de MyoII dans les cellules folliculaires, spaghetti squash (Sqh), provoque un défaut d'élongation dès le stade 4, suggérant l'importance des pulsations apicales dans l'élongation précoce. Néanmoins, ces pulsations sont isotropiques, or une asymétrie est nécessaire pour orienter un mouvement, définir un axe pour la réponse tissulaire. Il a été démontré que l'intensité des pulsations apicales est modulée positivement par la voie Jak-Stat. Ces pulsations ont donc une intensité graduelle sur chaque hémisphère du follicule, créant ainsi une asymétrie (fig 24). De plus, MyoII est requis spécifiquement aux pôles pour l'élongation, ce qui tend à confirmer le lien entre pulsations apicales et élongation précoce.

c- Comportements cellulaires associés à l'élongation précoce

La gradation d'intensité des pulsations apicales sur chaque hémisphère induit une constriction apicale des cellules aux pôles à l'origine d'une courbure plus importante des pôles favorisant la forme allongée des follicules (Alegot *et al*, 2018 ; fig 25). Cette gradation d'intensité des pulsations serait également à l'origine d'intercalations cellulaires orientées AP qui favorisent l'allongement du follicule.

2. Seconde phase d'élongation

Durant les premiers stades du développement folliculaire, une PCP basale est établie mais son impact sur la morphogénèse ne survient qu'à partir du stade 7. Elle est cependant essentielle à l'acquisition de la forme du follicule. Cette PCP constituerait donc le signal qui oriente la seconde phase d'élongation.

a- Le signal : mise en place d'une polarité planaire basale

a1 Fat2 contrôle l'établissement de la polarité planaire basale

L'analyse de mutants d'acteurs des voies de PCP classiques, Fat/Dachsous et Frizzled/Van Gogh n'a révélé aucun défaut d'élongation, ni d'organisation du domaine basal folliculaire (Viktorinová *et al*, 2009). Ces voies agissent au niveau apical des cellules épithéliales. Dans le cas du follicule ovarien, une organisation planaire polarisée, notamment de l'actine, est observée au niveau basal ; une autre voie de PCP est probablement mise en jeu. Une description de cette PCP basale et l'identification des

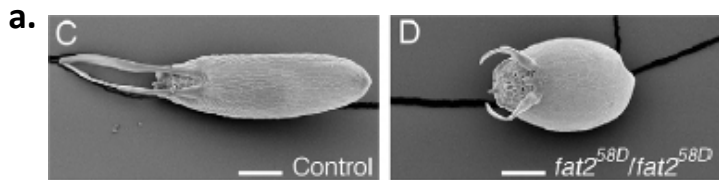
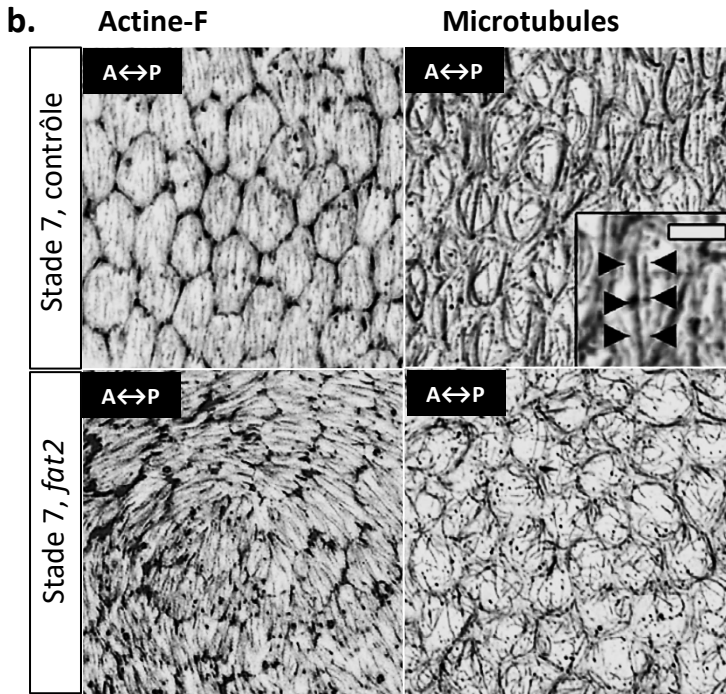


Figure 26 : Le mutant *fat2*

a) Le mutant *fat2* présente un phénotype d'œufs ronds. D'après Viktorinová *et al*, 2009

b) Orientation planaire polarisée des fibres d'actine et des microtubules, perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur dans des follicules WT de stade 7. Désorganisation et perte de polarité des fibres d'actine et des microtubules chez le mutant *fat2*.

D'après Viktorinová et Dahmann, 2013



acteurs de cette voie sont donc nécessaires à la compréhension des mécanismes d'élongation du follicule ovarien de drosophile.

***Fat2 contrôle la PCP basale dans l'épithélium folliculaire**

C'est en 1990 que l'organisation du domaine basal a été visualisée et publiée pour la première fois (Gutzeit *et al*, 1990) : l'orientation perpendiculaire à l'axe d'élongation des fibres d'actine et des fibrilles de MEC est alors décrite. Un mutant affectant l'élongation du follicule, le mutant *kugelei* (Kug), est caractérisé par la même équipe un an plus tard (Gutzeit, 1991). Il présente un défaut d'alignement des fibres d'actine, hautement expressif et pénétrant, suggérant un rôle important de celles-ci dans la morphogénèse du follicule (fig 26). D'autres publications ont par la suite confirmé la corrélation entre PCP basale et l'élongation folliculaire puisque toute mutation affectant l'orientation des fibres d'actine engendre un phénotype "œuf rond" (Bateman *et al*, 2001 ; Frydman et Spradling, 2001 ; Viktorinová *et al*, 2009 ; Cetera *et al*, 2014).

Une vingtaine d'années après les premières observations de Gutzeit, des analyses génétiques ont révélé que le mutant *kug* présente une mutation sur le gène codant Fat2 (Viktorinová *et al*, 2009). Fat2 est une cadhérine atypique, proche de Fat chez la drosophile. Cependant, si Fat est connu pour sa fonction dans la polarité planaire, un tel rôle n'avait jamais encore été attribué à Fat2. Les cadhérines atypiques sont des macromolécules transmembranaires se localisant au cortex latéral des cellules épithéliales en adoptant une conformation tridimensionnelle particulière leur permettant de se tenir dans cet espace intercellulaire très restreint. Typiquement, elles établissent des interactions hétérophiliques et participent aux jonctions d'adhérence, mais ceci n'a pas été démontré pour Fat2.

***Fat2 agit sur l'orientation des microtubules**

Les microtubules sont alignés très précocement, dès le stade 1, dans le germarium (Chen *et al*, 2016). Dans un même follicule, tous les microtubules ont leurs extrémités plus dirigées du même côté du domaine basal dans toutes les cellules, mais la chiralité des microtubules varie d'un follicule à l'autre (Chen *et al*, 2016). Chez le mutant *fat2*, cette coordination d'orientation des microtubules est absente ; en revanche, les microtubules sont bien alignés (fig 26). Donc Fat2 ne participe pas à l'alignement des microtubules mais agit sur leur chiralité (Chen *et al*, 2016). Les microtubules constituent la première marque de PCP dans le follicule mais leur relation avec Fat2 n'est pas comprise.

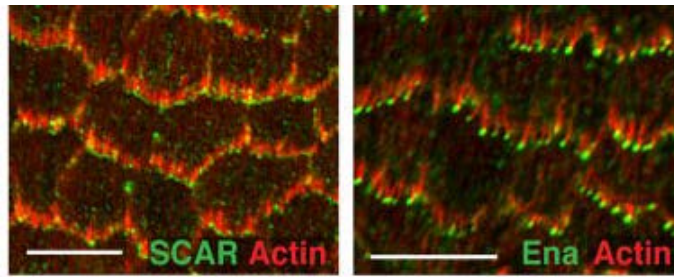


Figure 27: Présence de lamellipodes et de filopodes au front de migration des cellules folliculaires. Les protrusions riches en actine (en rouge) et un immunomarquage révèle la présence de SCAR (en vert, à gauche) spécifiques des lamellipodes et de Ena (en vert, à droite) signant la présence de filopodes. D'après Barlan *et al*, 2017.

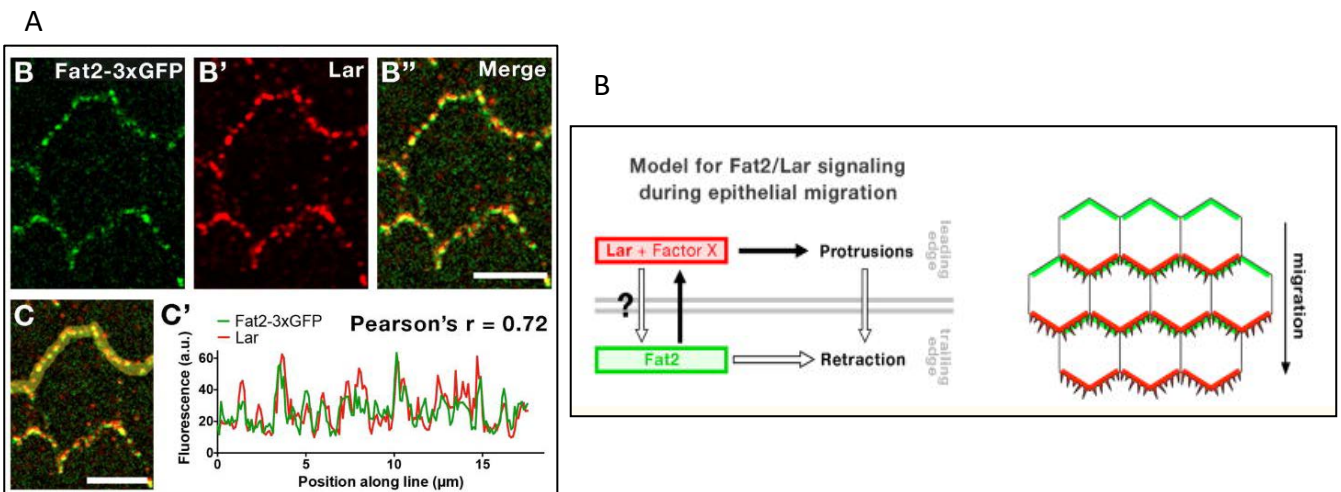


Figure 28 : Fat2 et Lar établissent une signalisation nécessaire à la migration collective et coordonnée des cellules folliculaires.

A- Fat2 et Lar colocalisent. Fat2 est une protéine transmembranaire, localisée à l'arrière des cellules folliculaires. Lar est un récepteur transmembranaire situé à l'avant des cellules folliculaires. La courbe de Pearson confirme la co-localisation de Fat2 et Lar entre cellules voisines. D'après Barlan *et al*, 2017.

B- Pour migrer, une cellule doit émettre des projections cytoplasmiques, des lamellipodes ici, pour se tracter sur la MEC et l'arrière de la cellule doit se rétracter. Fat2 et Lar sont indispensables à la formation des lamellipodes et à la rétraction de l'arrière des cellules. Ils agissent l'un avec l'autre entre deux cellules adjacentes. D'après Barlan *et al*, 2017.

***Fat2 contrôle la mise en place des protrusions d'actine**

Des études *in vitro* de cellules mammifères ont révélé que Fat1, Fat2 et Fat3, homologues de Fat2 chez les Vertébrés, régulent la migration de cellules sur un support réticulé, en participant notamment à la formation de lamellipodes (Moeller *et al*, 2004 ; Tanoue *et al*, 2004).

Dans le follicule ovarien de drosophile, les protrusions riches en actine présentes au cortex basal sont marquées par Abi et SCAR, révélant leur nature de lamellipodes (fig 27). Similairement aux vertébrés, Fat2 est nécessaire à la formation de ces lamellipodes (Barlan *et al*, 2014), par recrutement du complexe régulateur de WAVE (WRC) auquel appartient Abi, grâce à des motifs WIRS (WRC interacting receptor sequence) portés par son domaine intra-cellulaire (ICR) (Squarr *et al*, 2016 ; Aurich et Dahmann, 2016 ; Barlan *et al*, 2017). Le domaine ICR de Fat2 n'est pas requis pour son adressage au cortex basal mais est nécessaire à sa localisation planaire polarisée, à l'arrière des cellules (Aurich et Dahmann, 2016). Les motifs WIRS sont conservés et communs à diverses protéines trans-membranaires. Ils leur permettent de se lier au cytosquelette (Chen *et al*, 2014). Cependant, de façon surprenante, en cas de délétion du domaine ICR de Fat2, l'orientation des fibres d'actine est correctement établie au stade 8, avec toutefois un retard d'orientation par rapport aux follicules sauvages (Aurich et Dahmann, 2016).

*** Une voie de polarité planaire Fat2/Lar ?**

Le mutant *lar* (Leukocyte antigen related) présente aussi un défaut d'élongation associé à une désorganisation de l'actine basale et une absence de lamellipode (Bateman *et al*, 2001 ; Squarr, Brinkmann *et al*, 2016). Ce phénotype est similaire à celui des mutants *fat2*, mais sa pénétrance est plus faible. Lar est une protéine transmembranaire à activité tyrosine phosphatase (Bateman *et al*, 2001). Il interagit également avec WRC (Squarr *et al*, 2016). Lar est localisé de façon planaire polarisée, au cortex basal, à l'avant des cellules folliculaires, en regard de Fat2, localisé à l'arrière des cellules voisines précédentes ; Lar et Fat2 co-localisent de façon ponctuelle à l'extrémité des lamellipodes (Barlan *et al*, 2017 ; fig 28). Cette observation suggère une trans-interaction entre Fat2 et Lar, semblable à celle observée dans les voies de polarité planaire classiques où les acteurs de la PCP se localisent de façon exclusive, chacun d'un côté de la cellule en s'excluant mutuellement. Néanmoins, l'interaction physique entre ces deux protéines n'a pu être mise en évidence. Dans le follicule ovarien, Fat2 est nécessaire à la localisation de Lar dans la cellule adjacente mais l'influence de Lar sur la localisation subcellulaire de Fat2 est controversée (Viktorinová *et al*, 2009 ; Barlan *et al*, 2017). Aussi, si l'asymétrie de Fz/Vang se propage à distance, Fat2 et Lar ne participent à des changements d'informations que sur de courtes distances, d'une cellule à sa voisine, via les contacts cellulaires dans lesquels ils sont engagés. En effet, des études de mosaïsmes d'expression de Fat2 ou de Lar ont démontré que Lar doit nécessairement être exprimée par une cellule pour qu'elle forme

des lamellipodes et que ceux-ci requièrent également un signal Fat2 provenant de la cellule précédente (à l'avant de la cellule en question)(fig 28). Ainsi, Fat2 agit de façon non cellulaire autonome sur la dynamique du front migratoire des cellules folliculaires (contrairement à ce qui avait été décrit par Squarr, Brinkmann *et al*, 2016), tandis que Lar agit de façon cellulaire autonome (Barlan *et al*, 2017). Fat2 et Lar sont également requis pour la rétraction de l'arrière des cellules folliculaires (fig 28). Dans ce cas, Fat2 agit de façon cellulaire autonome et Lar, de façon non cellulaire autonome (Barlan *et al*, 2017).

Fat2 et Lar agissent donc de concert pour établir une signalisation PCP basale nécessaire à la migration collective et coordonnée des cellules folliculaires. Aucun rôle de PCP n'a été reporté à ce jour pour Fat2 ailleurs que dans le follicule ovarien chez la drosophile.

a2 Relation entre Fat2 et la migration collective des cellules folliculaires.

La migration collective des cellules folliculaires débute dès la sortie du follicule du germarium (Cetera *et al*, 2014 ; Chen *et al*, 2016). Chez le mutant *fat2*, les cellules folliculaires ne migrent pas. En revanche, l'induction de clones de cellules mutantes *fat2* a montré que lorsque moins de 60% des cellules sont mutantes, la migration n'est pas affectée, ce qui signifie que les cellules mutantes sont entraînées par les cellules WT en migration (Viktorinová et Dahmann, 2013).

Il a été reporté que le sens des microtubules est anti-corrélé avec le sens de la rotation (Viktorinová et Dahmann, 2013). L'initiation de ce mouvement coordonné est dépendante de l'orientation des microtubules par Fat2. Cependant, si les microtubules sont indispensables à l'initiation de la rotation en sortie de germarium, ils ne sont ensuite, à partir du stade 3, plus nécessaires à la rotation (Chen *et al*, 2016). En revanche, Fat2 demeure essentielle au maintien du mouvement migratoire des cellules folliculaires indiquant que son impact sur les microtubules n'est pas suffisant pour expliquer son implication dans la rotation (Cetera *et al*, 2014).

L'implication des lamellipodes dans la rotation du follicule a été montrée par l'analyse de perte de fonction de *Abi* et de *SCAR* qui engendrent la perte de lamellipode et, pour lesquels, la rotation est bloquée. Des clones mutants pour *Abi* ou *SCAR* montrent également une perte de lamellipode sur les cellules mutées mais pas d'effet sur la rotation, ni sur l'élongation (Cetera *et al*, 2014). Cependant, comme pour *fat2*, si les cellules mutantes représentent plus de 60% de la totalité des cellules folliculaires, alors la rotation est bloquée.

En cas de délétion de l'ICR de Fat2, Lar est correctement localisée et la formation des lamellipodes n'est pas affectée (Barlan *et al*, 2017). S'il a d'abord été publié que la rotation est bloquée dans ce contexte (Aurich et Dahmann, 2016), une correction a, depuis, été apportée : l'absence du domaine ICR de Fat2 n'engendre pas une absence totale de rotation, mais une

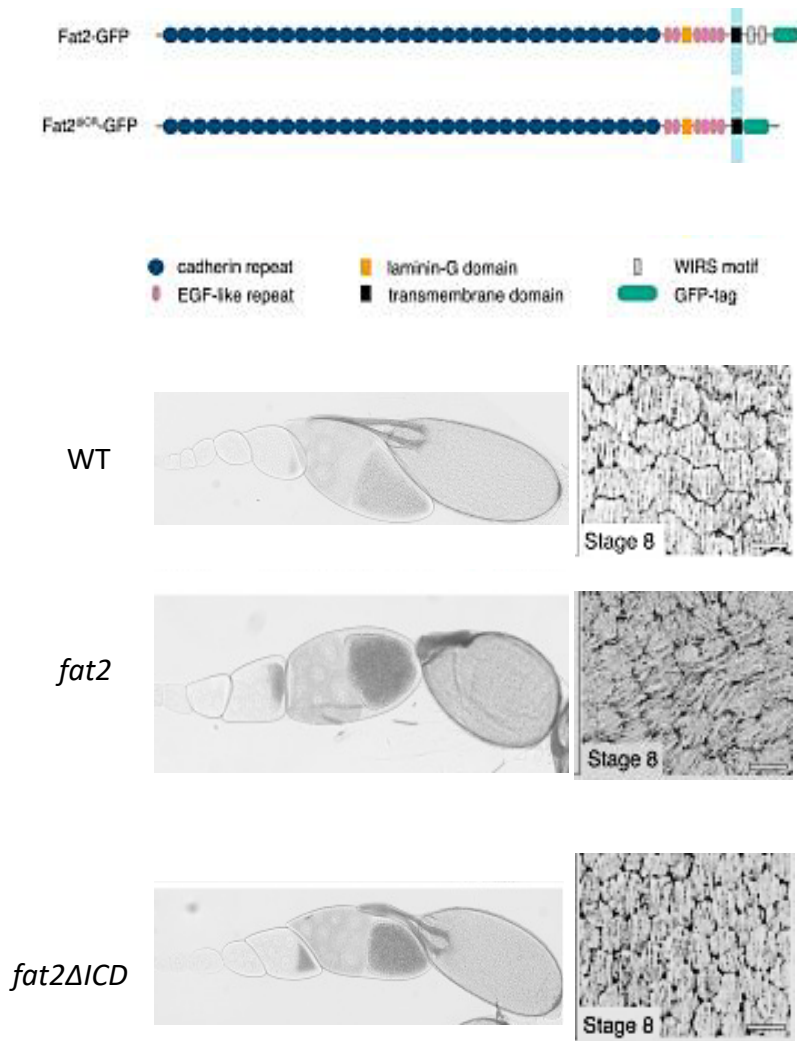


Figure 29 : Le domaine intracellulaire (ICD) de Fat2 n'est pas requis pour l'orientation des fibres d'actine au stade 8

Schéma représentant la séquence protéique de Fat2 et construction délétée du domaine ICD. L'expression du transgène Fat2 Δ ICD chez le mutant *fat2* sauve partiellement l'élongation et restaure l'orientation des fibres d'actine au stade 8. D'après Aurich et Dahmann, 2016.

diminution de sa vitesse de 50% (Chen *et al*, 2017). Fat2 est donc requis à la fois pour l'initiation, mais aussi pour le maintien de la rotation (Cetera *et al*, 2014). Elle est essentielle au mouvement global du tissu folliculaire, en assurant la mise place de structures essentielles à la migration collective des cellules. Par ailleurs, si Fat2 est nécessaire à la rotation, celle-ci va, par feed-back positif, renforcer la localisation planaire polarisée de Fat2 (Viktorinová et Dahmann, 2013).

La rotation du follicule implique MyoII. Des flux rétrogrades d'acto-myosine ont, en effet, été observés et il est proposé que ce soit la contractilité des fibres de stress qui agisse comme mécanisme générant la force nécessaire à la rotation (Viktorinová *et al*, 2017). Fat2 orchestrerait la transmission de ce signal dans le tissu pour faciliter la coordination de la migration collective des cellules folliculaires.

Les lamellipodes, dont la mise en place est aussi dépendante de Fat2, sont également nécessaires, ce qui suggère une traction des cellules folliculaires sur la MEC, réalisée par les intégrines (Haigo et Bilder, 2011). Cependant, celles-ci n'ont pas été décrites localisées dans les lamellipodes, contrairement à ce qui est observé en culture de cellules lors de phénomènes de migration cellulaire. Les intégrines sont localisées à l'avant des cellules folliculaires, à l'extrémité des fibres de stress. A l'arrière des cellules folliculaires, cet ancrage dynamique à la MEC doit être remanié pour permettre la rétraction de ce domaine. Misshapen (*msn*) est nécessaire pour diminuer les niveaux d'intégrines à l'arrière des cellules folliculaires, probablement en augmentant leur turnover (Lewellyn *et al*, 2013).

a3 Evénements induits par la rotation

***Alignement des fibres d'actine**

Chez le mutant *fat2*, les fibres d'actine sont établies mais sont orientées de façon anarchique. Néanmoins, lorsque moins de 60% des cellules sont mutées, l'alignement des fibres d'actine s'effectue de façon correcte (Viktorinová et Dahmann, 2013). Dans ce cas, la rotation n'est pas non plus affectée. Lorsque le domaine ICD de Fat2 est délété, les fibres d'actine sont correctement orientées au stade 8, mais l'établissement total de cet alignement s'effectue plus tardivement que dans les follicules sauvages (Aurich et Dahmann, 2016 ; fig 29). La vitesse de migration est réduite de 50% dans ce cas. De plus, le blocage de la rotation par RNAi contre *Abi* ou *SCAR* ou l'inhibition chimique de *ROCK* ou de *Arp2/3* engendre également une désorientation des fibres d'actine (Cetera *et al*, 2014 ; Viktorinová et Dahmann, 2013). Enfin, la déplétion de *CLASP*, protéine stabilisatrice des microtubules, empêche l'initiation de la rotation et l'alignement des fibres d'actine est alors défectueux (Chen *et al*, 2016). Toutes ces données suggèrent donc que la rotation est nécessaire, en aval de Fat2, à l'orientation des fibres d'actine. Il a été montré, *in vitro*, que l'application de forces de

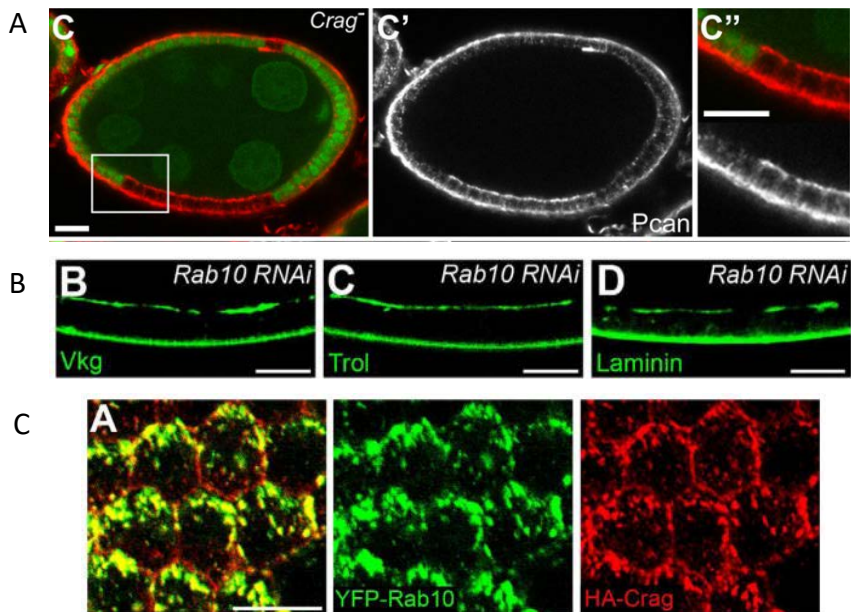


Figure 30 : Crag et Rab10 régulent l'adressage de la matrice extracellulaire vers le domaine basal.

A- Accumulation apicale et basale de perlecan (Pcan) dans les cellules mutantes pour Crag (cellules non marquées par la GFP), contrairement aux cellules WT (en vert) où la matrice est correctement sécrétée en basal. D'après Deneff *et al*, 2008.

B- En cas de perte de fonction de Rab10, un défaut de sécrétion de matrice (Vkg pour le collagèneIV, Trol pour le perlecan et laminine) en apical est observé. D'après Lerner *et al*, 2013

C- Crag et Rab10 colocalisent à l'arrière du domaine basal des cellules folliculaires. D'après Lerner *et al*, 2013.

traction sur des cellules en culture provoque l'alignement des fibres de stress (Kaunas *et al*, 2005). *In vivo*, de telles tensions sont capables d'induire une PCP dans l'aile chez la drosophile à l'état pupal et dans l'épiderme de souris (Aigouy *et al*, 2010 ; Luxenburg *et al*, 2015). La rotation agirait donc comme une signalisation mécanique pour la PCP des fibres d'actine. Néanmoins, le blocage de la rotation par l'application d'inhibiteur de Arp2/3 à partir du stade 6 n'a pas d'impact sur l'alignement des fibres, montrant que la rotation n'est nécessaire au maintien de l'orientation des fibres d'actine que jusqu'au stade 6 (Cetera *et al*, 2014). Ceci suggère qu'un mécanisme indépendant prend le relai et l'une des hypothèses émises est que ce maintien dépende des fibrilles de MEC (Cetera *et al*, 2014).

***Sécrétion polarisée de matrice extracellulaire**

-La sécrétion de la MEC par les cellules folliculaires

Les protéines de la MEC sont synthétisées dans un compartiment endoplasmique spécifique, localisé près de la membrane basale des cellules folliculaires (Lerner *et al*, 2013). C'est par déplétion de Plod (pro-collagen lysyl hydroxylase), qui engendre une rétention de collagène IV dans le réticulum endoplasmique que ce compartiment fut identifié (Bunt *et al*, 2011). Les vésicules intracellulaires de Col IV, de Pcan et de Lan sont toutes formées depuis ce compartiment endosomique basal avant d'être sécrétées.

-La voie d'exocytose Crag/Rab10

Un défaut de sécrétion de MEC a été observé lors de l'induction de clones mutants pour *Crag* (calmodulin binding protein related to a Rab3 GDP/GTP exchange protein) : du col IV, de la Lan et du Pcan se retrouvent excrétés à la fois en basal et en apical dans les cellules mutantes (fig 30A). Ce défaut est lié à une anomalie d'adressage basal des vésicules de MEC et non à une transcytose de la MEC basale en apical (Denef *et al*, 2008). Le même phénotype est observé en déplaçant la GTPase Rab10 (Lerner *et al*, 2013 ; fig 30B). *Crag* et Rab10 sont donc requis pour l'adressage correct en basal des vésicules de MEC.

La protéine *Crag*, hautement conservée chez les vertébrés et les invertébrés, est une GEF (Guanine exchange factor) de GTPase Rab. Les protéines Rab actives confèrent de façon spécifique une identité à des compartiments membranaires comme des organites ou des vésicules de trafic (Barr *et al*, 2013). Elles contrôlent ainsi l'activité vésiculaire en régulant la formation, la sortie, l'adressage, la fusion... des vésicules (Hutagalung et Novick, 2011). Chez les mammifères, l'homologue de *Crag* fonctionne spécifiquement avec Rab10 *in vitro* (Yoshimura *et al*, 2010). Dans le follicule ovarien, *Crag* et Rab10 co-localisent dans la membrane des compartiments intracellulaires proches du domaine basal et du réticulum endoplasmique spécifique de la MEC (Denef *et al*, 2008 ; Lerner *et al*, 2013 ; fig 30C). Leur interaction physique a été démontrée par co-immunoprécipitation

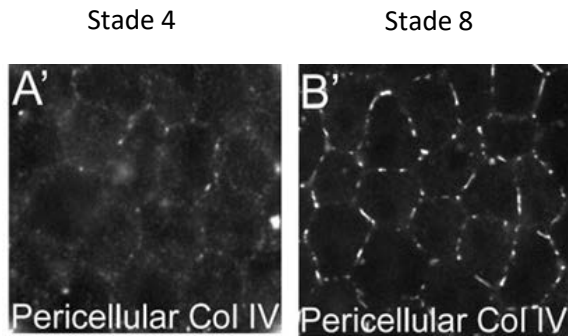


Figure 31 : Accumulation pérircellulaire de collagène IV au stade 8. Cette accumulation latérale n'est pas encore présente au stade 4. Elle est concomittante avec le dépôt des fibrilles de MEC. D'après Isabella et Horne-Badovinac, 2016.

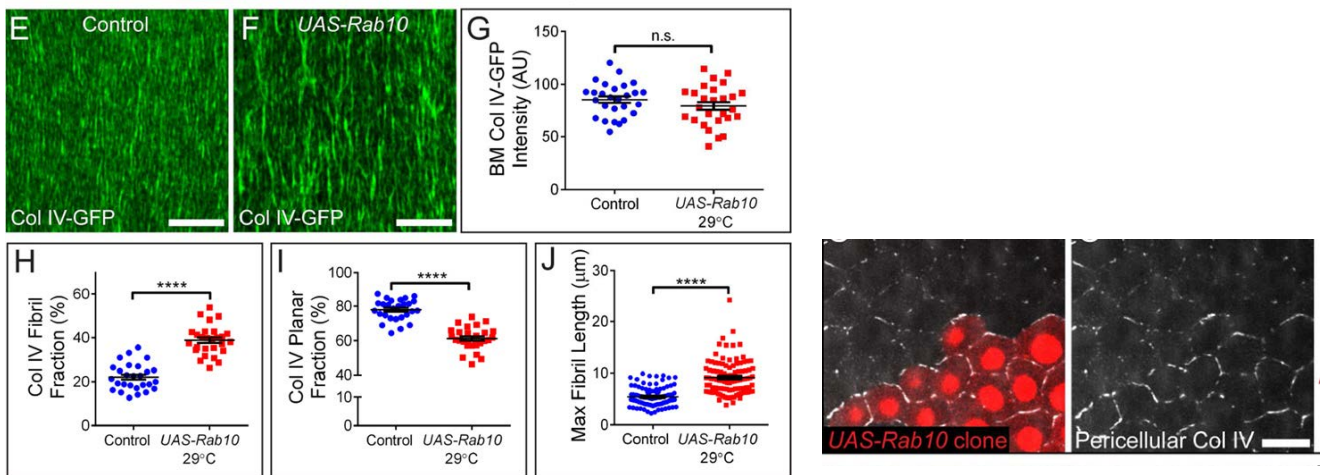


Figure 32: La surexpression de Rab10 augmente la part fibrillaire de la matrice extracellulaire. La quantité de matrice est inchangée (graphe G) mais la part de matrice polarisée est plus importante que dans les follicules sauvages (graphes H et I). La longueur des fibrilles est plus élevée en cas de surexpression de Rab10 (graphe J). L'accumulation péri-cellulaire de collagène IV est plus importante dans les cellules surexprimant Rab10 (cellules en rouge; les cellules n'exprimant pas RFP sont les cellules WT). D'après Isabella et Horne-Badovinac, 2016.

(Lerner *et al*, 2013). Crag est également localisée en apical et près des membranes latérales. Sa distribution intracellulaire est dépendante de PIP2 (Devergne *et al*, 2014). Il est probable qu'il agisse comme "barrière" séquestrant les vésicules de MEC incorrectement orientées. Crag est aussi nécessaire à la localisation subcellulaire de Rab10, à l'arrière des cellules folliculaires (Lerner *et al*, 2013).

-La voie d'exocytose Stratum/Rab8

Une déplétion de Stratum (Devergne *et al*, 2014) et Rab8 (Devergne *et al*, 2017) montre également un défaut de sécrétion de MEC avec adressage incorrect en apical. Stratum est un GEF, homologue de RABIF (RAB Interacting Factor) chez les mammifères. RABIF est capable d'interagir avec diverses protéines Rab dont Rab8 et Rab10. Cependant, dans le follicule ovarien de drosophile Stratum n'agit pas avec Rab10 pour réguler la sécrétion basale de MEC, mais avec son paralogue, Rab8 (Devergne *et al*, 2017). Stratum est localisé en basal et son accumulation est régulée par Crag (Devergne *et al*, 2017). Les deux voies Crag/Rab10 et Stratum/Rab8 ne sont pas redondantes et sont requises indépendamment pour l'adressage correct et la sécrétion en basal de la MEC (Devergne *et al*, 2017).

-Formation des fibrilles de MEC

Les fibrilles de MEC se mettent en place dès le stade 4 et leur sécrétion cesse avec l'arrêt de la rotation au stade 8 (Haigo et Bilder, 2011). Durant cette phase, la synthèse de collagène IV augmente considérablement (Haigo et Bilder, 2011) et une accumulation péri-cellulaire de MEC apparaît progressivement, latéralement, entre les cellules folliculaires, près du domaine basal (Isabella et Horne-Badovinac, 2016 ; fig 31). En cas d'absence de rotation, chez le mutant *msn*, le mutant *Fat2* ou en contexte RNAi contre Abi, les fibrilles de MEC ne sont pas secrétées et d'intenses agrégats latéraux de MEC sont observés dans l'espace péri-cellulaire au stade 8, alors qu'ils ne sont pas encore formés au stade 4 (Viktorinová et Dahmann, 2013 ; Isabella et Horne-Badovinac, 2016). La sécrétion de MEC uniforme elle, s'effectue toujours, ce qui suggère que ces agrégats latéraux résultent de l'anomalie de sécrétion des fibrilles de MEC et que la rotation s'avère nécessaire à leur dépôt (Isabella et Horne-Badovinac, 2016). Les fibrilles de MEC sont constituées des mêmes composants que la MEC uniforme : Col IV, Lan et Pcan. Cependant, il a été démontré que les fibrilles de MEC ne sont pas formées par une restructuration de la MEC pré-existante mais résultent de la sécrétion de protéines de MEC nouvellement synthétisées (Isabella et Horne-Badovinac, 2016). Il y aurait, par conséquent, deux mécanismes différents mis en jeu pour la sécrétion de la MEC uniforme et celle de la MEC polarisée.

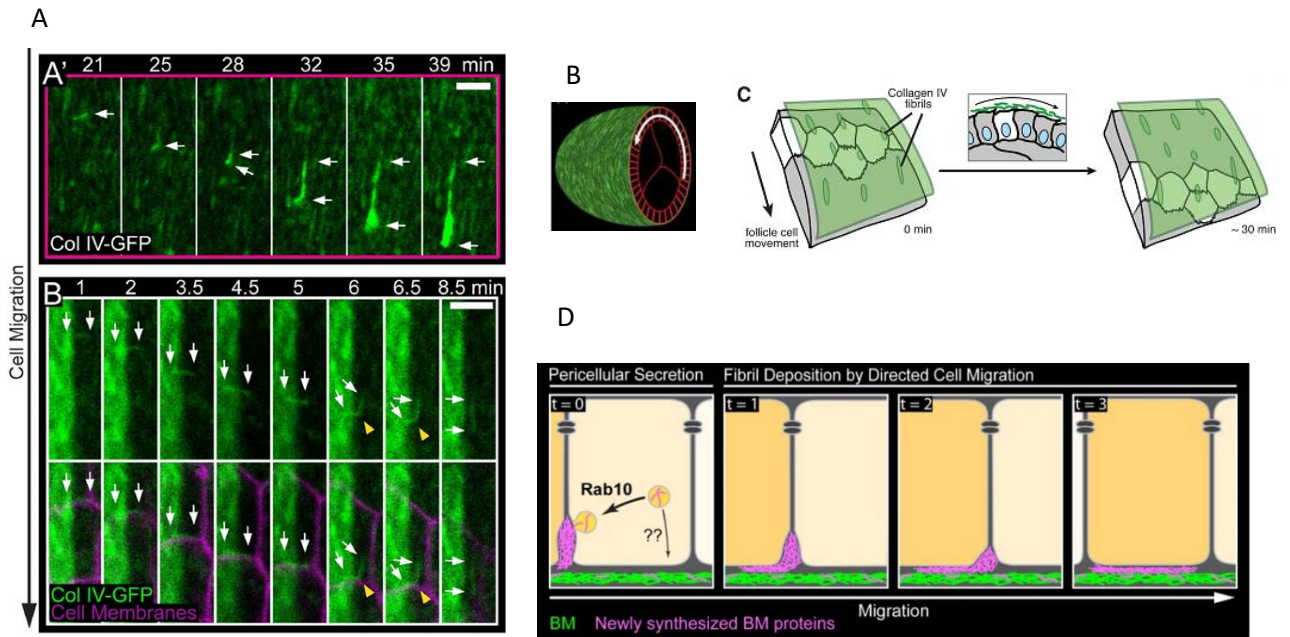


Figure 33 : Sécrétion d'une fibrille de matrice extracellulaire (MEC) filmée *ex vivo*. A-La fibrille de MEC se fixe à la MEC statique et est étirée grâce à la migration des cellules folliculaires. La sécrétion se fait latéralement, au niveau des membranes latérales des cellules. Isabella et Horne-Badovinac, 2016.

B-Dépôt des fibrilles de MEC pendant la rotation et dans la direction de cette migration collective des cellules. Les fibrilles de MEC sont intégrées à la MEC statique, tandis que les cellules migrent (schéma C, d'après Haigo et Bilder, 2011).

D- Schéma représentant la voie de sécrétion des fibrilles de matrice extracellulaire (MEC). La sécrétion des fibrilles de MEC implique Rab10. Une accumulation latérale de MEC (en violet) s'effectue entre les cellules, près du domaine basal. La fibrille se lie à la MEC sous-jacente et la fibrille est étirée grâce à la migration cellulaire. D'après Isabella et Horne-Badovinac, 2016.

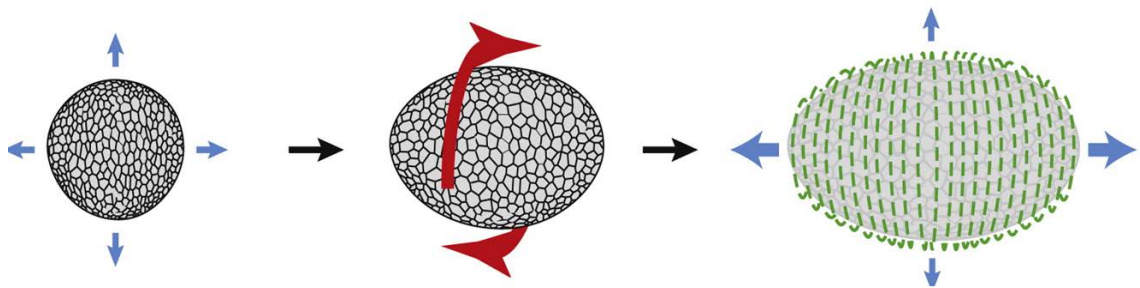


Figure 34 : modèle du corset moléculaire. Les fibres d'actine et les fibrilles de matrice extracellulaire orientées perpendiculairement à l'axe AP exerceraient une contrainte mécanique envers la croissance médo-latérale du follicule et favoriseraient son allongement selon l'axe antéro-postérieur. Les flèches rouges montrent le mouvement de rotation et les flèches bleues représentent la résultante des forces liées au corset et à la croissance du follicule. D'après Bilder et Haigo, 2012

-Voie de sécrétion de la MEC polarisée

Durant la phase de rotation, Rab10, localisée normalement à l'arrière des cellules, est retrouvée aussi aux membranes latérales et sa surexpression engendre une accumulation péri-cellulaire accrue de Col IV, Pcan et Lan ainsi qu'une augmentation de la fraction fibrillaire et de la longueur des fibrilles de MEC (Isabella et Horne-Badovinac, 2016 ; fig32). Cet effet est renforcé par la surexpression de Crag. Ceci suggère que Crag et Rab10 sont requis pour le dépôt des fibrilles de MEC. L'implication de Rab8 et Stratum n'a pas été testée.

Les protéines des fibrilles de MEC sont donc secrétées latéralement, près du domaine basal, et commencent à s'agréger dans l'espace péri-cellulaire pour former des structures cohésives qui vont connecter la MEC préalablement déposée (fig33). Cette MEC étant statique, les fibrilles de MEC vont être étirées grâce au mouvement migratoire des cellules folliculaires (Isabella et Horne-Badovinac, 2016). Si leur sécrétion et leur allongement ont été filmés *ex vivo* (fig 33), la structuration de ces fibrilles de MEC n'a pas encore été décrite et on ne sait si elles commencent à adopter leur conformation fibrillaire dans l'espace péri-cellulaire (Isabella et Horne-Badovinac, 2016).

a4 Conclusion

En conclusion, la PCP basale s'établit progressivement du stade 3 au stade 8. Il en résulte une organisation polarisée du domaine basal avec des fibres d'actine et des fibrilles de MEC, orientées de façon perpendiculaire à l'axe AP. Fat2 et Lar sont impliqués dans l'établissement de cette PCP. La rotation est également nécessaire pour le maintien de l'orientation des fibres d'actine basales jusqu'au stade 6 et, est, de plus, requise pour le dépôt des fibrilles de MEC, du stade 4 au stade 8. La rotation constitue donc, en aval du module Fat2/Lar, un acteur clé de l'organisation planaire polarisée du domaine basal de l'épithélium folliculaire.

b-La force générant l'élongation: le modèle du corset moléculaire

Diverses études ont démontré l'importance de l'organisation basale de l'épithélium folliculaire dans la morphogenèse du follicule. L'idée d'un "corset moléculaire", formé par les fibres d'actine et/ou les fibrilles de MEC, orientées dorso-ventralement (DV) a alors émergé (Gutzeit *et al*, 1991). Ce corset constituerait une contrainte mécanique envers la croissance médio-latérale du follicule et favoriserait ainsi son allongement selon l'axe AP (fig 34).

b1 Dynamique et fonction des fibres de stress

***Etablissement et maintien des fibres d'actine : le rôle des intégrines**

Le rôle des intégrines dans l'élongation folliculaire a été mis en évidence, pour la première fois, via un crible mosaïque (Duffy *et al*, 1998), puis étudié par la suite par Bateman *et al*, 2001 et, Delon et Brown, 2009.

Nous ne savons pas, à l'heure actuelle, comment les fibres d'actine sont mises en place dans le germarium. Néanmoins, les intégrines qui se localisent à l'extrémité de ces fibres d'actine sont nécessaires à leur orientation, mais aussi à leur maintien (Bateman *et al*, 2001). En condition normale, le follicule présente au niveau basal, durant la phase précoce, des intégrines constituées d'une sous-unité α PS1 et d'une sous-unité β PS, capables de réguler négativement les niveaux de nucléateurs d'actine : enabled (ena), diaphanous (dia) et profilin (Delon et Brown, 2009).

A partir du stade 9, les intégrines changent leur composition et deviennent α PS2- β PS. Elles n'ont alors plus la capacité de réguler ena, dia et profiline mais elles recrutent la protéine adaptatrice tensine (Delon et Brown, 2009). Cette mobilisation de la tensine serait nécessaire pour résister à la rigidité de la MEC et pourrait être à l'origine de l'aspect plus épais et intense des fibres d'actines, aux stades tardifs. Le rôle de ce changement de composition des intégrines n'a pas été élucidé. Il s'effectue juste après la fin de la rotation et avant le début du changement morphologique drastique des cellules folliculaires qui deviennent squameuses en antérieur et adoptent une forme en colonne en postérieur. Il pourrait également être impliqué dans les oscillations basales ou encore dans la phase de désorientation/orientation des fibres d'actine. Les partenaires des intégrines, susceptibles de jouer le rôle de mécano-senseurs, ont été recherchés ; ainsi, les protéines paxiline, taline, integrin-linked-kinase (ILK), tensine et Zasp ont été identifiées et sont retrouvées localisées à l'extrémité des fibres d'actine (Delon et Brown, 2009). La taline et la paxiline interviennent notamment dans la régulation des oscillations basales (Qin *et al*, 2017).

***Oscillations basales**

Les cellules folliculaires effectuent des contractions anisotropiques orientées perpendiculairement à l'axe AP. Ces oscillations basales démarrent au stade 9 et s'effectuent de façon cellulaire autonome (He *et al*, 2010). Elles sont liées à un enrichissement médio-basal de MyoII et d'actine. Un traitement à la cytochalasine D qui affecte les fibres d'actine bloque ces oscillations, tandis qu'un traitement à l'ionophore de calcium-ionomycine qui accentue les contractions, augmente les taux de MyoII (He *et al*, 2010). Les oscillations basales sont donc dépendantes de l'activité de l'actomyosine. Une étude de modélisation propose que ces contractions basales soient provoquées par la pression exercée par la croissance du cyste germinale qui activerait la voie des Rho

kinases pour induire l'activité de MyoII (Koride *et al*, 2014). Le contrôle de ces oscillations basales implique à la fois les jonctions cellules/MEC et les jonctions d'adhérence (Qin *et al*, 2017). Elles sont régulées, d'une part, par RhoI, localisé au cortex basal, dont l'activité est contrôlée par les jonctions cellule/matrice impliquant les intégrines et ses partenaires, la taline et la paxiline (Qin *et al*, 2017). La modification de ces jonctions agit également sur la période d'oscillation, peut-être en modulant les résistances mécaniques (He *et al*, 2010). L'initiation et la périodicité des oscillations basales sont aussi contrôlées par la myosine-phosphatase PP1, flapwing (Valencia-Exposito *et al*, 2016). D'autre part, les jonctions d'adhérence sont également mises en jeu dans le contrôle des oscillations d'actomyosine basales. En effet, ces adhésions cellule/cellule sont nécessaires aux fibres de stress et à l'activité de dia qui vont agir sur la distribution médio-basale de ROCK et MyoII (Qin *et al*, 2017). ROCK doit adopter un patron spécifique et être finement régulé pour agir dans un réseau biochimique oscillatoire à l'origine des oscillations d'actomyosine basales (Qin *et al*, 2018).

Le blocage des oscillations par la cytochalasine D engendre une relaxation médio-latérale du follicule. A l'inverse, l'intensification des contractions provoque la formation d'un follicule super-allongé (He *et al*, 2010). La perte de fonction de ROCK et la modification des périodes d'oscillations, par altération des jonctions cellule/MEC par exemple, ont également un impact sur l'élongation du follicule (He *et al*, 2010). Cela signifie que ces oscillations d'actomyosine basales effectuent une pression dorso-ventrale sur le follicule et constituent ainsi un corset dynamique autour du follicule pour l'allonger selon l'axe AP.

***Orientation tardive des fibres d'actine**

A partir du stade 10b, les fibres d'actomyosine changent d'orientation pour être réorientées perpendiculairement à l'axe AP dès le stade 12 (Gutzeit *et al*, 1990 ; fig 20). Il a été proposé que cette réorganisation du cytosquelette soit engendrée par des voies de méchanotransduction activées par la croissance considérable de l'ovocyte (Wahlström *et al*, 2007). Les cellules folliculaires doivent alors s'étirer pour résister à la pression exercée par la lignée germinale. Cependant, le blocage du relargage de contenu des cellules nourricières dans l'ovocyte n'empêche pas cette réorientation, même si l'alignement des fibres d'actine n'est pas tout à fait correct au stade 13 (Delon et Brown, 2009). Ce changement d'orientation serait lié à l'assemblage de structures transitoires d'actine, formant des fibres parallèles à l'axe AP avec une accumulation de ena et alpha-actinine en postérieur des cellules folliculaires durant les stades 11/12. Cependant, ena et actinine ne sont pas requises pour la mise en place de ces structures transitoires et les acteurs impliqués ne sont pas connus. La localisation postérieure de ena et de l'actinine est dépendante des intégrines. Ce changement d'orientation des fibres d'actine pourrait être dépendant du changement de composition des

intégrines (Delon et Brown, 2009). L'impact de cette orientation tardive sur l'élongation du follicule ovarien n'est pas connu.

b2 Impact de la MEC sur l'élongation

***Les fibrilles de MEC agissent-elles comme corset moléculaire ?**

Lorsque la MEC est affectée, un défaut d'élongation survient. L'induction de clones mutants *Vkg* (collagène IV) provoque un défaut dès le stade 8 (Haigo et Bilder, 2011). Le dominant négatif de *Rab10* engendre également la production d'œufs ronds (Lerner *et al*, 2013). Et, à l'inverse, la surexpression de *Rab10* engendre un sur-allongement des œufs, avec un AR significativement plus élevé que celui des follicules sauvages, dès le stade 7 (Isabella et Horne-Badovinac, 2016). Ces données montrent que la MEC joue un rôle important pour la morphogenèse du follicule. Néanmoins, dans ces expériences, la MEC uniforme et la MEC polarisée sont toutes deux affectées. A l'heure actuelle, il n'est possible d'empêcher le dépôt des fibrilles de MEC spécifiquement, sans stopper la sécrétion de MEC basale, qu'en bloquant la rotation des follicules. Que ce soit chez le mutant *fat2*, le mutant *msn*, en perte de fonction de *Abi* ou *SCAR*, ou en utilisant un inhibiteur de Arp2/3, il n'y a pas de dépôt de fibrille et l'élongation est effectivement déficiente. Cependant, le blocage de la rotation engendre également un défaut d'orientation des fibres d'actine et il n'est donc pas possible de conclure quant à l'effet spécifique des fibrilles de MEC.

Dans le cas des follicules *fat2ΔICR*, la vitesse de migration est plus lente et permet tout de même un dépôt de fibrilles de MEC, mais celles-ci semblent plus fines et plus courtes bien que cela n'ait pas été quantifié. Les fibres d'actine sont quant à elles correctement orientées au stade 8 (fig 29). L'élongation est légèrement affectée avec un défaut survenant tardivement, à partir du stade 11 (Aurich et Dahmann, 2016). En condition sauvage, à ces stades, les fibrilles de MEC sont très peu visibles mais il est possible qu'elles soient encore présentes et requises tardivement ou alors qu'elles soient nécessaires avant pour établir un signal agissant ultérieurement.

La surexpression de *Rab10* engendre une augmentation de la part fibrillaire de la MEC et un sur-allongement des œufs. Ce résultat concorderait avec l'idée d'un effet constrictif des fibrilles de MEC sur le follicule. Cependant, la surexpression de *Ehbp1* (EH-domain Binding Protein 1), qui est un effecteur de Rab10, augmente de façon plus importante la part fibrillaire de MEC mais engendre un défaut d'élongation avec un AR significativement plus bas que celui des follicules sauvages à partir du stade 10 (Isabella et Horne-Badovinac, 2016). L'équilibre entre les deux voies de sécrétion, MEC uniforme et MEC polarisée, est en fait indispensable ; l'augmentation de la quantité de l'une engendre une déplétion de l'autre et c'est ce qui explique le défaut d'élongation observé lors de la

surexpression de *Ehbp1*. Cela signifie également que la MEC uniforme joue un rôle tout aussi important que les fibrilles de MEC dans la morphogenèse du follicule.

***La rigidité de la MEC joue-t-elle un rôle dans l'élongation du follicule ?**

L'utilisation de l'AFM (Atomic Force Microscopy) a récemment montré que la rigidité de la MEC augmente au cours de la rotation du follicule (Crest *et al*, 2017 ; Chlasta *et al*, 2017). L'augmentation des niveaux de Col IV durant cette phase peut en être la cause. En effet, SPARC régule les niveaux de Col IV dans la MEC en s'y associant durant son trafic pour l'empêcher d'être sécrété. L'ARNm de SPARC disparaît au stade 5-6, permettant une augmentation de sécrétion de Col IV. Cette augmentation des niveaux de Col IV est corrélée avec une diminution des taux de Pcan dans la MEC ; Col IV est plus rigide que Pcan. Une activation constitutive de SPARC tout au long de l'ovogenèse engendre une diminution du taux de Col IV et un défaut d'élongation (Isabella et Horne-Badovinac, 2015). L'altération des niveaux des composants de la MEC a donc un impact sur la morphogenèse du follicule.

L'augmentation de la rigidité peut également être liée au dépôt des fibrilles de MEC. Une augmentation de rigidité locale est en effet mesurée au niveau des fibrilles (Chlasta *et al*, 2017). La rigidité de la MEC des follicules mutants pour *fat2* pour lesquels les fibrilles de MEC ne sont pas déposées est cependant controversée. Elle serait plus souple que dans les follicules sauvages pour Crest *et al*, 2017 alors que les mesures plus fines et plus locales de Chlasta *et al*, 2017 la montrent plus rigide. Ces derniers proposent que cette augmentation de rigidité soit liée à l'accumulation péricellulaire de MEC retrouvée chez le mutant *fat2*.

L'AFM a, par ailleurs, permis de détecter un gradient de rigidité sur chaque hémisphère du follicule : les pôles sont plus souples et le centre du follicule, plus rigide. Ceci créerait une force anisotropique face à la croissance du follicule et favoriserait son allongement selon l'axe AP à partir du stade 8 (Crest *et al*, 2017). Ce gradient de rigidité pourrait être contrôlé par la voie Jak-Stat ; une perturbation de cette voie efface le gradient de rigidité de la MEC et affecte l'élongation (Crest *et al*, 2017). Or, le gradient Jak-Stat est essentiel à l'élongation précoce (Alegot *et al*, 2018), donc le défaut observé peut être dû à la perturbation de la première phase d'élongation ou alors la voie Jak-Stat est réellement impliquée dans les deux étapes d'élongation.

Ainsi, la MEC joue un rôle essentiel dans la morphogenèse du follicule. Un défaut de sécrétion de MEC impacte l'élongation dès le stade 7. En revanche, l'altération des fibrilles de MEC par délétion de l'ICR de *Fat2* ou la surexpression de *Ehbp1*, a un effet plus tardif. L'implication des fibrilles de MEC dans l'élongation du follicule reste à confirmer. Elles pourraient agir directement comme corset moléculaire ou alors, indirectement en participant à l'établissement du gradient de

rigidité de MEC et/ou en maintenant l'orientation des fibres d'actine en fin de rotation. La MEC uniforme est également requise et un équilibre entre les deux types de MEC est primordial.

b3 Conclusion

L'implication de la MEC et du cytosquelette d'actine dans ce corset moléculaire a été largement décrite. Cependant, si initialement, il a été proposé qu'il ne soit formé que des fibrilles de MEC et des fibres d'actine orientées perpendiculairement à l'axe AP, il apparaît actuellement que ces structures sont essentielles mais pas suffisantes pour contraindre la croissance médio-latérale. Il est par ailleurs compliqué de déterminer le réel impact de chacune de ces structures ou chacun de ces événements sur l'élongation puisqu'ils sont interconnectés et dépendants les uns des autres.

De plus, ce corset moléculaire n'est pas statique mais dynamique de par les oscillations basales qui s'effectuent du stade 10A au stade 10B, mais également grâce aux remodelages de la MEC et de son adhésion aux cellules folliculaires qui vont agir sur ses propriétés physiques, en particulier, sa rigidité.

c- Comportements cellulaires associés à l'élongation tardive

A l'heure actuelle, les comportements cellulaires associés à la forme du follicule, durant cette seconde phase d'élongation, ne sont pas encore décrits. Il n'y a pas d'orientation des divisions cellulaires qui pourrait expliquer une augmentation du nombre de cellules selon l'axe AP par rapport à l'axe médio-latéral, puisque les divisions cessent dès le stade 6. Les oscillations basales pourraient engendrer une intercalation des cellules folliculaires selon l'axe AP ou bien les empêcher selon l'autre direction, mais ceci n'a jamais été démontré.

L'élongation pourrait être liée à un allongement selon l'axe AP des cellules folliculaires. Un changement drastique de forme des cellules s'effectue au stade 9 et l'aplatissement des cellules antérieures est, en effet, plus important dans l'axe AP (Grammont, 2007) mais l'anisotropie de cet aplatissement n'a pas été quantifié. De plus, lors de la croissance considérable de l'ovocyte au stade 11, les cellules folliculaires s'étirent mais leur variation de taille n'a pas été, non plus, mesurée.

Ce changement relativement rapide et brutal de forme des cellules folliculaires et la non homogénéité du tissu qui en résulte rendent difficile l'analyse des comportements cellulaires à l'échelle du follicule entier.

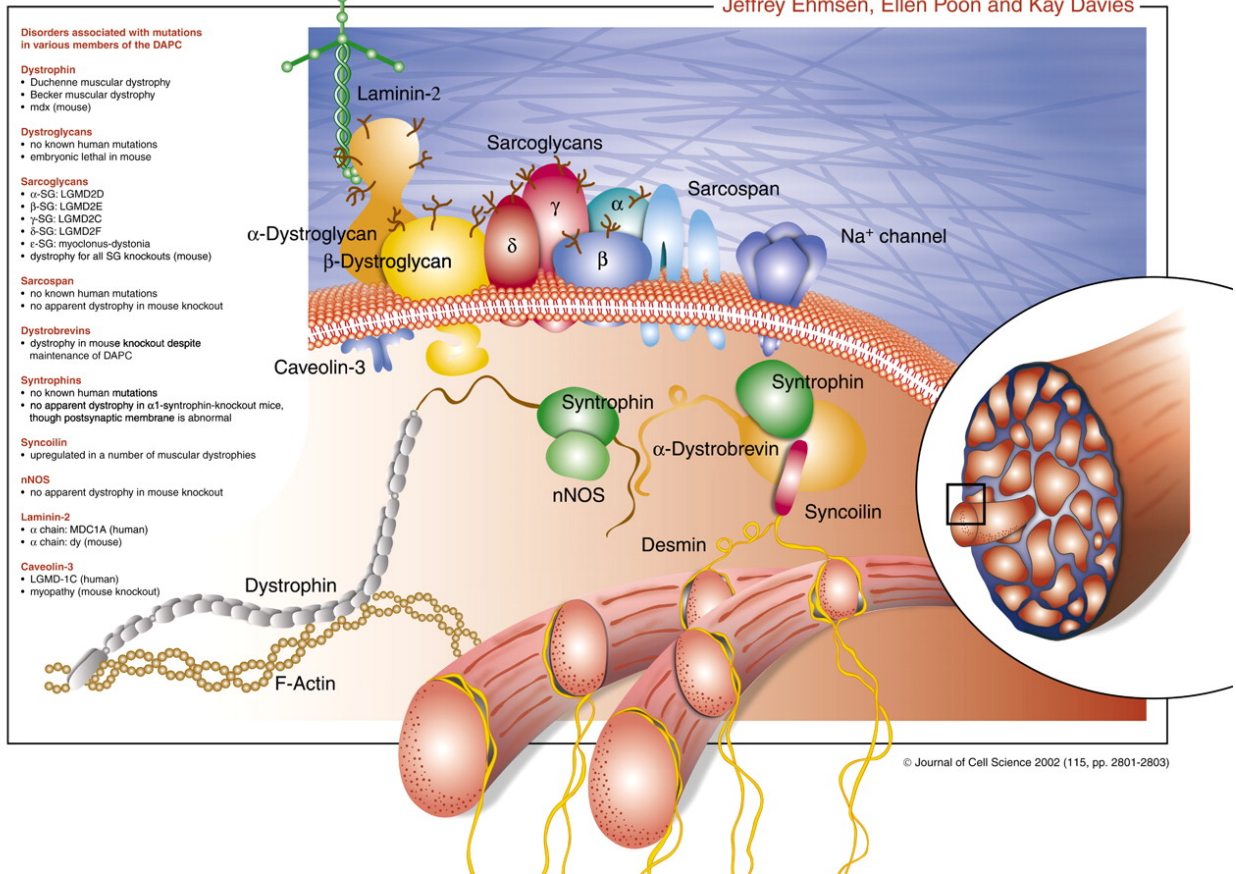


Figure 35: Schéma du complexe Dystrophine-Dystroglycan chez les mammifères. La dystrophine s'associe aux filaments d'actine via son domaine actinine à son extrémité N-terminale et via les répétitions spectrines 11 à 14-15 chez la souris. Elle interagit via son extrémité C-terminale, avec la glycoprotéine transmembranaire, le dystroglycan qui lie le perlecan et la laminine de la matrice extracellulaire. Dystrophine interagit avec dystrobrevine et syntrophine. Le complexe connecte des canaux ioniques, nNOS, des cavéolines... constituant une plateforme d'organisation des voies de signalisation. D'après Ehmsen *et al*, 2002.

III Le complexe Dystrophine/Dystroglycan

A) Description du complexe

1. La dystrophine

La dystrophine (Dys) constitue une protéine du cytosquelette, associée à la membrane plasmique. C'est une très grande protéine de 427kDa chez l'Homme (Hoffman *et al*, 1987). Son domaine N-terminal contient un domaine actinine, capable de lier l'actine (Koenig et Kunkel, 1990). Sa partie centrale est constituée d'une longue chaîne de répétitions spectrines (24 chez l'Homme) et quatre domaines charnières lui conférant de la flexibilité (Koenig et Kunkel, 1990). Des répétitions spectrines participent également à sa liaison à l'actine. A son extrémité Cter, Dys présente un domaine WW, succédé d'un domaine riche en cystéines et de deux modules à doigts de zinc qui sont tous trois nécessaires à son interaction avec dystroglycan (Dg) (Koenig et Kunkel, 1990). Sa liaison au Dg est essentielle à sa fonction (Ervasti, 2007). Enfin, deux superhélices alpha en bout de séquence de Dys lui permettent d'interagir avec la dystrobrevine (Db) et les syntrophines (Blake *et al*, 1995 ; Suzuki *et al*, 1994). La Dys s'associe à plusieurs partenaires pour former un complexe macromoléculaire membranaire, le complexe DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex ; fig 35). Ce complexe DGC est constitué de Dys, Dg, Db, Syn, sarcoglycans et sarcospan chez les mammifères (Ervasti *et al*, 1991 ; Yoshida et Ozawa, 1990). Dys interagit, par ailleurs, avec nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase) qui se lie aussi aux Syn (Grozdanovic et Baumgarten, 1999 ; Lai *et al*, 2009).

Dys joue un rôle essentiel dans le muscle. Des paralogues de Dys et des isoformes courtes sont exprimés dans le système nerveux central et périphérique et participent notamment à la myélinisation des cellules de Schwann, la formation des bandes de Cajal, la différenciation neuronale et à la fonction synaptique (Anderson *et al*, 2002 ; Sherman *et al*, 2012; Garcia-Cruz *et al*, 2018).

2. Le dystroglycan

Le Dg est une glycoprotéine transmembranaire qui subit de nombreuses glycosylations essentielles à sa fonction puisqu'elles lui permettent d'interagir avec ses ligands. Dg interagit avec Lan, Pcan qui sont des composants de la MEC (Schneider *et al*, 2006 ; Sato *et al*, 2008).

Dg joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité des tissus et est également impliqué dans divers processus importants pour la physiologie cellulaire. Une diminution de son accumulation à la membrane altère l'adhésion de la cellule à la MEC et favorise le remodelage du tissu (McClatchey, Wang *et al*, 2016). Ceci est lié à son implication dans divers processus tels que l'organisation du cytosquelette, la sécrétion de la MEC ou la migration cellulaire. Dg participe notamment à la mise en place des lames basales en régulant l'assemblage des laminines et prend

part ainsi à l'établissement la polarité apico-basale du tissu épithélial (Henry et Campbell, 1998 ; Li *et al*, 2003 ; Masuda Hirata *et al*, 2009). Cette fonction serait plus ou moins redondante avec l'action des intégrines. Ces phénomènes constituent des processus clés pour la morphogenèse de nos tissus au cours du développement. Dg est indispensable pour la gastrulation et la mise en place du mésoderme chez la souris (Williamson *et al*, 1997). Il est également impliqué dans la somitogenèse chez l'embryon de xénope (Hidalgo *et al*, 2009). Enfin, Dg joue un rôle essentiel dans la croissance et le guidage axonal chez les vertébrés (Anderson *et al*, 2007 ; Sato *et al*, 2008 ; Clements *et al*, 2017). De telles fonctions n'ont jamais été attribuées à Dys. La localisation de Dg à la membrane est indépendante de Dys. Chez la souris, la délétion du domaine intracellulaire de Dg qui interagit avec Dys, n'engendre pas de défaut d'expression ni d'organisation des laminines et n'affecte pas la migration des neurones, ni la guidance axonale (Satz *et al*, 2010 ; Clements *et al*, 2017). Ces fonctions de Dg sont donc indépendantes de Dys.

3. Le complexe DGC

Via son interaction à la MEC, le complexe DGC établit une connexion physique entre le cytosquelette et la MEC. Une mutation sur un gène codant l'un des composants du complexe DGC engendre une altération des interactions MEC/membrane cellulaire/cytosquelette. Diverses maladies génétiques sont associées à ce complexe et affectent les fonctions musculaires. Ce complexe est alors apparu comme nécessaire au maintien de l'intégrité du tissu musculaire et en particulier lors des contractions musculaires, pour résister aux tensions générées (Ervasti et Campbell, 1991). Cependant, si le rôle structural du complexe DGC a d'abord été largement étudié, notamment dans le muscle, les études se portent depuis ces dernières années sur son implication dans diverses voies de signalisation. En effet, depuis une quinzaine d'années, la MEC et son adhésion aux cellules apparaît de plus en plus importante dans l'initiation, la transmission et la régulation de voies signalétiques, et les études du complexe DGC cherchent désormais à identifier d'autres fonctions du complexe, non structurales, mais associées à la signalisation cellulaire. Aussi, l'identification de domaines d'interaction des composants du complexe DGC avec nNOS, les canaux calciques et sodiques, les intégrines, YAP-TAZ... (Grozdanovic et Baumgarten, 1999 ; Lai *et al*, 2009 ; Morikawa *et al*, 2017) ont amené les chercheurs à explorer cette piste. Enfin, des études de formes courtes de Dys ont confirmé l'existence de fonctions importantes de Dys dans le muscle, indépendantes de sa connexion à l'actine, sans les identifier (Judge *et al*, 2011 ; Taghli-Lamalle *et al*, 2008). Outre son importance dans le maintien architectural de la cellule, le complexe DGC apparaît désormais comme une plate-forme organisant les transductions de signaux cellulaires ou extracellulaires.

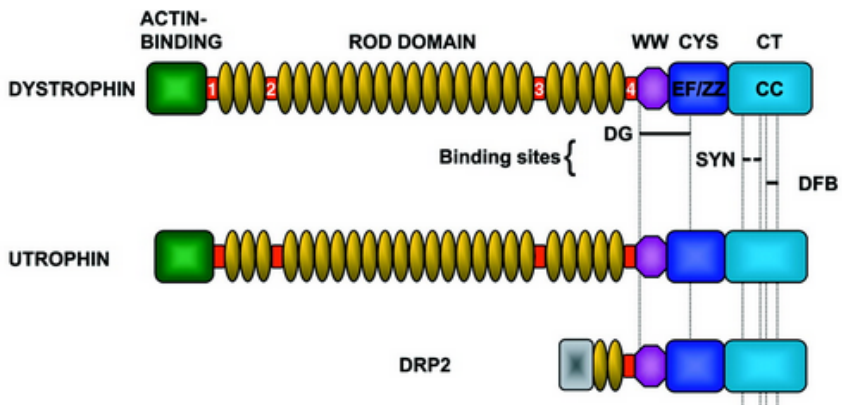


Figure 36 : Structure des trois paralogs de Dystrophine chez les mammifères.

L'utrophine présente une séquence aussi longue que celle de dystrophine et similaire. DRP2 constitue un paralog court de la dystrophine. Sa séquence correspond à la partie Cterminale de dystrophine.

4. *Dystrophine et Dystroglycan et pathologies associées*

La myopathie de Duchenne (DMD : Duchenne Myopathy Disorder) et la forme moins sévère, la myopathie de Becker (BMD), sont des maladies génétiques neuro-musculo-dégénératives liées à la perte de fonction totale (DMD) ou partielle (BMD) de Dys (Koenig *et al*, 1989). Des phénomènes inflammatoires, des fibroses et une perte de résistance des cellules musculaires engendrant leur nécrose, mènent à une dégénérescence musculaire. Des problèmes cardiaques liés à une cardiomyopathie dite dilatée se développent également et des troubles cognitifs et mentaux peuvent aussi survenir, selon la mutation en cause et le fonds génétique (Quinlan *et al*, 2004 ; Daoud *et al*, 2009).

Le développement de thérapies géniques visant à exprimer un gène médicament pour remplacer le gène muté de façon spécifique et ciblée est actuellement la stratégie adoptée pour le traitement de diverses maladies génétiques et de nombreux essais probants sont en cours. Cependant, le gène codant Dys est trop long pour être inséré dans un vecteur nécessaire pour le transport ciblé. C'est pourquoi de nombreuses études de formes courtes de Dys cherchent à déterminer la séquence minimale suffisante de Dys pour sauver le phénotype musculaire et cardiaque des patients atteints de DMD (Fairclough *et al*, 2013). Il est donc important de pouvoir déterminer quels sont les domaines fonctionnels de Dys.

Les dystroglycanopathies regroupent l'ensemble des pathologies associées à une perte de fonction du Dg. Elles sont généralement associées à des défauts de modifications post-traductionnelles de Dg dues, par exemple, à des mutations de gènes codant les enzymes de glycosylation (Kanagawa *et al*, 2004 ; Barresi et Campbell, 2006). Ces pathologies affectent les muscles squelettiques et/ou le système nerveux.

Dg jouant un rôle primordial dans les épithéliums, il est également impliqué dans de nombreux cancers épithéliaux. Sa dérégulation favoriserait le développement tumoral et métastatique (Galvagni *et al*, 2016 ; Beltrán-Valero de Bernabé, *et al*, 2009 ; McClatchey, Wang *et al*, 2016).

B) *La dystrophine chez la drosophile*

La dystrophine présente 3 paralogues chez les mammifères : Dys, utrophine (Utrn) et DRP2 (fig 36). L'Utrn est de même longueur et de séquence très proche de celle de Dys. Elle est exprimée normalement chez l'embryon puis, peu à peu, remplacée par la dystrophine. Chez l'adulte sain, elle n'est retrouvée accumulée qu'aux jonctions neuro-musculaires et jonctions myo-tendineuses. En revanche, chez les souris mutantes mdx (mutation sur le gène codant Dys) et les patients DMD, l'expression d'Utrn est accrue et elle est retrouvée dans le muscle squelettique afin de compenser la perte de Dys (Matsmura *et al*, 1992). Chez la souris, l'effet de cette compensation d'Utrn en absence

de Dys est plus efficace et tend à masquer certains symptômes de DMD. Les souris modèles de DMD employées désormais sont double mutantes pour Dys et Utrn : (mdx:utrⁿ). DRP2 est une protéine courte de séquence similaire à la partie Cter de Dys. On la retrouve dans le système nerveux central, dans les cellules de Schwann (Sherman *et al*, 2001) et elle n'est pas exprimée dans le muscle squelettique. Enfin, 7 promoteurs, présents dans la séquence génique de Dys, sont à l'origine de 3 isoformes longues et quatre isoformes courtes : Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71 correspondants à la séquence Cter de Dys (Roberts *et al*, 1993).

Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul paralogue de Dys, la Dys elle-même. Plusieurs isoformes sont également produites dont des isoformes courtes contenant la partie Cter de Dys. La séquence de Dys chez la drosophile présente une homologie avec celle des mammifères. Il existe cependant des différences notables (fig 37). Si 24 répétitions spectrines ont été décrites dans la séquence de Dys chez les mammifères, seulement 11 sont retrouvées chez la drosophile. La répétition spectrine R1 est très conservée mais son rôle demeure inconnu. R2 est conservée et présente comme chez les mammifères, plusieurs résidus tryptophane dont deux conservés dans un cluster. Chez les mammifères, R2 et ses motifs tryptophane sont impliqués dans la liaison aux phospholipides et permet ainsi à la Dys de s'associer à la membrane plasmique (De Wolf *et al*, 1997 ; Le Rumeur *et al*, 2003). Cette connexion au plasmalemmes serait donc possible chez la drosophile. Par ailleurs, si l'actine se fixe au domaine actinine présent en Nter de Dys à la fois chez la drosophile et les mammifères, cette liaison est renforcée par une connexion du cytosquelette d'actine aux répétitions spectrines 11 à 14/15 chez la souris. Seule R11 est conservée chez la drosophile ; elle est constituée d'acides aminés très basiques qui favoriseraient son interaction avec l'actine. De plus, de nombreuses études récentes mettent également en lumière l'importance de l'interaction de Dys avec nNOS qui joue le rôle de neurotransmetteur dans la synapse. Par exemple, une surexpression de NOS dans le muscle squelettique chez des souris mdx sauve les anomalies aux jonctions neuro-musculaires. Cette interaction avec NOS s'effectue via Syn et implique les répétitions spectrines 16 et 17 de Dys chez les mammifères (Lai *et al*, 2009 ; Adams *et al*, 2018). Or, R16 n'est pas retrouvée chez la drosophile et R17 est très mal conservée. De plus, cette connexion implique le domaine PDZ de nNOS et, la seule NOS exprimée chez la drosophile n'en contient pas. Il paraît donc peu probable que Dys puisse interagir avec NOS chez la drosophile, contrairement à ce qui avait été suggéré dans certaines publications (Shcherbata *et al*, 2007 ; Taghli-Lamalle *et al*, 2011 ; Yatsenko *et al*, 2014). De plus, une interaction de Dys avec les microtubules a été décrite mais les domaines impliqués ne sont pas clairement définis et cette interaction ne paraît pas essentielle à la fonction de Dys (Prins *et al*, 2009 ; Belanto *et al*, 2016). Enfin, R22, R23 et R24 sont hautement conservées. Il a été récemment montré que R22 interagit avec Syn qui se fixe aussi sur l'extrémité Cter de Dys (Adams *et al*, 2018).

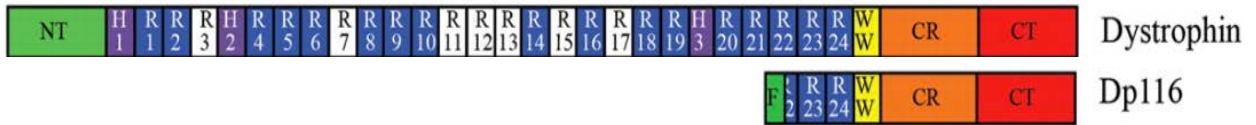


Figure 38 : Structure de l'isoforme courte de la dystrophine, Dp116.

Dp116 correspond à la séquence Cter de la dystrophine avec le domaine d'interaction au dystroglycan (WW et CR) et les domaines de liaison aux syntrophines et à la dystrobrevine (CT). Elle présente les deux dernières répétitions spectrines et ne possède pas de domaine actinine.

Le domaine Cter essentiel à l'interaction avec Dg et les domaines de liaison aux syntrophines et à la Db sont également très conservés.

Chez les Vertébrés, Dg est constitué de deux sous-unités codées par un même gène, résultant du clivage du pro-peptide traduit (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al*, 1992). Chez la drosophile, Dg est une protéine unique mais avec une forte conservation des domaines extracellulaires et des motifs retrouvés au niveau du domaine intracellulaire (Shcherbata *et al*, 2007).

C) L'isoforme courte de la dystrophine, Dp116

Dp116 est une isoforme non-musculaire courte de la Dys chez les mammifères. Elle est normalement exprimée dans les cellules de Schwann du système nerveux périphérique où elle se lie aux complexes DRP2/periaxine (Muntoni *et al*, 2003). Sa séquence est proche de celle de DRP2 et en l'absence de celle-ci, une augmentation du taux de Dp116 est observée pour compenser la perte de DRP2 (Sherman *et al*, 2012). Elle est constituée des deux dernières répétitions spectrines de la Dys (R23-24), du domaine d'interaction au Dg, du reste de l'extrémité Cter de la Dys (Judge *et al*, 2006 ; fig 38). Dp116 n'est donc pas capable de lier l'actine (Judge *et al*, 2006). L'expression de Dp116 sous le contrôle d'un promoteur spécifique du muscle squelettique chez la souris mdx aggrave la nécrose musculaire (Judge *et al*, 2006) mais elle améliore le phénotype chez les souris double-mutantes mdx:utr (Judge *et al*, 2011). En effet, chez ces dernières, l'expression musculaire de Dp116 améliore l'espérance de vie et restaure la croissance et la mobilité des souris. En revanche, les analyses histologiques de divers muscles montrent des inflammations et des nécroses similaires à celles observées chez les souris mdx:utr (Judge *et al*, 2011). L'isoforme humaine Dp71, exprimée dans le muscle, est proche de Dp116 mais elle ne parvient pas à restaurer le phénotype. Dp71 possède un domaine de liaison au Dg incomplet. La liaison au Dg est donc essentielle au sauvetage de la durée de vie, de la croissance et de la mobilité des souris mdx:utr, tandis que la connexion au cytosquelette d'actine paraît, de façon surprenante, non nécessaire (Judge *et al*, 2011).

Chez la drosophile, l'absence totale de Dys engendre une diminution de la durée de vie et des altérations des fonctions musculaires (Shcherbata *et al*, 2007). Au niveau cardiaque, des défauts d'organisation des myofibrilles surviennent tôt chez l'adulte et deviennent de plus en plus prononcés avec l'âge, démontrant que Dys est nécessaire à l'intégrité physique du muscle cardiaque (Taghli-Lamalle *et al*, 2008). De plus, les contractions rythmiques du cœur qui deviennent normalement progressivement irrégulières avec l'âge sont très élevées chez la jeune mouche adulte mutante pour Dys. Par ailleurs, les diamètres du tube cardiaque sont plus élevés en période de contraction et pendant la relaxation, révélant une cardiomyopathie dilatée chez les mouches mutantes pour Dys (Taghli-Lamalle *et al*, 2008). L'altération de la fonction systolique et le fait que la chambre cardiaque soit plus large sont aussi des symptômes retrouvés chez les patients DMD (Quinlan *et al*,

2004). L'expression de l'isoforme humaine Dp116 dans le cœur des mouches mutantes pour Dys sauve la cardiomyopathie en restaurant les périodes systoliques et diastoliques, les diamètres du tube cardiaque et le taux d'arythmie (Taghli-Lamalle *et al*, 2008).

Ces résultats étonnants montrent que Dys aurait des fonctions autres que sa fonction mécanique, importantes pour la survie et la physiologie cardiaque, indépendantes de sa liaison à nNOS et surtout au cytosquelette.

Préambule

L'élongation du follicule ovarien de drosophile constitue un modèle élégant de morphogenèse tissulaire impliquant la polarisation planaire basale de l'épithélium folliculaire dépendante de Fat2. Celle-ci induit une rotation des follicules qui participe à l'orientation polarisée des fibres d'actine basales et permet une sécrétion des fibrilles de MEC. Ces structures, orientées perpendiculairement à l'axe AP, formeraient un corset moléculaire contraignant la croissance médio-latérale du follicule et favorisant ainsi son élongation. Cependant, les relations entre les fibrilles de MEC et les fibres d'actine-F ne sont pas connues.

Nous avons identifié un défaut d'élongation chez les mutants *Dys* et *Dg* qui forment un complexe transmembranaire interagissant avec l'actine-F et la MEC. Des études cinétiques m'ont permis de déterminer l'influence de *Dys* et *Dg* sur les différentes étapes participant à la formation des éléments du corset moléculaire comme il a été décrit auparavant (Gutzeit, 1991 ; Haigo et Bilder, 2011) : la rotation, le dépôt des fibrilles de MEC et l'orientation des fibres d'actine. J'ai ainsi identifié deux fonctions nouvelles du complexe *Dys/Dg* : il s'avère indispensable à la formation des fibrilles polarisées de MEC et est également requis, tardivement, pour orienter les fibres d'actine-F. Nous avons démontré que les fibrilles seules ne sont pas suffisantes pour agir comme corset moléculaire mais qu'elles seraient requises pour orienter les fibres d'actine tardives, qui effectueraient ce rôle de corset moléculaire aux stades tardifs. Ces résultats suggèrent que *Dys/Dg* a deux fonctions successives et interdépendantes ; il emploierait les fibrilles de MEC comme trame pour orienter les fibres d'actine-F.

L'article qui suit n'a pas encore été soumis : des expériences sont encore en cours. Nous avons confirmé que la fonction tardive de *Dg* relève d'une fonction précoce du complexe mais nous devons confirmer que cette fonction précoce est bien la fonction d'organisation de la matrice polarisée. Nous avons montré que la surexpression de *Rab10* en contexte RNAi contre *Dg* sauve la formation des fibrilles de MEC mais ne sauve pas l'élongation. Il nous reste à déterminer si l'expression tardive de *Dg* dans cette expérience sauve alors la morphogenèse du follicule.

De plus, il apparaît que *Dys/Dg* a un rôle non essentiel dans l'orientation des fibres d'actine aux stades précoces. Son rôle pourrait être redondant avec la rotation à partir du stade 6 pour le maintien de l'alignement des fibres d'actine. Cette hypothèse doit être confirmée en bloquant la rotation au stade 5 chez des mutants *Dys*. Une interaction génétique entre Fat2 et *Dys* a, par ailleurs, été identifiée mais les quantifications des orientations des fibres d'actine doivent encore être réalisées.

Une étude de la localisation de *Dys* a également été réalisée. *Dys* est planaire polarisée pendant la migration collective des cellules folliculaires, soit pendant le dépôt des fibrilles de MEC. Cependant, en phase tardive, la localisation de *Dys* n'est pas claire. Un signal très faible émane du protein-trap de *Dys* employé. En revanche, l'emploi de transgènes de formes courtes de *Dys* montre

une localisation intéressante qui coïnciderait avec la fonction tardive de Dys. Il faut confirmer cette localisation de la protéine endogène. C'est pourquoi nous n'avons pas intégré ces données à l'article.

Enfin, une étude préliminaire de formes courtes de Dys visant à déterminer les domaines fonctionnels de Dys impliqués dans la formation des fibrilles de MEC et l'organisation du cytosquelette d'actine, suggère la possibilité d'une dimérisation de l'extrémité Cter de Dys avec la suite de répétitions spectrines.

Résultats

Oriented ECM fibrils contribute to tissue elongation by promoting F-actin planar polarization via the Dystrophin-Dystroglycan complex

Abstract

The elongation of the fly ovarian follicle is as model of tissue morphogenesis involving the extracellular matrix (ECM). It is proposed that, following a Fat2-dependent planar polarization of the basal domain of the follicle cells, oriented ECM fibrils and F-actin fibers constrain follicle growth, promoting its axial elongation. However, the relationship between ECM fibrils and F-actin fibers and their respective impact on elongation are unclear. We found that the Dystroglycan (Dg) and Dystrophin (Dys) are involved in ECM fibril deposition. Moreover, they also orient F-actin fibers in a cell autonomous manner, a function partially redundant with Fat2. However, F-Actin orientation also relies on the previous ECM fibril deposition, indicating two distinct but interdependent functions of Dg complex. Thus, this complex works as a critical organizer of the epithelial basal domain, acting on both F-actin and ECM. Moreover, ECM fibrils act as a template for the orientation of F-actin fibers, which are the main effector of elongation.

Introduction

Deciphering the mechanisms underlying tissue morphogenesis is key for our fundamental understanding of development and also becomes an important challenge for regenerative medicine. Building organs generally requires the precise modelling of an ECM basement membrane, which in turn can influence tissue shape (Dzamba and DeSimone, 2018; Sekiguchi and Yamada, 2018; Isabella and Horne-Badovinac, 2015). However, the mechanisms driving the assembly of a specific basement membrane (BM) and how this BM then feeds forward morphogenesis is still poorly understood. *Drosophila* oogenesis offers one of the best tractable examples in which such a morphogenetic process can be studied.

Each ovarian follicle, which is composed of a germline cyst surrounded by a somatic follicular epithelium, undergoes a dramatic growth, associated with a tissue elongation, starting from a little sphere and ending with an egg 3 fold longer in its anteroposterior (AP) axis than in its dorsoventral (DV) axis (Fig 1A). Though roughly linear from the early stages to the late stages, this elongation can be separated in at least two mechanistically distinct phases (Alégot *et al.*, 2018; Aurich and Dahmann, 2016). A first phase from stage 3 to stage 8 requires a double gradient of JAK-SAT pathway activity, emanating from each pole and controlling MyosinII-dependent apical pulsations (Alégot *et al.*, 2018). From stage 7-8, elongation depends on the atypical cadherin Fat2, which is part of a new planar cell polarity pathway orienting the basal domain of the epithelial follicle cells (Gutzeit *et al.*, 1991; Barlan *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; Viktorinová *et al.*, 2009). Fat2 function starts earlier during oogenesis giving a chirality to the cytoskeleton of the basal domain as soon as from the germarium, the structure from which bud the new follicles (Chen *et al.*, 2016). This chirality is required to set up a process of oriented collective cell migration perpendicular to the elongation axis, inducing revolutions of the follicles (Chen *et al.*, 2016; Viktorinová and Dahmann, 2013). The rotations, ending at late stage 8, allow the polarized deposition of ECM fibrils, via a secretion route to the lateral of the cells, these fibrils being still detectable until stage 12 (Haigo and Bilder, 2011; Isabella and Horne-Badovinac, 2016). Rotation also participates to the planar cell polarization of integrin-dependent basal stress fibers, oriented perpendicularly to the AP axis (Cetera *et al.*, 2014). It has also been shown that at stage 7-8, a gradient of matrix stiffness controlled by the JAK-STAT pathway and Fat2 contributes to elongation (Crest *et al.*, 2017). Then, from stage 9, the basal domain of the epithelial cells undergoes anisotropic oscillations, due to actin fiber orientation, which thus also promotes follicle elongation (He *et al.*, 2010). To explain the impact of *Fat2* mutant on tissue elongation, it is generally accepted that the planar cell polarization (pcp) of both F-actin fibers and ECM fibrils act as a molecular corset, constraining follicle growth in the mediolateral (ML) axis and thus promoting its elongation along the AP axis. However, it is still undetermined what is the exact contribution of F-

actin versus ECM proteins to this corset and whether the orientation of F-actin fibers and of ECM fibrils are causally linked.

Here we analyzed the implication of Dystrophin (Dys) and Dystroglycan (Dg) during follicle elongation. Dys and Dg interact together and are the two main components of the Dystroglycan (Dg)-Associated Protein Complex (DAPC), forming an evolutionary conserved transmembrane complex linking the ECM, via Dg, and the F-actin cytoskeleton, via Dys (Barresi and Campbell, 2006). This complex is expressed in large variety of tissues and is involved in a wide number of congenital disorders. Several reports in different model organisms based on loss of function approaches revealed an important morphogenetic role for Dg during development, usually linked to defects in the secretion, the assembly or the remodelling of the ECM (Clements *et al.*, 2017; Henry and Campbell, 1998; Satz *et al.*, 2010; Bello *et al.*, 2008; Buisson *et al.*, 2014; Naegeli *et al.*, 2017; Yatsenko and Shcherbata, 2014). Regarding Dys, the situation is less clear, probably in part because of the existence of several paralogs in vertebrates. *Drosophila* owns a single gene for *Dg* and *Dys* and it is therefore a promising model for their functional study.

We show that these two genes are required for proper ECM fibril formation whereas they only have a weak and late impact on elongation, suggesting a moderate contribution of the ECM fibrils to elongation. Moreover, we show a late cell autonomous effect on F-actin fiber orientation, concomitant to the main elongation defect in the mutants, arguing for a predominant implication of the F-actin fibers in the morphogenetic defect. Nonetheless, this latter function is also dependent on an earlier function of the DAPC in matrix fibril deposition. Thus, we propose that ECM fibrils are used as a template by the DAPC for the alignment of F-actin stress fibers. Finally, we show that the DAPC genetically interacts with Fat2 in different tissues, suggesting that they belong to a common morphogenetic network.

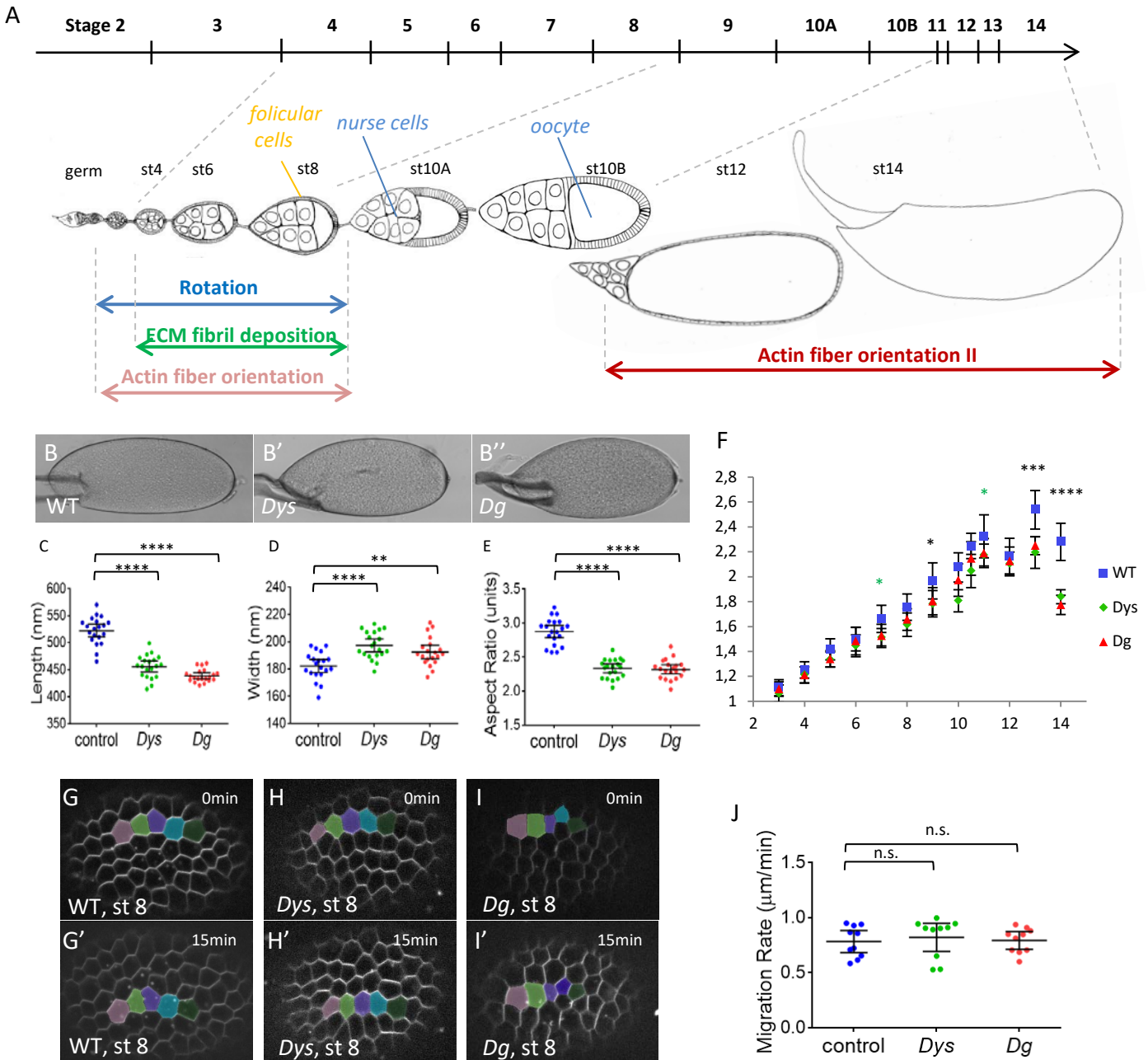


Figure 1 : The DAPC is involved in follicle elongation but not rotation.

A) Scheme of an ovariole with the main events involved in follicle elongation. The above line indicates the time scale of the different developmental stages. The ovariole is oriented anterior to posterior (germ: germarium). Each follicle is composed of a germline cyst surrounded by the follicular epithelium. Rotation occurs from very early to stage 8. It promotes F-actin fiber orientation and allows polarized ECM fibril deposition, both perpendicularly to the elongation axis. At stage 11, actin fibers lose their orientation and then progressively reorient (orientation II).

B) Representative mature eggs from B) WT, B') *Dys*^{E17/Exel6184} and B'') *Dg*^{O46/O83} females.

C,D,E) quantification of C) the length, D) the width, and E) the aspect-ratio for mature eggs from WT, *Dys*^{E17/Exel6184} and *Dg*^{O46/O83} mutant females.

H) Elongation kinetics of WT, *Dys* and *Dg* mutant follicles (n>6 for each point).

G,H,I) images of rotation movies of stage 7 G) WT, H) *Dys*^{E17/Exel6184} and I) *Dg*^{O46/O83} mutant follicles.

J) Velocity of WT, *Dys* and *Dg* mutant stage 7 follicles (n>8).

(For all panels error bars represent s.d.; p < 0.01, **<0.005, ***<0.001, ****<0.0001)

Results

Dys and Dg mutants reveal a third phase of elongation

Elongation of the *Drosophila* follicle implicates many components of the basal domain protein network. Therefore, we checked whether the DAPC could be involved in this process. Both *Drosophila Dg* and *Dys* null mutants are homozygous viable and we therefore used combinations of two different null alleles (Christoforou *et al.*, 2008). Mature eggs from mutant females for these genes were significantly shorter and wider (Fig. 1B, C, D) with an aspect-ratio (AR) around 2.3 compared with 2.9 in wild type (WT) follicles (Fig. 1E). Although this defect is not very strong, it is fully penetrant. Importantly, such phenotype can be rescued by restoring expression in the follicle cells, confirming that it is associated to these mutations, and indicating that the DAPC is required for elongation in the follicle cells (see below). Elongation kinetics in mutant and WT follicles indicate that such morphological differences appear mainly during the later stages of oogenesis (stages 12 to 14), though a slight, but significant, defect is observed around stage 8 (Fig. 1F). This elongation curve is clearly different from the one of *Fat2* mutants which strongly affect elongation from 7-8 stages (Alégot *et al.*, 2018; Aurich and Dahmann, 2016). Thus, the DAPC is involved in follicle morphogenesis and its specific temporal requirement suggests the existence of a third phase of elongation, mechanistically different from the *Fat2*-dependent second phase.

We therefore aimed to determine how the DAPC participates to follicle elongation and we first checked the collective migration of the cells inducing rotation during early stages because it is upstream of many subsequent events potentially important for elongation. Both *Dys* and *Dg* null mutant follicles rotate and their velocity is not significantly different from WT follicles (Fig. G-J). Thus, the DAPC is not involved in this collective migration. Thus, the DAPC works downstream, or in parallel, of the rotation and the initial pcp established by *Fat2* to promote elongation. We then focused our phenotypic analysis on the two events induced by the rotation, namely the deposition of ECM fibrils and the orientation of F-actin fibers.

The DAPC is important for ECM fibril deposition

The BM of the follicle cells contains two types of ECM, a general ECM, with no particular organization visible in confocal microscopy, and ECM fibrils, perpendicular to AP axis and deposited during rotation via a secretory route targeted to the lateral domain of the cells. These fibrils can be observed looking at the main components of the ECM, collagen IV, Perlecan (Pcan) and laminin, the two latter being direct *Dg* ligands (Gutzeit *et al.*, 1991; Haigo and Bilder, 2011; Isabella and Horne-Badovinac, 2016). Collagen IV and Pcan can be visualized using the viking and troll GFP protein trap, respectively (Morin *et al.*, 2001). Moreover, a fosmid containing the whole laminin A gene and

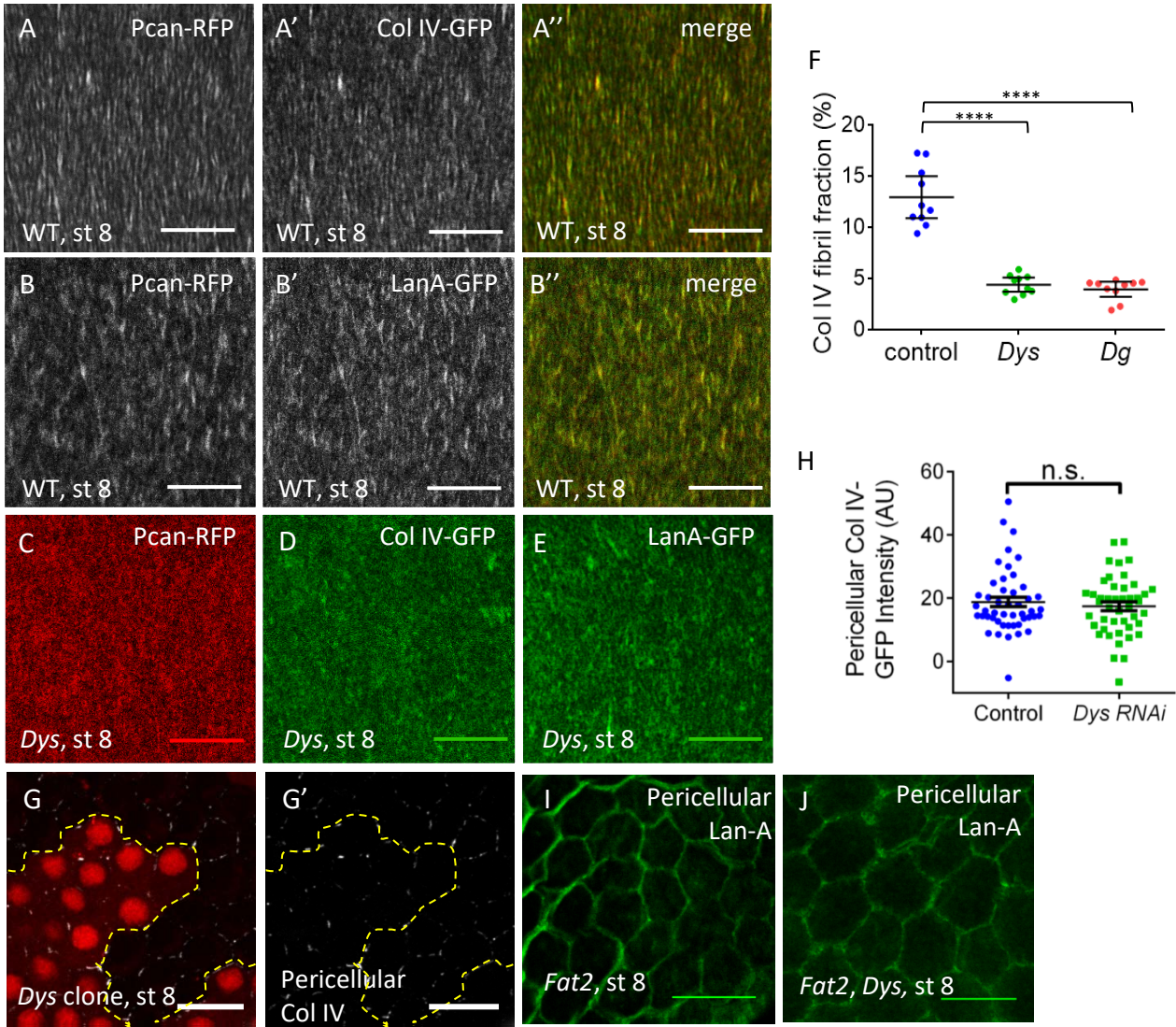


Figure 2: The DAPC is important for ECM fibril deposition

A-B) Basal view of wild-type follicle ECM at stage 8 visualized with A) Pcan-RFP and ColIV-GFP and B) Pcan-RFP and lanA-GFP

C) Basal view of *Dys*^{E17}/*Dys*^{Exel8164} follicles expressing C) Pcan-RFP D) ColIV-GFP E) LanA-GFP. E) Quantification of the fibrillary fraction at stage 8 in WT, *Dys*^{E17}/*Dys*^{Exel8164} and *Dg*^{O86}/*Dg*^{O43} mutant follicles (n> 10 follicles).

G) mutant clones for *Dys*^{Exel8164} marked by the absence of RFP and stained to detect pericellular colIV H) quantification of pericellular ColIV intensity in WT and *Dys* RNAi follicles

I)J) Accumulation of pericellular LanA in G) *Fat2* and h) *Fat2, Dys* mutant follicles.

For all panels error bars represent s.d.; p *< 0.01, **<0.005, ***<0.001, ****<0.0001. Scale bar 10µm

tagged with GFP has also been generated (Sarov *et al.*, 2016). Finally, we took advantage of the Mimic system to generate a RFP version of Pcan (Venken *et al.*, 2011). This line gives an identical pattern to troll-GFP and is homozygous viable and fertile indicating that it does not disrupt Pcan function (not shown). Thus, we compared the composition of the fibrils with these different tagged proteins (Fig. 2A-B). The exact colocalization of Pcan-RFP with both Viking-GFP and LanA-GFP indicates that ECM fibrils are uniformly composed of these three proteins, as previously shown based on immunostaining approaches (Isabella and Horne-Badovinac, 2016).

We then wondered whether ECM fibril deposition is affected in *Dys* and *Dg* mutants. In these two mutants, the general targeting of ECM secretion towards the basal domain is normal, with no visible apical secretion as it has been observed in different mutants affecting ECM secretion (S2A-C) (Denef *et al.*, 2008; Lerner *et al.*, 2013; Devergne *et al.*, 2017). However, images in the plan of the BM reveal a very strong decrease of the Viking positive ECM fibrils both in *Dys* and *Dg* null mutants (Fig 2D). This observation is also true for LanA and Pcan, two ligands of Dg (Fig 2C and E). Quantification of the fibrillary fraction on stage 8 follicles indicates that it corresponds to about 13% in the wild-type situation, but it drops to 4% in *Dys* and *Dg* mutants (Fig 2F). This effect seems to affect both the number and the length of the fibrils. As a result of this defect some fibrils are still visually observable in stage 12 WT follicles but not in *Dys* and *Dg* mutant ones (Fig S2 D,E,F). ECM fibril deposition has been shown to be increased by the overexpression of Rab10 (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). Moreover, it has been previously reported that ECM proteins accumulate between follicle cells overexpressing Dg (Yatsenko and Shcherbata, 2014). We therefore overexpressed Dg in these cells and check for the ECM appearance. Under such conditions, the fibrillary fraction is increased too (Fig. S2G) confirming the key role of the Dg in this process.

Thus, the DAPC is involved in the ECM fibril deposition. This deposition depends on the lateral secretion of ECM proteins and then the rotation induces their delivery and their orientation in the BM (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). The lateral secretion of ECM proteins can be visualized by immunostaining on non permeabilized follicle cells to detect only the protein localized between the cells. Such approach on *Dys* mutant clones and *Dys* RNAi show that some ECM protein is detected as between wildtype cells (Fig. 2 G, H). It suggests that *Dys* does not directly interfere with the lateral targeting of ECM secretion. In a mutant blocking rotation, such as *Fat2*, ECM proteins accumulate in the lateral space between cells, whereas no massive accumulation is observed in a *Dys* mutant, suggesting that the fibril defect associated with DAPC loss of function cannot be explained by a failure of the latest step of fibril deposition (Isabella and Horne-Badovinac, 2016) (Fig 2G,I). Moreover, in a double mutant *Fat2, Dys* we observed the same lateral accumulation of ECM as in a *Fat2* mutant, confirming that lateral secretion is not affected by DAPC loss of function (Fig. 2 I, J). It is therefore unclear by which mechanism DAPC contributes to fibril formation.

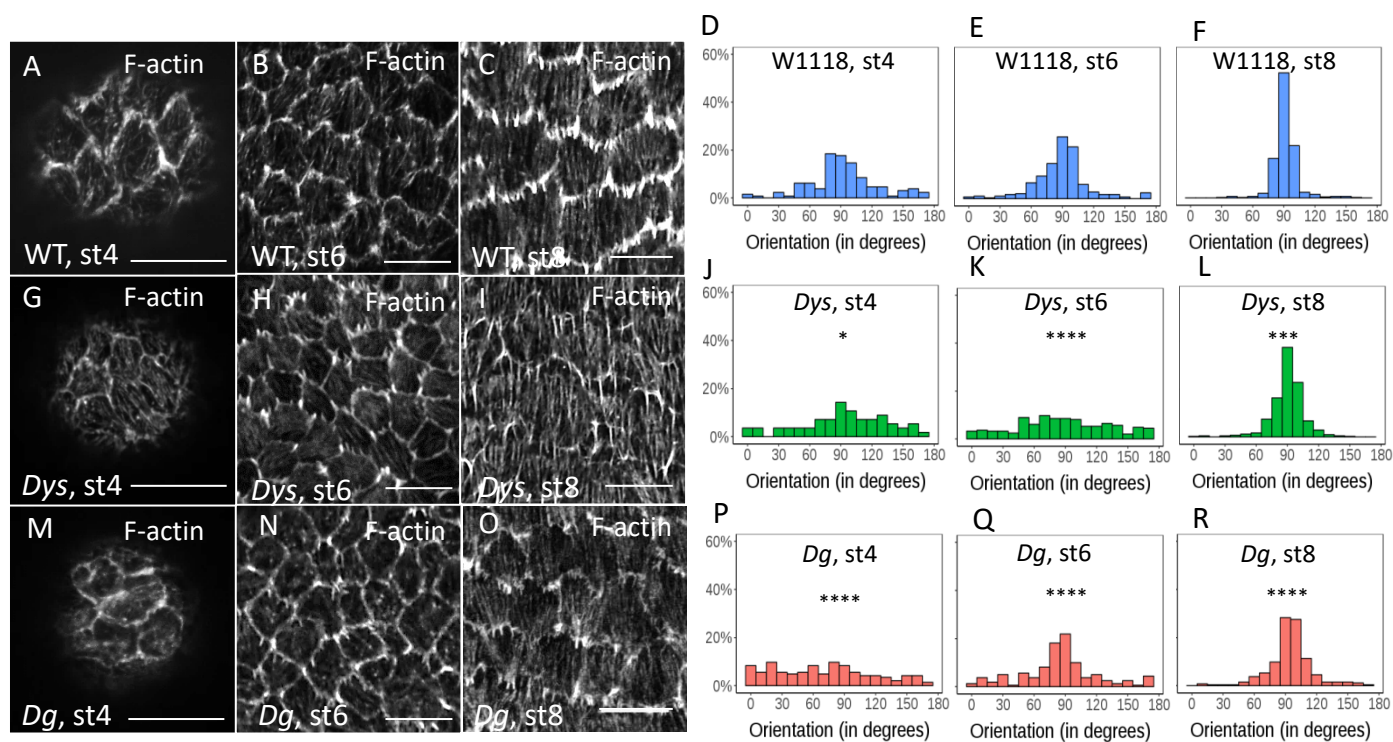


Figure 3 : F-actin fiber orientation defect in DAPC mutants during early stages

Representative images of basal F-actin in A,B,C) WT, G,H,I) *Dys*^{E17}/*Dys*^{Exel8164} and M,N,O) *Dg*⁰⁸⁶/*Dg*⁰⁴³ follicles at stage 4, 6 and 8 and D,E,F,J,K,L,P,Q,R) quantification of the corresponding angular distribution (n> 8 follicles). For all panels error bars represent s.d.; p *< 0.01, **<0.005, ***<0.001, ****<0.0001. Scale bar 10μm

Nonetheless, these mutants are the first examples of mutations that specifically affect ECM fibril deposition without any defect in the general basal secretion targeting and without any rotation defects, offering a unique opportunity to address the functional relevance of these fibrils.

DAPC participates to F-actin fiber orientation during early stages

In parallel to the analysis of ECM fibrils, we also studied the impact of the loss of the DAPC on basal F-actin organization. In the germarium, F-actin is organized in bundles strictly oriented in the ML axis. This alignment strongly decreases until stage 4 and then increases again to be maximal around stage 6, where stress fibers are nicely organized in all the cells until stage 9 (Fig 3A-F) (Cetera *et al.*, 2014). Both in *Dys* and *Dg* null mutants, quantification of the angular distribution of these fibers reveal a delay in their proper orientation at stage 4 and 6 (Fig 3E-R). Moreover, at stage 8, although in these mutants the actin fibers are globally oriented perpendicular to the AP axis, this orientation appears less precise than in wild-type cells. Statistical comparison of the angular distributions confirms that the F-actin fiber alignment is less robust in DAPC mutants. F-actin fiber orientation has been shown to be promoted by the rotation, but this collective cell migration is not affected by DAPC loss of function. It therefore suggests that this complex acts downstream or in parallel to the rotation to orient F-actin fibers.

DAPC is required for F-actin fiber orientation during early stages

Elongation curves of *Dys* and *Dg* mutants indicate that the major elongation defect appears around stage 12. Of notice, for undetermined reasons, stress fibers lose completely their planar polarization at stage 10B/11 but finally reorient properly around stage 12 (Delon and Brown, 2009; Wahlström *et al.*, 2006) fig 4A, B). In wild-type follicles, these changes can be observed by the angular distribution at stage 11 and stage 13 (Fig 4C,D). F-actin staining of *Dys* and *Dg* null mutants indicates that the fibers lose their orientation as in WT but then the reorientation of the F-actin fibers perpendicular to the AP axis does not occur (Fig4 E,F,I,J). Angular distribution even indicates a tendency of the fibers to be aligned in the AP axis at stage 13 (Fig4 G,H,K,L). Despite their misorientation, these fibers appear normal in structure, with for instance, a correct accumulation of integrins at their extremities (Fig S4). Importantly, mitotic recombination to generate mosaic tissues indicates that this function is cell autonomous for both *Dys* (not shown) and *Dg* (Fig 4M) with actin being misaligned only in the mutant cells in late stages. The defect is strictly cell autonomous as it is also observed in the mutant cells at the contact of wildtype cells and as wildtype cells at the contact of mutant cells are properly oriented (Fig 4N). Importantly, it cannot be a consequence of a primary effect on ECM fibril deposition because of follicle rotation moving the position of the clone with respect to ECM. It reveals, therefore, another function of the DAPC during follicle development.

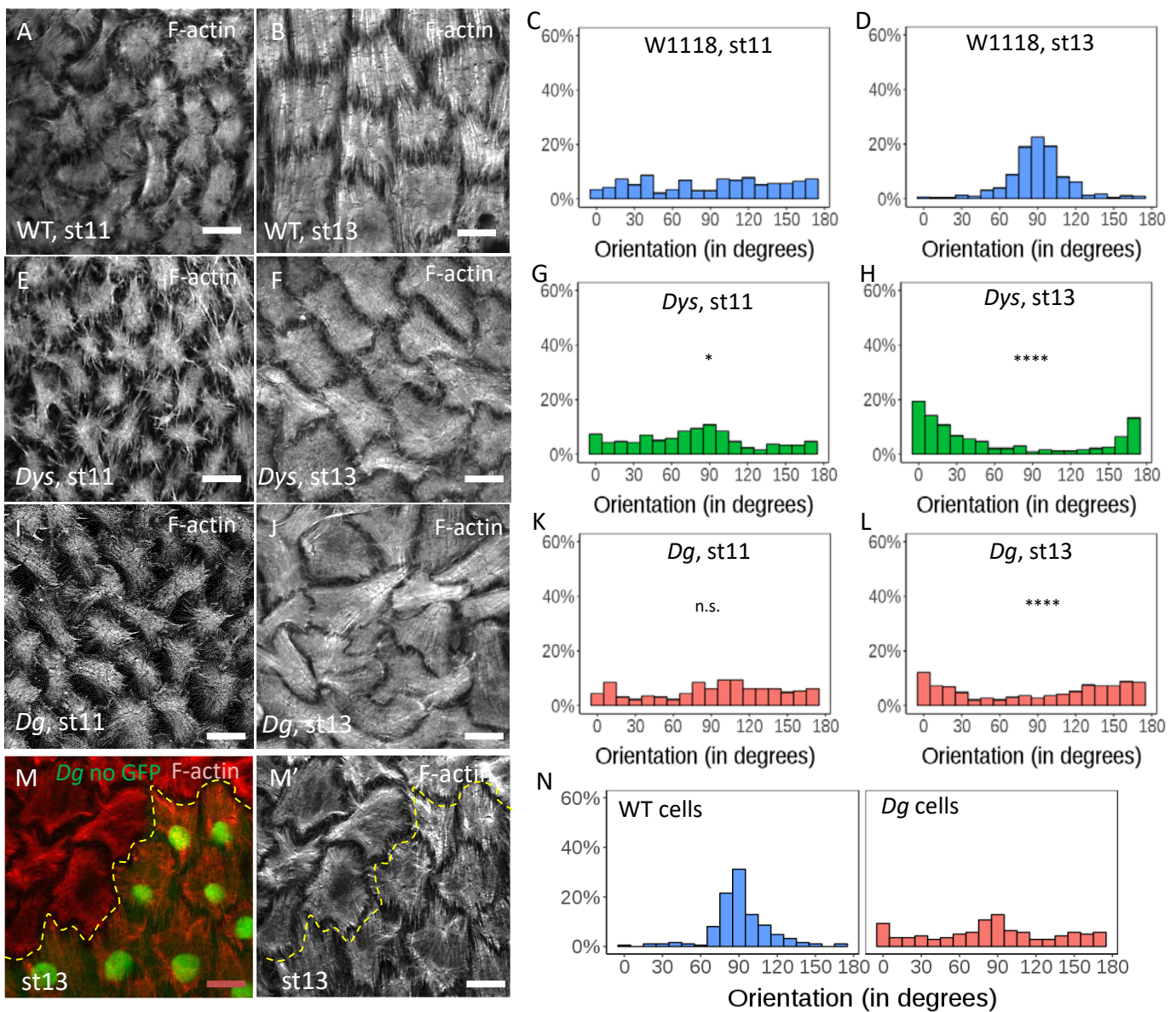


Figure 4 : F-actin fiber orientation defect in DAPC mutants during late stages

Representative images of basal F-actin in A,B) WT, E,F) *Dys*^{E17}/*Dys*^{Exel8164} and I,J) *Dg*⁰⁸⁶/*Dg*⁰⁴³ follicles at stage 11 and 13 and C,D,G,H,K,L) Quantification of the corresponding angular distribution (n> 5 follicles).

M) Representative images of basal F-actin in *Dg* mutant clone marked by the absence of GFP and N) Quantification of the corresponding angular distribution of the mutant cells and the neighbouring wildtype cells (n> 5 clones).

For all panels error bars represent s.d.; p < 0.01, **<0.005, ***<0.001, ****<0.0001.

Scale bar 10μm

Associated with the known direct association of the DAPC with F-actin, it suggests a rather direct function in fiber orientation, sensing a cue defining this planar polarization.

Late phenotype relies on both early and late functions

Since *Dys* and *Dg* mutants affect ECM fibril deposition and stress fiber orientation, we aim to determine whether one is preeminent on the other to explain the elongation defect. To address this question, we took advantage of the temporality of the DAPC function during oogenesis, being required for ECM fibril deposition during early stages and for stress fiber orientation mainly during later stages. Importantly, these three defects, follicle elongation, ECM fibril deposition and actin fiber orientation are recapitulated when RNAi against *Dg* is induced in follicles during all stages using Tj:Gal4 (fig 5 G-K). Moreover, expression of *Dg* during the whole oogenesis in the follicle cells in a mutant background rescues the elongation defect, the ECM fibril deposition and stress fiber orientation (Fig S5F,H,I,J,M). We also used Cy2:Gal4 which is only expressed in follicle cells from stage 9-10A (Fig S5V). Inducing RNAi against *Dg* with this driver allows to maintain ECM fibril deposition (Fig S5A,B) but to knock-down its expression during the second phase F-actin fiber orientation. As expected the F-actin fiber orientation is disrupted, confirming that this DAPC function is distinct from the one influencing the ECM (Fig S5C,D). Importantly, egg elongation is also affected (Fig S5E). Thus, ECM fibrils are not sufficient to drive follicle elongation and F-actin fiber orientation is necessary for it.

We also performed the reverse experiment by trying to rescue the late F-actin fiber orientation defect in a *Dg* mutant using Cy2:Gal4 and UAS:*Dg*. As expected, such follicle present ECM defect associated with *Dg* mutation (fig S5G,H). However, surprisingly, this genetic combination also fails to rescue F-actin fiber orientation (Fig S5K,L) and egg elongation (Fig S5M), indicating that late expression of *Dg* is not sufficient to restore its late functions, and, thus, that they also rely on a previous role of *Dg* during oogenesis.

To confirm these important observations we set up an alternative method to control the timing of *Dg* inhibition by RNAi using Tj:gal4 and Tub:gal80^{ts}, which is a thermosensitive Gal4 inhibitor allowing temporal control of its activity. We defined two conditions allowing Gal4 activity during early stages (switch from 30 to 18°C, “Early *Dg* RNAi”) or late stages (switch from 18 to 30°C, “Late *Dg* RNAi”) (Fig 5A). The best timing for the switches was determined using a UAS fluorescent reporter to separate expression during stages 1 to 8 from stages 10 to 14 (fig S5N-U). Moreover, positive and negative controls were performed at 18°C and 30°C (Fig 5). For each condition, an internal negative control with the same temperature was performed. *Dg* RNAi at 18°C is similar to control whereas at 30°C it recapitulates all the defects observed in *Dg* mutants. At the time of the dissection, stage 8 follicles of “late *Dg* RNAi” condition owns a ECM fibrillary fraction similar to control whereas it is affected in

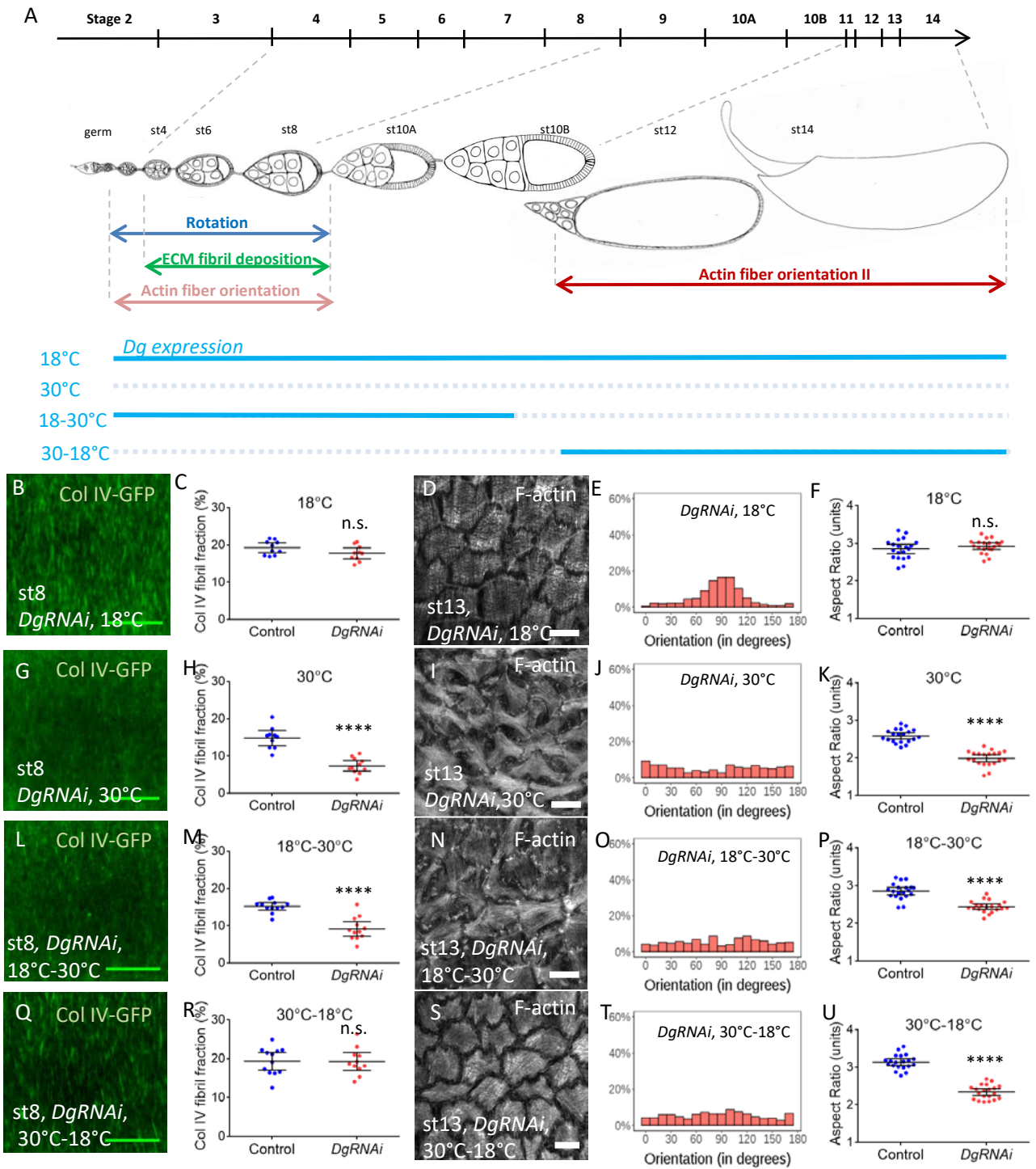


Figure 5 : The DAPC is required at two time frames for follicle elongation

A) Scheme of an ovariole with the main events involved in follicle elongation.

The above line indicates the time scale of the different developmental stages. The ovariole is oriented anterior to posterior (germ: germarium). Level on endogenous *Dg* is temporally controlled by the temperature (blue lines).

B,G,L,Q) Basal view of *Dg* RNAi stage 8 follicles expressing ColIV-GFP in the indicated condition and C,H,M,R) Quantification of the corresponding fibrillary fraction compared to control performed in the same temperature condition. Of notice, these images and quantifications are done on stage 8 from flies where the control of *Dg* expression was timed for mature eggs. In consequence, they have experienced the opposite *Dg* expression than the above blue lines.

D,I,NS) Representative images of basal F-actin of *Dg* RNAi stage 13 follicles in the indicated condition and E,J,O,T) quantification of the corresponding angular distribution.

F,K,P,U) Aspect-ratio quantification of *Dg* RNAi mature eggs in the indicated condition compared to control performed in the same temperature condition.

(For all panels error bars represent s.d.; p * < 0.01, ** < 0.005, *** < 0.001, **** < 0.0001)

stage 8 follicles of “early *Dg* RNAi”. These results confirm the efficiency of the temporal control in the two directions. It also means that late stage follicles in the same conditions have experienced an opposite effect, i.e. a normal fibrillary conditions in the “late *Dg* RNAi” and an affected once in “early *Dg* RNAi”. However, elongation and F-actin fiber orientation are affected in both conditions, confirming our previous results. Thus, the DAPC is required at two different time windows and its second function is dependent on the first one.

ECM fibril deposition is not sufficient for elongation

Overexpression of Rab10 increases the ECM fibrillary fraction and enhances follicle elongation, a phenotype opposite to the loss of function of the DAPC (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). We therefore decided to perform an epistasis test between these two conditions. Strikingly, concomitant overexpression of Rab10 and knock-down of *Dg* or *Dys* in follicle cells with Tj:Gal4 increases the amount of fibrils, as Rab10 does in a WT background and thus fully compensates for the absence of *Dys* (not shown) or *Dg* (Fig 6A). Classical interpretation of such a test would indicate that Rab10 is acting somehow downstream of the DAPC. However, late F-actin fiber orientation and mature egg elongation are affected as in *Dys* loss of function (Fig 6B,C). Thus, for elongation and actin fiber orientation, *Dys* should be placed downstream of Rab10. Thus, these results are coherent with the proposal that the DAPC owns two separated functions, one upstream and one downstream of Rab10. Moreover, it also confirms that in absence of the DAPC, ECM fibrils are not sufficient for elongation.

These results also offer a unique opportunity to demonstrate that the first function of the DAPC required for the later function in actin fiber orientation is ECM fibril deposition. We can add an UAS:Rab10 to the previous condition “Early *Dg* RNAi” . If this hypothesis is right, in such context, the UAS:Rab10 should rescue the ECM fibrils and the late expression of *Dg* should be then able to orient F-actin fibers and to induce elongation. These experiments are on going.

DAPC and Fat2 have partially redundant function.

We found that the DAPC is required for the late phase of F-actin fiber orientation whereas it has only a minor impact on early stages, suggesting that alternative mechanisms orient fibers at these stages (4-8). Similarly, deletion of the intracellular part of Fat2, (*Fat2-DeltaICR*) induces only an hypomorphic defect with only a slight delay in F-actin fiber orientation, despite a slower rotation (Aurich and Dahmann, 2016; Barlan *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017). Moreover, blocking rotation after stage 5 has no more impact on fiber orientation, indicating that another mechanism takes over (Cetera *et al.*, 2014). We therefore hypothesize that ECM fibrils acting as a template for F-actin fiber orientation via the DAPC complex could provide such mechanism. We therefore generated a double

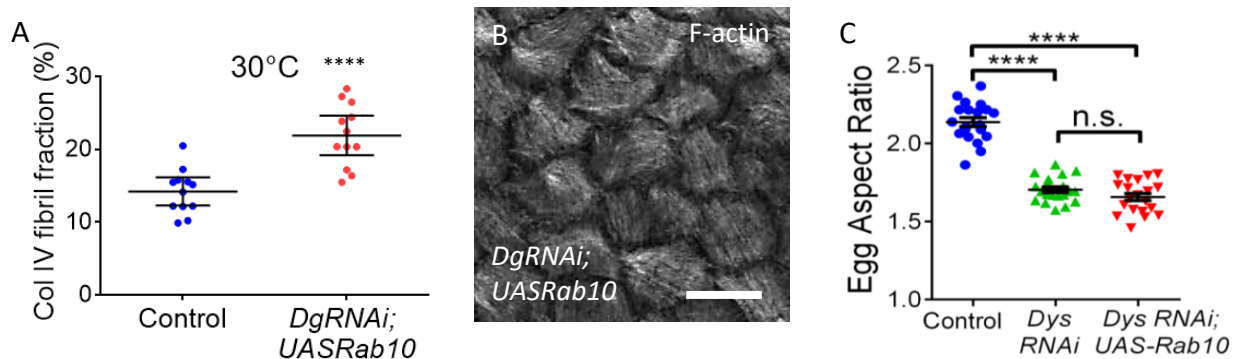


Figure 6 : Rescuing ECM fibrils is not sufficient for elongation in absence of the DAPC

A) Quantification of the fibrillary fraction at stage 8 for the indicated genotypes

B) Representative image of basal F-actin at stage 13 in UAS:Rab10, UAS:DgRNAi driven with Tj:Gal4

C) Quantification of the aspect-ratio for mature eggs for the indicated genotypes

For all panels error bars represent s.d.; p * < 0.01, ** < 0.005, *** < 0.001, **** < 0.0001.

Scale bar 10 μ m

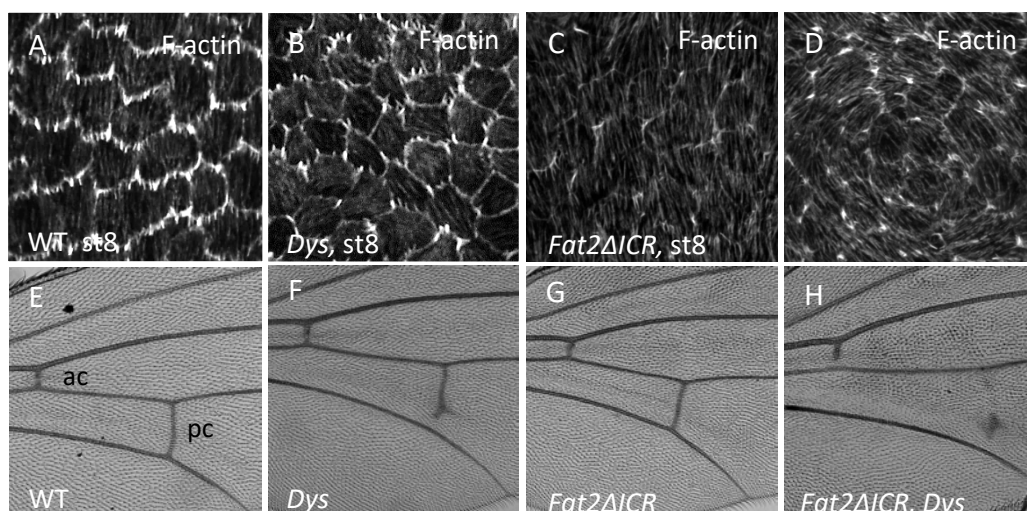


Figure 7 : Genetic interaction between Fat2 and Dys

Representative images of A-D) basal F-actin at stage 8 and E-H) wings of A,E) WT, B,F) *Dys* mutant, C, G) *Fat2-DeltaICR* mutant and G,H) *Dys, Fat2-DeltaICR* double mutant (pc: posterior crossvein, ac: anterior crossvein).

mutant background for *Fat2/ Fat2-DeltaICR* and *Dys*. Strikingly, these double mutants show a very strong F-actin fiber orientation defect during early stages (Fig 7A-D). These results suggest a synergic effect of the loss of the DAPC and of the intracellular part of Fat2. Thus, *Dys* and the intracellular part of Fat2 act redundantly to orient F-actin fibers during early stages.

We are currently testing if we observe the same kind of interaction between *Dys* and a RNAi blocking the rotation from stage 5. If positive, such result would confirm that once some ECM fibrils are deposited, the DAPC is redundant with rotation for F-actin fiber orientation.

These data suggest that Fat2 and the DAPC are part of a same functional network during follicle elongation, although they probably work in parallel once ECM fibrils are deposited. Intriguingly, *Dys*, *Dg* and *Fat2* mutants show a very specific defect in the wing, with a partial absence of the posterior crossvein, although the cellular bases explaining this defect are still unknown (Christoforou *et al.*, 2008; Viktorinová *et al.*, 2009)(Fig 7E,F). However, such defect is not observed in a *Fat2 / Fat2-DeltaICR* hypomorphic background (fig 7G). In the double mutant *Fat2 / Fat2-DeltaICR, Dys* flies, the posterior crossvein is usually completely absent or limited to a dot and the anterior crossvein, which is not affected in single mutant becomes incomplete (Fig7H). Although these defects still need to be quantified, they indicate a strong genetic interaction as observed in follicles. Thus, these results suggest that Fat2 and the DAPC work in parallel in a same network, which might be involved in many contexts.

Discussion

In this article, we show that the DAPC contributes to follicle elongation by two distinct functions, though the second relies on the output of the first one. These results bring significant conclusions both for the functions of this important complex and for the understanding of the morphogenetic mechanisms involving ECM.

Follicle elongation relies on multiple mechanisms

Based on genetics data it was already clear that follicle elongation relies on at least two different and successive mechanisms, a first one controlled by JAK-STAT and involving the apical domain of the follicle cells and a second one controlled by Fat2 and involving their basal domain and the ECM (Alégot *et al.*, 2018; Aurich and Dahmann, 2016). In between these two phases, around stage 7-8, JAK-STAT and Fat2 seem to be integrated in a third mechanism based on a gradient of ECM stiffness (Crest *et al.*, 2017). Here we show that the DAPC affects elongation mainly during the very late stages, suggesting the existence of a fourth mechanistic elongation phase. Of notice, the elongation at these late stages is also defective in *Fat2* mutants (Alégot *et al.*, 2018; Aurich and Dahmann, 2016). This is coherent with the fact that rotation is required for polarized ECM fibril deposition and that this deposition both depends on and is required for DAPC function. The existence of multiple and interconnected mechanisms to induce a process looking elementary underlies the complexity of morphogenesis and the necessity to explore it in simple models.

ECM fibrils act as a planar polarity cue and the F-actin as a molecular corset

Thus, Fat2 is clearly part of the upstream signal governing the basal polarization but how this polarization leads mechanically to tissue elongation is still debated. It has been proposed that the elongation relies on a molecular corset that could be formed, in a non-exclusive manner, by the ECM fibrils or the F-actin stress fibers (Gutzeit, 1990; Gutzeit *et al.*, 1991; Haigo and Bilder, 2011; Frydman and Spradling, 2001; Bateman *et al.*, 2001; Viktorinová *et al.*, 2009; Cetera *et al.*, 2014). The initial observation that rotation was required for both elongation and ECM fibrils favoured a direct mechanical role for these structures (Haigo and Bilder, 2011). Recent data showing that these fibrils are stiffer than the non-fibrillary fraction supports this view (Chlasta *et al.*, 2017). Moreover, increasing the number and the size of these fibrils can lead to an over-elongation (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). Finally, collagenase addition induces rounding of the follicles, at least at some stages (Haigo and Bilder, 2011; Chlasta *et al.*, 2017). This treatment indicates the ECM can be involved in the maintenance of the elongated shape but not necessarily in the elongation itself. Fat2 and rotation are also required for the proper orientation of the stress fibers. The F-actin molecular

corset is dynamic, with follicle cells undergoing basal pulsations and perturbation of both these oscillations and of the stress fiber structure affects elongation (Bateman *et al.*, 2001; He *et al.*, 2010). In the DAPC mutants we observed a faint but significant elongation defect during mid-oogenesis and a stronger one from stage 12. These defects are clearly correlated with the F-actin fiber orientation defects observed in the same mutants, both temporally and in terms of intensity. Moreover, rescuing the ECM fibrils in a *Dg* mutant by the overexpression of Rab10 does not rescue elongation indicating that F-actin fiber orientation is instrumental.

Thus, if the role of the ECM fibrils as a direct mechanical corset seems limited, what is their function? One possibility could have been that they promote rotation, acting in a positive feed-back and explaining speed increase over time. However, the rotation reaches the same speed in WT and DAPC mutants, excluding this possibility. In agreement, increasing fibrillary fraction has also no effect on rotation speed (Isabella and Horne-Badovinac, 2016).

Our results strongly argue that ECM fibrils act as a cue for the orientation of stress fibers, which then generate the mechanical strain for elongation. This appears clear in late stages where the cell autonomous function of the DAPC for stress fiber orientation is dependent on the previous formation of the ECM fibrils. Whereas it is unknown why the cells lose their orientation during few stages, the ECM fibrils provide a long term memory of the initial pcp of the tissue, allowing this reorientation. How ECM fibrils contributes to F-actin fiber orientation remains to be elucidated but we can hypothesise that it involves their higher stiffness or a higher density in binding sites for ECM receptors. The cell autonomous defect for actin pcp of the DAPC indicates that it is likely such receptor. Of notice, this kind of pcp is unusual because it does not require a signal transmission between neighbouring cells, which usually involves heterophilic interactions between them. However, an interesting parallel with the pcp established by Fat/Dachsous and the core pcp pathways could be drawn. The genetic interaction that we revealed between Fat2 and the DAPC suggests that robust basal pcp establishment also requires the integration of two independent mechanisms (Hale and Strutt, 2015). Importantly this genetic interaction applies to at least two tissues, suggesting a general functional link between them.

DAPC acts as an organizer of the basal domain of epithelial cells

We found that DAPC impacts the two key actors of the basal domain of the cells, namely the ECM and the cortical actin cytoskeleton linked to this ECM. In vertebrates, at least in some tissues, the presence of *Dg* seems essential for the assembly of a basement membrane (Henry and Campbell, 1998; Satz *et al.*, 2010; Bello *et al.*, 2008; Buisson *et al.*, 2014). However, the general assembly of the basal membrane of follicles cells does not require *Dg*, suggesting the existence of alternative scaffolds. Our genetic data suggest that Rab10 is epistatic to *Dg*. Usual interpretation of such result suggests that *Dg* is involved in the targeting of ECM secretion upstream of Rab10 rather than in ECM

assembly in the extracellular space. In *C. elegans*, Dg acts as a diffusion barrier to define a precise subcellular domain for ECM remodelling (Naegeli *et al.*, 2017). One could imagine that the DAPC serves a similar function in follicle cells, defining the position where Rab10 secretory route is targeted. However, in DAPC loss of function some ECM is still secreted in between the cells, suggesting that the lateral Rab10 route is actually not affected. Moreover, ECM proteins do not abnormally accumulate between the cells in DAPC loss of function, suggesting that they are able to leave this localization but without forming a fibril. The functional interplay between Rab10 and the DAPC is therefore still unclear.

As mentioned before, Dg has often been proposed to act as a scaffold to promote ECM assembly. In mice, deletion of the Dg intracellular part is only sublethal, indicating that the abolishment of its interaction with Dys affects only partially Dg function (Satz *et al.*, 2009). Especially, in such mouse assembly of laminin can be still observed, for instance in brain and the retina (Satz *et al.*, 2010; Clements *et al.*, 2017). Similar results were also obtained in cultured mammary epithelial cells (Weir *et al.*, 2006). Thus, despite the existence of Dys paralogs that could mask some effects on ECM and the fact that we observed the same ECM alteration in fly follicles mutant for *Dg* or *Dys*, all the Dg functions related to ECM assembly or secretion do not involve Dys. One possibility would be that Dys is required when Dg needs a very specific subcellular targeting for its function whereas a more general role in ECM assembly would be Dys independent. The existence of such function would suggest that some specific effects of Dys on ECM could have been underestimated and participate to explain the impact of its loss of function on tissue integrity maintenance, e.g. in muscle. For instance, Dg has been reported to influence ECM organization in fly embryonic muscles and it would be therefore interesting to determine whether it also involves Dys (Yatsenko and Shcherbata, 2014).

We also identified that the DAPC is involved in the planar polarization of basal cortical actin. This ability of the DAPC to read ECM structure to orchestrate integrin dependent adhesion could be involved in many developmental and physiological contexts. The link between ECM and F-actin provided by this complex is likely required for this function, though it remains to be formally demonstrated. ECM fibrils could provide local and oriented higher density of binding sites for Dg, the alignment could be then transmitted to the actin cytoskeleton. Alternatively, it opens the possibility that such function relies on the sensing of the mechanical ECM properties. The hypothesis that DAPC could act as a mechanosensor is a long standing proposal, in part due to the presence of the spectrin repeats in Dys protein (Brown and Lucy, 1993; Garbincius and Michele, 2015). The basal domain of the follicle cells may offer a tractable model to combine genetics and cell biology approaches to decipher such function.

Altogether, this work provides important insights on the role of ECM during morphogenesis, acting as a static pcp cue, which could present the advantage of its durability when cells are highly mobile. It also reveals important functions of the DAPC that could be broadly involved during animal development and physiology.

Methods

Genetics

The detailed genotypes, temperature and heat-shock conditions are given in the supplementary table 1.

Live imaging and rotation speed analysis

For live imaging, ovaries were dissected as described previously (Alegot *et al.*, 2018) with FM464 to stained the membranes. Samples were cultured for less than 1 hour before imaging. Damaged follicles were spotted based on abnormal FM464 incorporation and not analyzed. Rotation speed analysis was performed using Fiji Manual Tracking plug-in. For each follicle, speed was measured at three independent positions over a duration of 30min.

Dissection and immunostaining

Dissection and immunostaining were performed as described previously (Vachias *et al.*, 2014) with the following exceptions: ovaries were dissected in Supplemented Schneider, each ovarioles were separated before fixation to obtained undistorted follicles. Images were taken using a Leica SP5 or SP8 confocal microscope. Stage determination was done using unambiguous reference criteria, which are independent of follicle shape (Spradling *et al.*, 1993). F-actin was stained using fluorescent die coupled phalloidin.

Moreover, immunostaining of the pericellular ECM was performed as described using GFP antibody on ColIV-GFP flies or using LanA antibody (Volk lab).

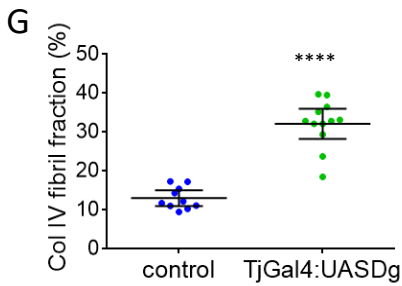
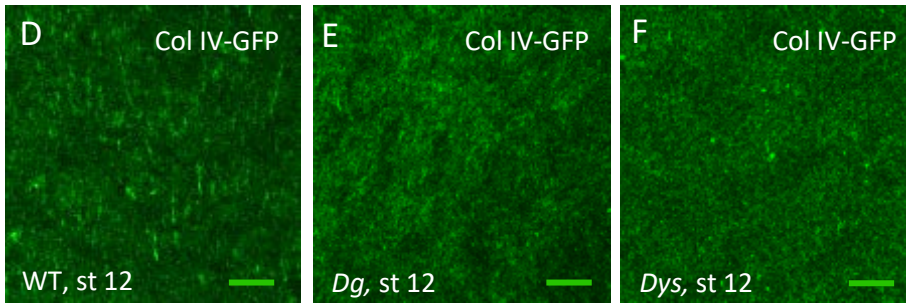
AR determination

Measures of the length of the long and short axis of each follicle on the transmitted light channel were made directly on the microscope and then used to determine the aspect ratio.

ECM fraction and F-Actin orientation quantification

ECM fibril fraction was determined using a homemade FIJI macro, using the same principles than developed in (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). After manual cell segmentation, the orientation of F-actin fiber of each cell was globally performed as in (Cetera *et al.*, 2014). Then, the angular distribution of these orientations were plotted.

Figures were assembled using ScientiFig (Aigouy, & Mirouse 2013).



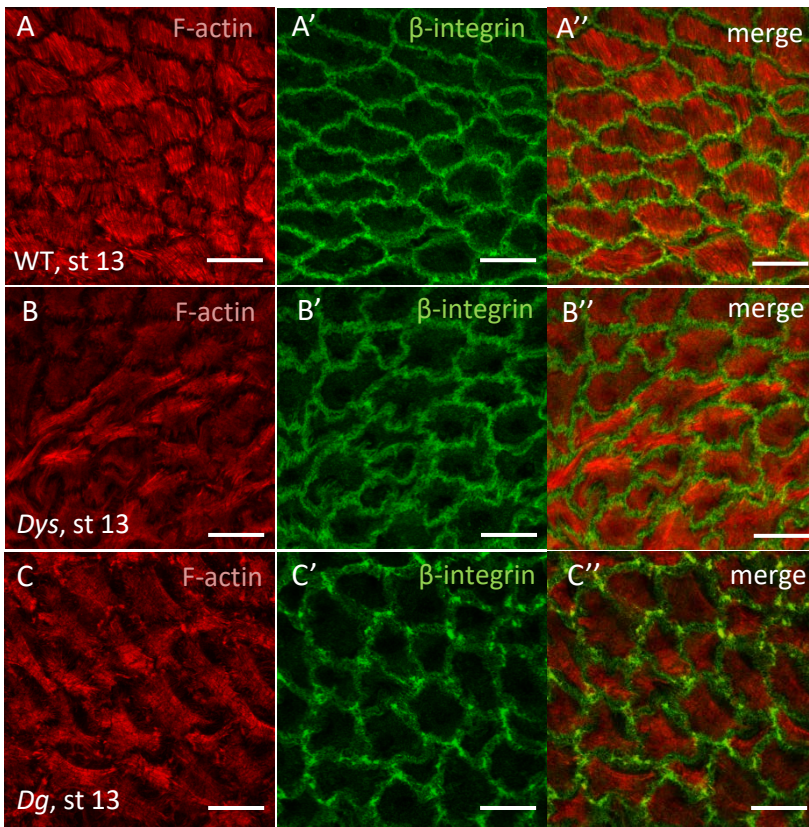
Supplemental figure 2 :

A-C) Optical cross-section of stage 7 WT, *Dg* and *Dys* null mutant follicles that express Vkg-GFP and stained for F-actin.

D-F) basal view of the ECM of stage 12 WT, *Dg* and *Dys* null mutant follicles that express Vkg-GFP.

G) Quantification of the fibrillary fraction at stage 8 in control and *Tj>UAS:Dg* follicles

For all panels error bars represent s.d.; p * < 0.01, ** < 0.005, *** < 0.001, **** < 0.0001. Scale bar 10µm

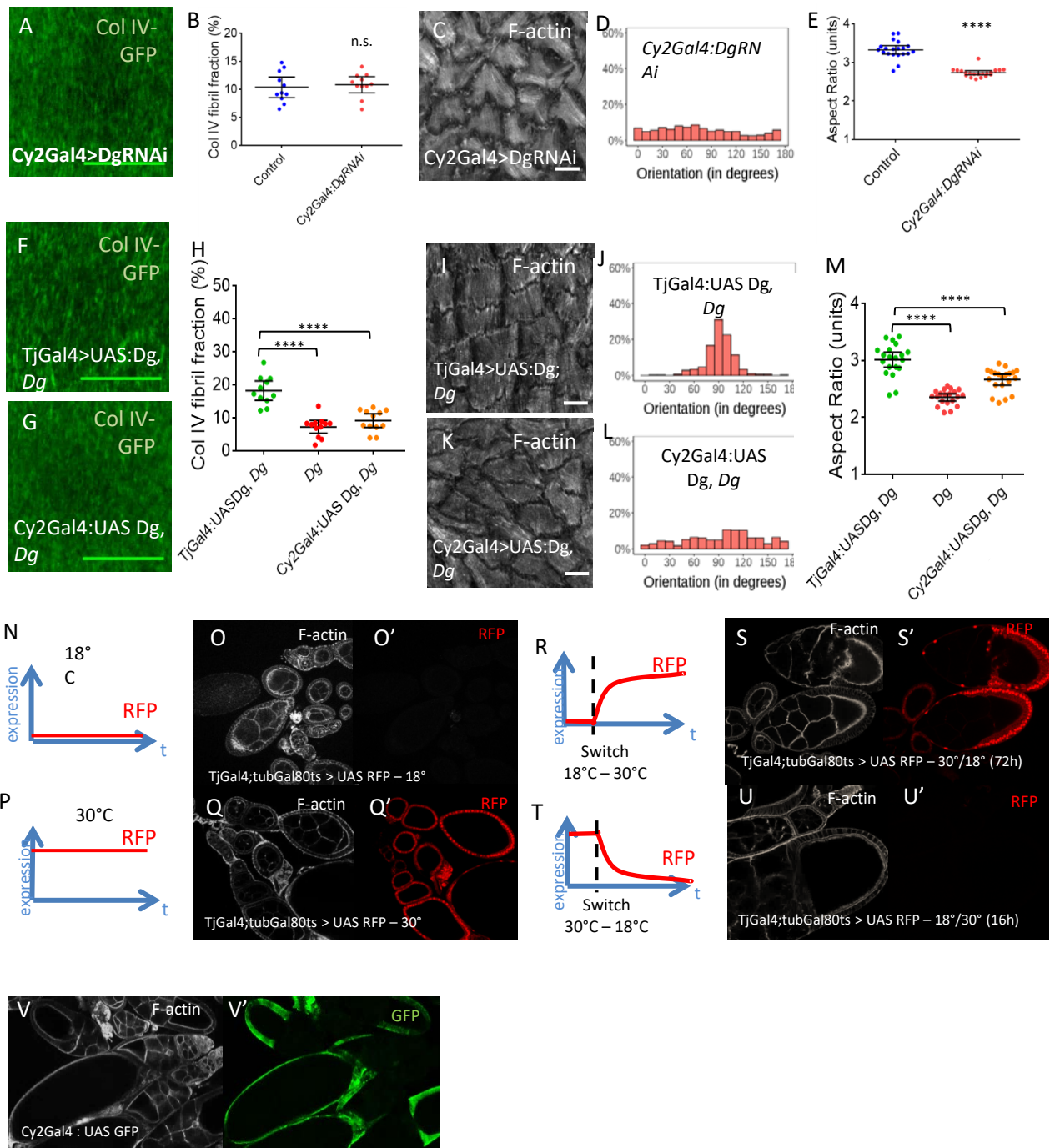


Supplemental figure 4 :

F-actin and Beta-integrin staining in A) WT, B)

Dys and C) *Dg* mutant follicles at stage 13.

Scale bar 10 μ m



Supplemental Figure 5:

A,F,G) Basal view of the ECM at stage 8 of A) *Dg* RNAi driven with Cy2 gal4, F) *Dg* mutant expressing UAS:*Dg* RNAi driven with Tj:gal4, G) *Dg* mutant expressing UAS:*Dg* RNAi driven with Cy2:gal4

B,H) Quantification of the fibrillary fraction for the indicated genotypes.

C,I,K) Representative images of basal F-actin at stage 13 of C) *Dg* RNAi driven with Cy2 gal4, I) *Dg* mutant expressing UAS:*Dg* RNAi driven with Tj:gal4, K) *Dg* mutant expressing UAS:*Dg* RNAi driven with Cy2:gal4

D,J, L) quantification of F-actin fiber angular distribution of the same genotypes than in C,I,K).

E, M) Aspect-ratio quantification of mature eggs of the indicated genotypes.

F,K,P,U) Aspect-ratio quantification of *Dg* RNAi mature eggs in the indicated condition compared to control performed in the same temperature condition.

N-T) Illustration of the temporal control of expression using Tj:Gal4 and Tub:Gal80^{ts} showing that the expression N,O) is blocked at 18° C, P,Q) is allowed at 30° C, R-T), is switched when the temperature changes.

V) Expression profile of Cy2:Gal4

(For all panels error bars represent s.d.; p * < 0.01, ** < 0.005, *** < 0.001, **** < 0.0001) Scale bar 10nm

Bibliography

- 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
- Aurich, F., and Dahmann, C. (2016). A Mutation in *fat2* Uncouples Tissue Elongation from Global Tissue Rotation. *Cell Rep* 14, 2503-510.
- Barlan, K., Cetera, M., and Horne-Badovinac, S. (2017). *Fat2* and *Lar* Define a Basally Localized Planar Signaling System Controlling Collective Cell Migration. *Dev Cell* 40, 467-477.e5.
- Barresi, R., and Campbell, K.P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 119, 199-207.
- Bateman, J., Reddy, R.S., Saito, H., and Van Vactor, D. (2001). The receptor tyrosine phosphatase *Dlar* and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. *Curr Biol* 11, 1317-327.
- Bello, V., Sirour, C., Moreau, N., Denker, E., and Darribère, T. (2008). A function for dystroglycan in pronephros development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 317, 106-120.
- Brown, S.C., and Lucy, J.A. (1993). Dystrophin as a mechanochemical transducer in skeletal muscle. *Bioessays* 15, 413-19.
- Buisson, N., Sirour, C., Moreau, N., Denker, E., Le Bouffant, R., Goullancourt, A., Darribère, T., and Bello, V. (2014). An adhesome comprising laminin, dystroglycan and myosin IIA is required during notochord development in *Xenopus laevis*. *Development* 141, 4569-579.
- Cetera, M., Ramirez-San Juan, G.R., Oakes, P.W., Lewellyn, L., Fairchild, M.J., Tanentzapf, G., Gardel, M.L., and Horne-Badovinac, S. (2014). Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation. *Nat Commun* 5, 5511.
- Chen, D.Y., Crest, J., and Bilder, D. (2017). A Cell Migration Tracking Tool Supports Coupling of Tissue Rotation to Elongation. *Cell Rep* 21, 559-569.
- 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 Rep* 15, 1125-133.
- Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J.L., Arias, L., Lamiré, L.A., Boudaoud, A., and Grammont, M. (2017). Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Development* 144, 4350-362.
- Christoforou, C.P., Greer, C.E., Challoner, B.R., Charizanos, D., and Ray, R.P. (2008). The detached locus encodes *Drosophila* Dystrophin, which acts with other components of the Dystrophin Associated Protein Complex to influence intercellular signalling in developing wing veins. *Dev Biol* 313, 519-532.
- Clements, R., Turk, R., Campbell, K.P., and Wright, K.M. (2017). Dystroglycan Maintains Inner Limiting Membrane Integrity to Coordinate Retinal Development. *J Neurosci* 37, 8559-574.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D.Y., Fletcher, D.A., and Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife* 6
- Delon, I., and Brown, N.H. (2009). The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *J Cell Sci* 122, 4363-374.
- Denef, N., Chen, Y., Weeks, S.D., Barcelo, G., and Schüpbach, T. (2008). *Crag* regulates epithelial architecture and polarized deposition of basement membrane proteins in *Drosophila*. *Dev Cell* 14, 354-364.
- Devergne, O., Sun, G.H., and Schüpbach, T. (2017). *Stratum*, a Homolog of the Human GEF *Mss4*, Partnered with *Rab8*, Controls the Basal Restriction of Basement Membrane Proteins in Epithelial Cells. *Cell Rep* 18, 1831-39.
- Dzamba, B.J., and DeSimone, D.W. (2018). Extracellular Matrix (ECM) and the Sculpting of Embryonic Tissues. *Curr Top Dev Biol* 130, 245-274.
- 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, 3209-220.

Garbincius, J.F., and Michele, D.E. (2015). Dystrophin-glycoprotein complex regulates muscle nitric oxide production through mechanoregulation of AMPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 13663-68.

Gutzeit, H.O. (1990). The microfilament pattern in the somatic follicle cells of mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* *53*, 349-356.

Gutzeit, H.O., Eberhardt, W., and Gratwohl, E. (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J Cell Sci* *100 (Pt 4)*, 781-88.

Haigo, S.L., and Bilder, D. (2011). Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science* *331*, 1071-74.

Hale, R., and Strutt, D. (2015). Conservation of Planar Polarity Pathway Function Across the Animal Kingdom. *Annu Rev Genet* *49*, 529-551.

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*, 1133-142.

Henry, M.D., and Campbell, K.P. (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* *95*, 859-870.

Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S. (2015). Building from the Ground up: Basement Membranes in *Drosophila* Development. *Curr Top Membr* *76*, 305-336.

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

Lerner, D.W., McCoy, D., Isabella, A.J., Mahowald, A.P., Gerlach, G.F., Chaudhry, T.A., and Horne-Badovinac, S. (2013). A Rab10-Dependent Mechanism for Polarized Basement Membrane Secretion during Organ Morphogenesis. *Dev Cell* *24*, 159-168.

Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., and Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15050-55.

Naegeli, K.M., Hastie, E., Garde, A., Wang, Z., Keeley, D.P., Gordon, K.L., Pani, A.M., Kelley, L.C., Morrissey, M.A., et al. (2017). Cell Invasion In Vivo via Rapid Exocytosis of a Transient Lysosome-Derived Membrane Domain. *Dev Cell* *43*, 403-417.e10.

Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M.Y., Schmied, C., Suchold, D., Stender, B., Janosch, S., K J, V.V., et al. (2016). A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *Elife* *5*, e12068.

Satz, J.S., Ostendorf, A.P., Hou, S., Turner, A., Kusano, H., Lee, J.C., Turk, R., Nguyen, H., Ross-Barta, S.E., et al. (2010). Distinct functions of glial and neuronal dystroglycan in the developing and adult mouse brain. *J Neurosci* *30*, 14560-572.

Satz, J.S., Philp, A.R., Nguyen, H., Kusano, H., Lee, J., Turk, R., Riker, M.J., Hernández, J., Weiss, R.M., et al. (2009). Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J Neurosci* *29*, 13136-146.

Sekiguchi, R., and Yamada, K.M. (2018). Basement Membranes in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol* *130*, 143-191.

Spradling, A.C., Bate, M., and Arias, A.M. (1993). The development of *Drosophila melanogaster*. *The Development of Drosophila Melanogaster* *1*, 1-70.

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 Rep* *9*, 531-541.

Venken, K.J., Schulze, K.L., Haelterman, N.A., Pan, H., He, Y., Evans-Holm, M., Carlson, J.W., Levis, R.W., Spradling, A.C., et al. (2011). MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nat Methods* *8*, 737-743.

Viktorinová, I., and Dahmann, C. (2013). Microtubule polarity predicts direction of egg chamber rotation in *Drosophila*. *Curr Biol* *23*, 1472-77.

Viktorinová, I., König, T., Schlichting, K., and Dahmann, C. (2009). The cadherin Fat2 is required for planar cell polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* *136*, 4123-132.

Wahlström, G., Norokorpi, H.L., and Heino, T.I. (2006). *Drosophila* alpha-actinin in ovarian follicle cells is regulated by EGFR and Dpp signalling and required for cytoskeletal remodelling. *Mech Dev* *123*, 801-818.

Weir, M.L., Oppizzi, M.L., Henry, M.D., Onishi, A., Campbell, K.P., Bissell, M.J., and Muschler, J.L. (2006). Dystroglycan loss disrupts polarity and beta-casein induction in mammary epithelial cells by perturbing laminin anchoring. *J Cell Sci* *119*, 4047-058.

Yatsenko, A.S., and Shcherbata, H.R. (2014). *Drosophila* miR-9a targets the ECM receptor Dystroglycan to canalize myotendinous junction formation. *Dev Cell* *28*, 335-348.

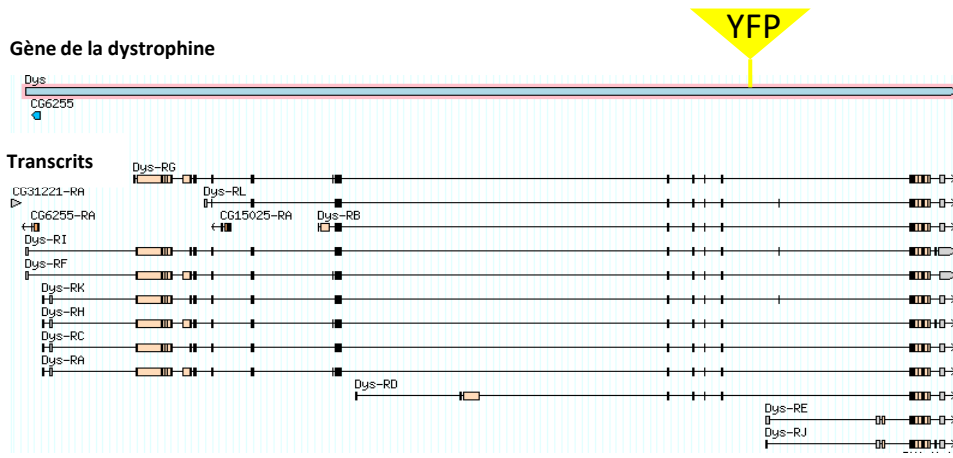


Figure 39: Le protein-trap de la dystrophine chez la drosophile

Représentation du locus du gène de la dystrophine situé sur le chromosome III de la drosophile – les différents transcrits résultants de l'existence de promoteurs et de sites d'épissages alternatifs sont représentés. L'insertion de l'élément transposable contenant l'exon YFP est indiquée par le triangle jaune.

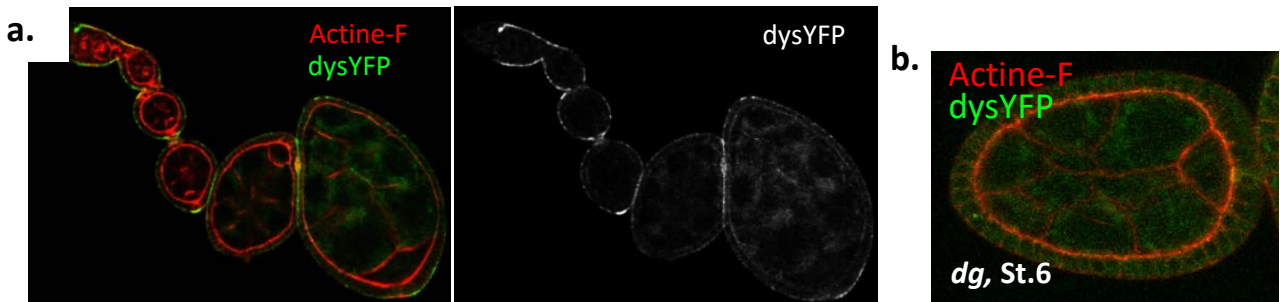


Figure 40 : Localisation de la dystrophine dans les follicules ovariens de drosophile

a. Plan médian d'un ovariole de drosophile de lignée Dys-Trap en imagerie confocale. L'actine-F est en rouge et la dystrophine est visualisée grâce à la YFP (en vert sur l'image de gauche, en blanc à droite). La dystrophine s'accumule au pôle basal de l'épithélium folliculaire. b. Plan médian d'un follicule mutant *dg*. La dystrophine est exprimée et s'accumule de façon diffuse dans le cytoplasme mais ne se retrouve pas localisée au domaine basal de l'épithélium folliculaire.

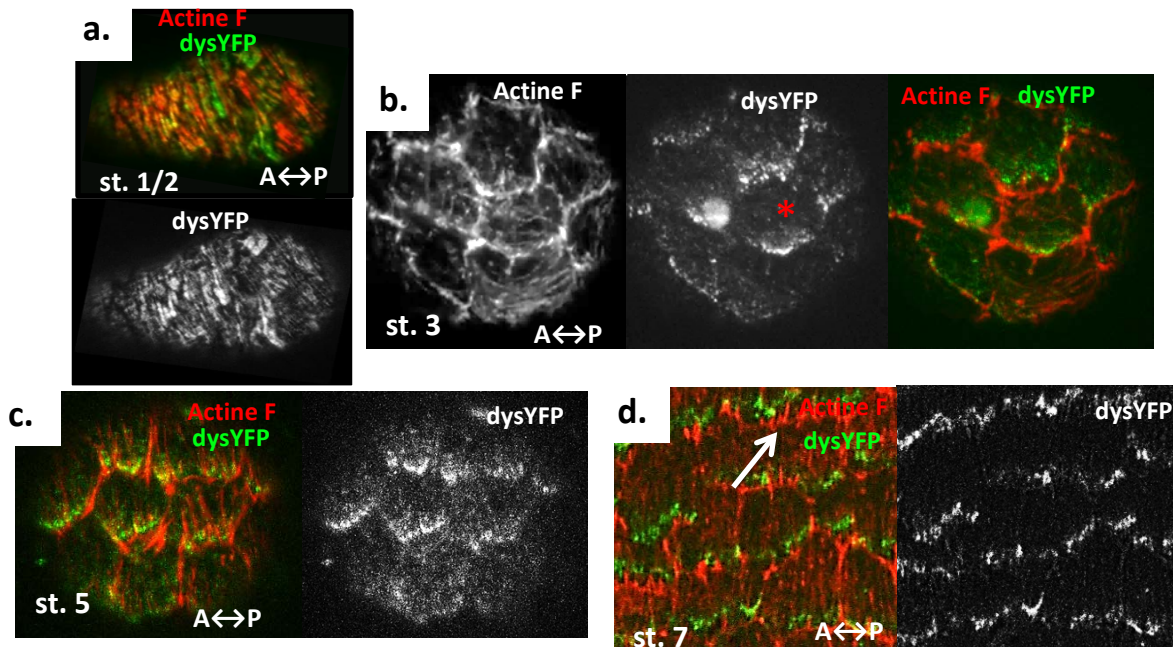


Figure 41 : Cinétique de la localisation basale planaire polarisée de la dystrophine dans l'épithélium folliculaire ovarien de drosophile

Images du domaine basal de l'épithélium folliculaire de drosophiles Dys-Trap à différents stades. L'actine-F est en rouge et la dystrophine, en vert ou en blanc. Les follicules sont orientés selon l'axe antéro-postérieur (AP) et les stades indiqués (st) sur les images. b) L'astérisque indique la cellule où les fibres d'actine sont déjà polarisées. d.) La flèche montre les protrusions riches en actine-F.

II Localisation de la dystrophine dans le follicule ovarien de drosophile

Les mutants *Dys* et *Dg* engendrent un défaut d'élongation du follicule ovarien, associé à l'absence de fibres polarisées de MEC et à un défaut d'orientation des fibres d'actine particulièrement expressif en phase tardive. J'ai cherché à caractériser la localisation de la *Dys* dans le follicule et à définir les facteurs impliqués dans cette localisation. Cette étude repose sur l'emploi d'un protein-trap de *Dys*, pour lequel un exon YFP est inséré au locus *Dys* (fig 39). Cette insertion ne paraît pas être délétère pour la fonction de la protéine ; elle n'a pas d'effet sur l'élongation du follicule notamment. Elle marque quasiment tous les isoformes de *Dys* présents chez la drosophile (fig 39).

A) La dystrophine est planaire polarisée pendant la phase de rotation

De par sa connexion à la MEC, via *Dg*, *Dys* est généralement associée à la membrane basale des cellules épithéliales. Des images du plan médian des follicules ovariens confirment sa localisation au pôle basal dans l'épithélium folliculaire et ce, dès le germarium et les tout premiers stades (fig 40a). L'absence de Dystroglycan engendre une perte totale de localisation basale de la *Dys* dans le follicule ovarien (fig 40b). La *Dys* est néanmoins exprimée et s'accumule de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium folliculaire. *Dg* n'intervient donc pas dans la régulation de l'expression et de l'accumulation protéique de la *Dys*, mais il est essentiel à sa localisation dans l'épithélium folliculaire.

Dys présente un certain degré de colocalisation avec les fibres d'actine basales (fig 41). Dès le stade 3, *Dys* commence à se positionner à l'extrémité des fibres d'actine du côté opposé aux protrusions riches en actine et acquiert donc, progressivement, une localisation planaire polarisée. Dans certains cas, la polarisation précoce est observable avant même que les fibres d'actine s'orientent perpendiculairement à l'axe d'élongation (fig 41). Cette localisation planaire polarisée de *Dys* s'établit progressivement ensuite dans toutes les cellules folliculaires. *Dys* forme alors des amas de taille variable, concentrés en arcs de cercle, perpendiculaires à l'axe AP, à l'arrière des cellules. Cette position a été confirmée par vidéo-microscopie (fig 42). Le film révèle en outre que les arcs semblent en permanence remodelés, suggérant une dynamique importante de la localisation de la *Dys*. Cependant, le signal YFP est faible et difficilement détectable en épifluorescence. Des constructions de protein-trap de *Dys* fusionnée à un exon RFP, en employant un site similaire d'insertion que *Dys*-YFP, n'ont révélé aucun signal suggérant un renouvellement rapide de *Dys* puisque la RFP est plus longue à être maturée et devenir fluorescente que la YFP.

La localisation planaire polarisée de *Dys* est totalement établie au stade 5 et maintenue jusqu'au stade 8, c'est-à-dire jusqu'à la fin de la phase de migration collective des cellules folliculaires

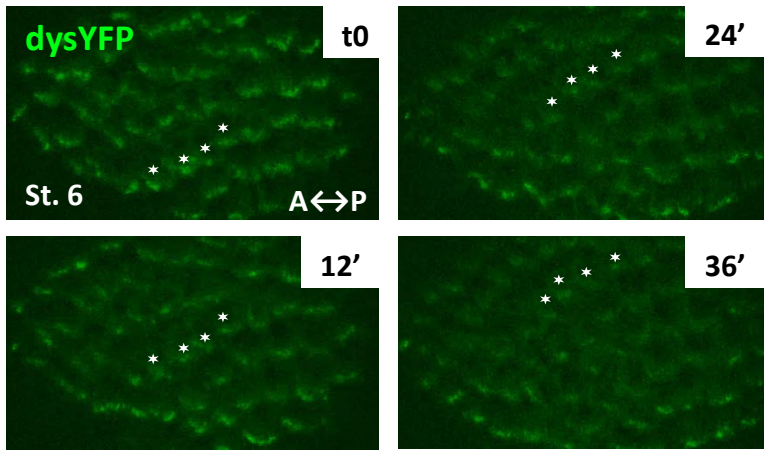


Figure 42 : Dynamique de la dystrophine dans le follicule ovarien chez la drosophile

Images tirées d'un film réalisé au microscope confocal d'un follicule Dys-Trap de stade 6 en culture. L'intervalle entre les images est de 12 minutes. Elles sont orientées selon l'axe AP. Une rangée de cellules est traquée (étoiles blanches). La dystrophine (en vert) se localise à l'arrière des cellules folliculaires par rapport au sens de la rotation.

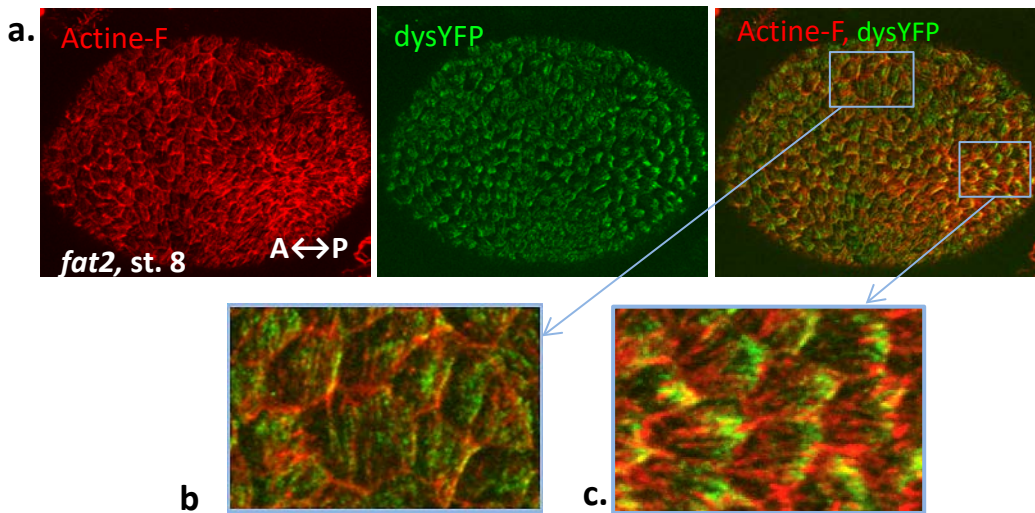


Figure 43 : Localisation de la dystrophine dans l'épithélium folliculaire de drosophiles *fat2*

Images du domaine basal d'un follicule de stade 8 de Dys-GFP dans un mutant *fat2*

a) La polarité planaire des fibres d'actine (en rouge) et de la dystrophine (en vert) est affectée.

b,c) Grossissements sur des régions de l'épithélium d'un même follicule.

b) La dystrophine n'est pas localisée correctement alors que l'actine est bien orientée.

c) La localisation de la dystrophine est planaire polarisée et corrélée à l'orientation de l'actine qui n'est pas perpendiculaire à l'axe AP.

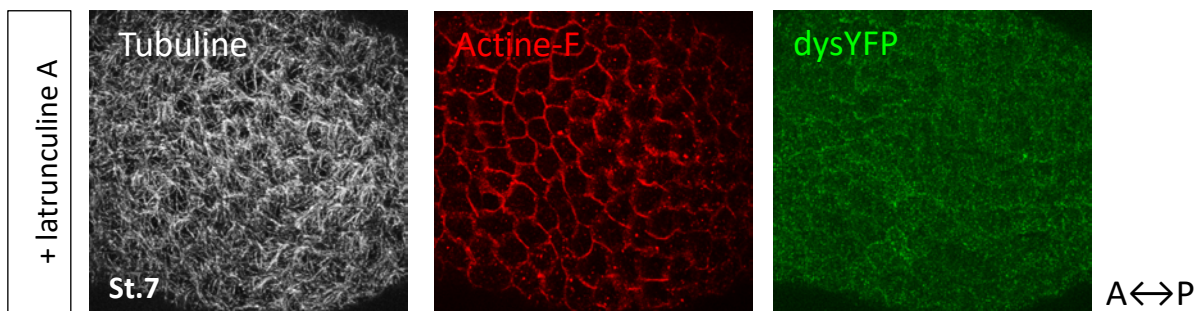


Figure 44 : Localisation de la dystrophine après traitement à la latrunculine A

Images du domaine basal d'un follicule Dys-Trap de stade 7, traité *ex vivo* 20 min à la latrunculine A. Cette drogue inhibe la polymérisation des fibres d'actine. Les microtubules (en gris) ne sont pas perturbés. Le cortex basal d'actine (en rouge) est affecté alors que de l'actine-F est toujours présente aux contours cellulaires. La dystrophine (en vert) perd sa localisation planaire polarisée. Les images sont orientées selon l'axe AP.

et donc du dépôt des fibrilles de MEC. Cette localisation pourrait donc être liée à l'impact de Dys sur le dépôt des fibrilles de MEC. Par ailleurs, Rab10 et les vésicules de Col IV sont aussi essentiellement présentes à l'arrière des cellules folliculaires, durant la rotation (Lerner *et al.*, 2013).

B) Une relation complexe entre dystrophine et cytosquelette

1. La polarisation planaire de la dystrophine est-elle dépendante de Fat2 ?

La localisation planaire polarisée de la Dys est affectée chez le mutant *fat2* : elle est correctement adressée au niveau basal des cellules de l'épithélium folliculaire, mais sa concentration en amas n'est pas forcément polarisée et se retrouve parfois au centre des cellules ou enrichie tout le long des fibres d'actine (fig 43). Par ailleurs, dans certaines régions des follicules, la Dys acquiert une localisation planaire polarisée sur quelques rangs de cellules mais cette polarité semble orientée de manière aléatoire par rapport à l'axe AP (fig 43). Une forme de polarité planaire pourrait donc émerger localement en absence de Fat2.

2. La polarisation planaire de la dystrophine implique-t-elle l'actine?

Le positionnement basal de la Dys est quasi-simultané avec l'orientation planaire polarisée des fibres d'actine et semble corrélé avec la direction de ces fibres, en contexte sauvage mais aussi chez le mutant *fat2*. La liaison des fibres d'actine à la Dys pourrait donc intervenir dans sa localisation. Pour tester cette hypothèse, un traitement à la latrunculine A a été réalisé pour inhiber la polymérisation des fibres d'actine. Au bout de 20 min, l'actine-F du cortex latéral des cellules est encore détectée mais les fibres du domaine basal sont complètement dégradées (fig 44). Ceci engendre une perte de polarité planaire de la Dys qui apparaît totalement diffuse sur l'ensemble du domaine basal (fig 44). L'actine-F est donc nécessaire au maintien de la localisation de la Dys.

3. Relation entre orientation des fibres d'actine et polarisation planaire de la Dystrophine

Puisque la localisation basale de la Dys implique l'actine-F et montre une colocalisation partielle avec les fibres basales d'actine, il est important de déterminer si ces fibres sont spécifiquement requises pour la polarisation de la Dys. Les complexes intégrines sont nécessaires pour la mise en place et le maintien de ces fibres (Bateman *et al.*, 2001). La mutation *mys* affecte le seul gène codant une sous-unité β -intégrine exprimé dans le follicule ovarien chez la drosophile et annihile donc totalement la fonction de ce complexe. Cette mutation étant létale à l'état homozygote, des clones mutants *mys* ont été générés. La localisation planaire polarisée de Dys est affectée dans les cellules mutantes pour *mys*, mais reste intacte dans les cellules avoisinant le clone mutant (fig 45). Les intégrines sont donc essentielles à la localisation planaire polarisée de la Dys et ce, de façon cellulaire autonome.

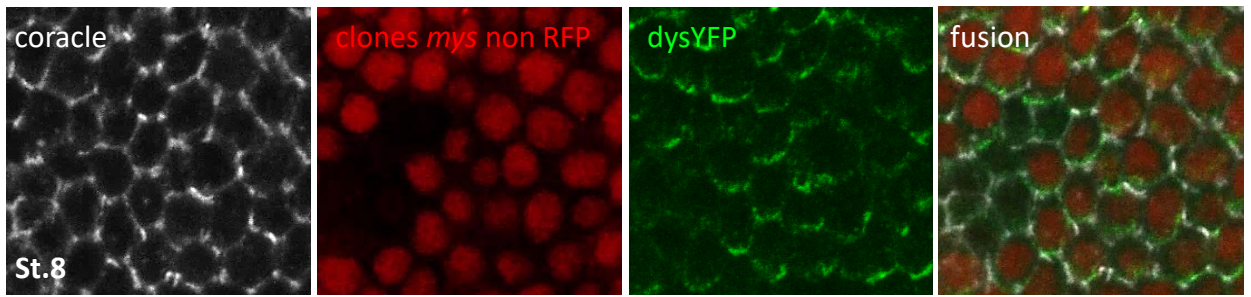


Figure 45 : Localisation de la dystrophine dans des clones mutants *mysosphéroïd* (*mys*)

Images du domaine basal d'un follicule Dys-Trap de stade 8 dans lequel un clone *mys* (non rouge) a été généré par recombinaison somatique Flp/FRT. L'immuno-marquage anti-coracle permet de distinguer les contours cellulaires (en blanc). La dystrophine (en vert) perd sa localisation planaire polarisée dans les cellules mutantes mais la conserve dans les cellules WT voisines. Les images sont orientées selon l'axe AP.

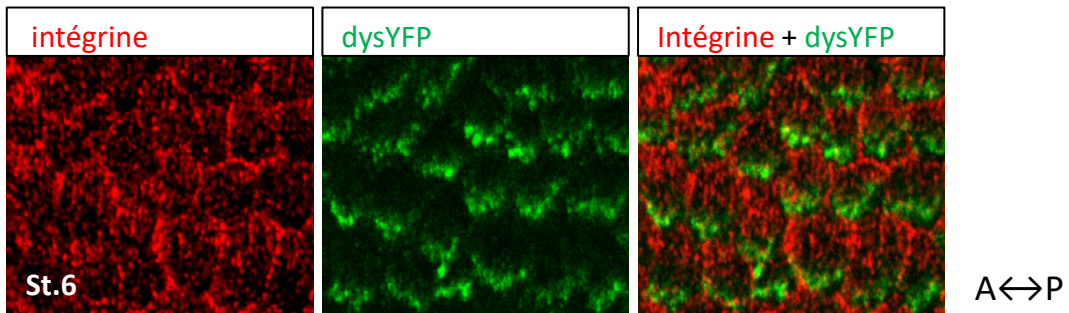


Figure 46 : Localisation de la dystrophine par rapport aux intégrines dans l'épithélium folliculaire

Images du domaine basal de follicules ovariens Dys-Trap (dystrophine en vert) ayant subi un immuno-marquage anti-intégrine (en rouge). Pas de co-localisation de la dystrophine et des intégrines. Les images sont orientées selon l'axe AP.

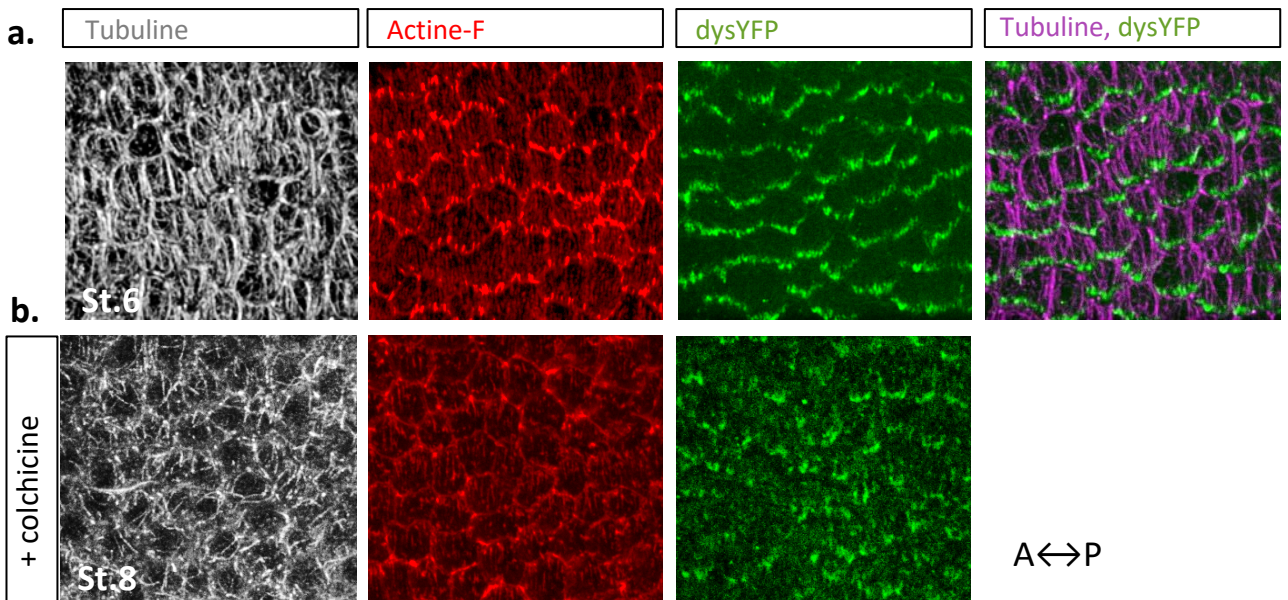


Figure 47: Localisation de la dystrophine dans des follicules traités à la colchicine

Images du domaine basal de follicules ovariens Dys-Trap. Marquage de l'actine et immunomarquage de la tubuline. Les images sont orientées selon l'axe AP.

- a) Témoin sans colchicine - pas de co-localisation des microtubules (magenta) et de la dystrophine (vert).
- b) Follicule de stade 8 traité *ex vivo* 1h à la colchicine. Cette drogue inhibe la polymérisation des microtubules. Ceux-ci (gris) sont partiellement affectés par le traitement. La localisation planaire polarisée de la dystrophine (vert) n'est pas perturbée mais son accumulation ne forme plus d'arcs. L'actine-F (rouge) est légèrement affectée.

Un immunomarquage anti-intégrine sur des mouches Dys-Trap révèle que la Dys et les intégrines ne sont pas colocalisées et sont même positionnées de façon exclusive au niveau basal de l'épithélium folliculaire, les intégrines étant majoritairement situées à l'avant des cellules folliculaires, et la Dys à l'arrière (fig 46). Aussi, cette expérience suggère fortement que l'impact des intégrines sur la Dys n'est pas direct et qu'il est dû au rôle des intégrines dans le maintien des fibres d'actine. La localisation de la Dys serait donc dépendante des fibres d'actine.

L'étude cinétique de la localisation de la Dys a révélé que celle-ci se met en place légèrement avant l'orientation des fibres d'actine. Elle paraît néanmoins renforcée lorsque l'actine s'oriente perpendiculairement à l'axe AP. De plus, le mutant *Dys* montre un phénotype d'orientation des fibres d'actine suggérant une fonction du complexe Dys/Dg en amont de celle-ci. Un rétrocontrôle positif serait ainsi exercé par les fibres d'actine sur la localisation de la Dys. Ce rétrocontrôle serait essentiel pour le maintien de la localisation basale planaire polarisée de la Dys. Cependant, il reste à déterminer comment cette localisation est initiée alors que les fibres d'actine ne sont pas orientées.

4. *Les microtubules sont-ils impliqués dans la polarisation planaire de la Dystrophine ?*

La localisation planaire polarisée de Dys commence à s'établir très précocement et est affectée par la mutation *fat2*. Or, la première marque de PCP dans le follicule ovarien est constituée par les microtubules dont l'orientation est également perturbée par la mutation *fat2* (Viktorinová et Dahmann, 2013). De plus, les microtubules établiraient un lien indirect avec la Dys pour l'adresser vers la membrane basale (Ayalon *et al.*, 2008). Pour évaluer si les microtubules sont impliqués dans la polarisation planaire de la Dys, un traitement à la colchicine, drogue bloquant la polymérisation des microtubules, a été réalisé *ex vivo* sur des follicules exprimant le Dys-Trap, pendant une heure. La localisation planaire polarisée de la Dys n'est pas perturbée (fig 47). Un impact sur le profil de sa concentration basale est cependant observé mais pourrait être secondaire à la déstructuration du cytosquelette basal d'actine-F engendrée par la dépolymérisation des microtubules (Viktorinová et Dahmann, 2013). Un immunomarquage anti-tubuline sur follicules Dys-Trap ne révèle pas de colocalisation ; les microtubules et la Dys ne seraient pas associés (fig 47). La localisation planaire polarisée de Dys ne serait donc pas liée aux microtubules.

C) *La MEC est-elle nécessaire à la localisation basale planaire polarisée de la Dystrophine ?*

Pour définir si la MEC est requise pour le maintien de la localisation basale de la Dys, des follicules de lignée Dys-Trap ont été traités à la collagénase afin de dégrader le collagène IV. Pour confirmer l'effet de la collagénase, des follicules de drosophiles d'une lignée portant un *protein-trap* du collagène IV (*Vkg-GFP*) ont subi le même traitement afin d'observer la dégradation du collagène

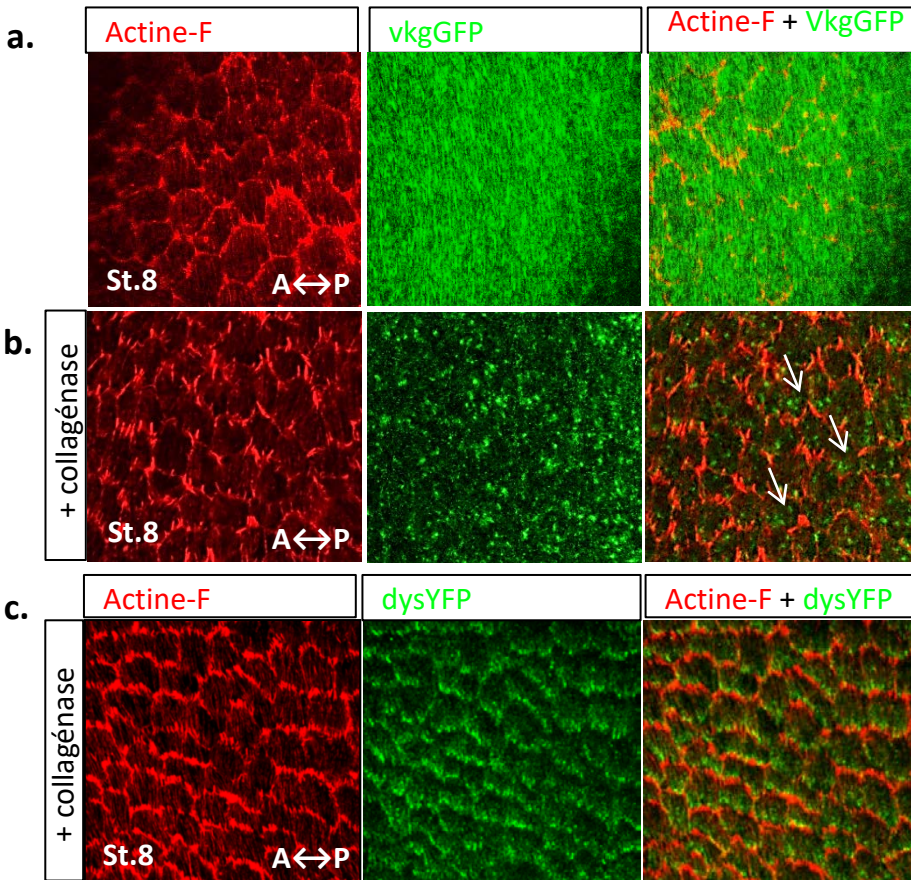


Figure 48 : Localisation de la dystrophine dans des follicules traités à la collagénase

Images du domaine basal de follicules Dys-Trap traités 30 min à la collagénase. Les images sont orientées selon l'axe AP.

a) Témoin VkgGFP (collagène IV en vert) sans collagénase avec actine-F en rouge.

b) Témoin VkgGFP traité à la collagénase - Il n'y a plus de collagène extra-cellulaire et on détecte des vésicules à l'arrière des cellules (flèches).

c) Traitement sur follicules Dys-Trap - La polarité planaire des fibres d'actine (en rouge) et de la dystrophine (en vert) est intacte.

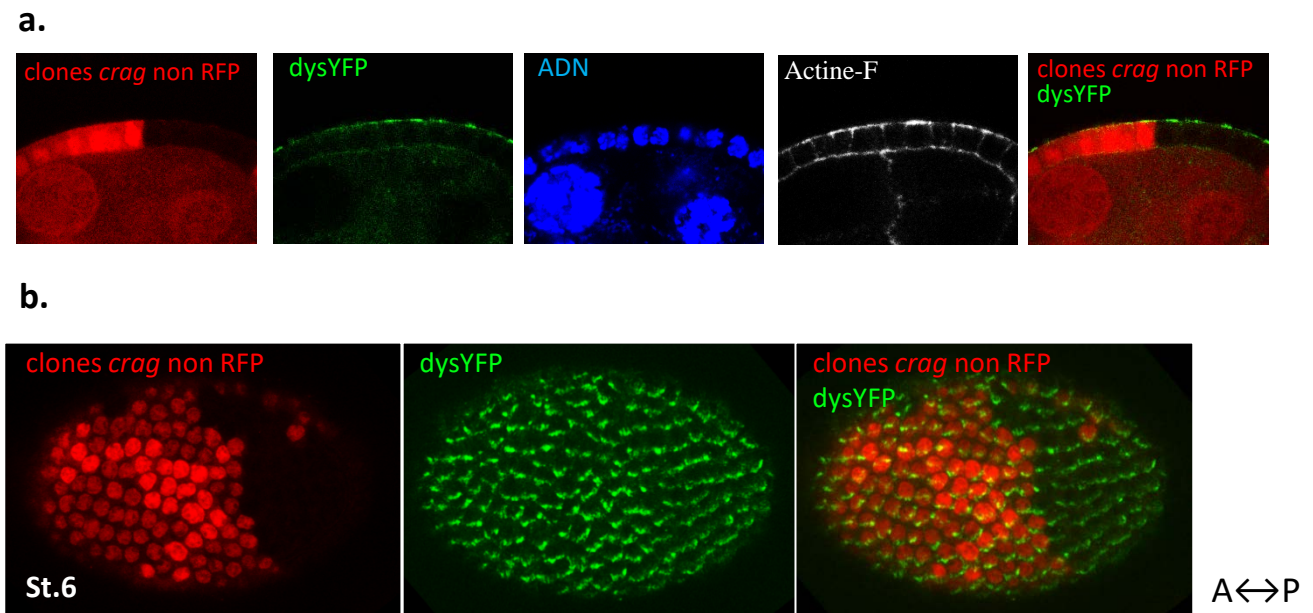


Figure 49 : Localisation de la dystrophine dans des clones mutants *crag*

a) Images d'un plan médial de l'épithélium d'un follicule ovarien Dys-Trap de stade 6 dans lequel ont été générés des clones mitotiques mutants pour *crag* n'exprimant pas la RFP (non rouges). Pas d'accumulation apicale de dystrophine (vert) dans le clone mutant *crag*.

b) Images du domaine basal de l'épithélium folliculaire. La dystrophine (en vert) présente une localisation similaire dans les cellules WT (rouges) et les cellules mutantes pour *crag*. Les images sont orientées selon l'axe AP.

autour des follicules (fig 48b). Un lot de drosophiles Vkg-GFP a également été disséqué sans traitement, en guise de contrôle (fig 48a). Dans les follicules ovariens de la lignée Dys-Trap, la collagénase n'a pas d'effet sur la localisation planaire polarisée de la Dys (fig 48c). Le collagène IV de la MEC n'est donc pas requis pour le maintien de la polarité planaire de la Dys, au moins sur la durée de l'expérience (30 minutes).

L'emploi de la collagénase sur les follicules Vkg-GFP permet de visualiser les vésicules intracellulaires de collagène IV proches de la membrane basale et confirme qu'elles sont principalement localisées à l'arrière des cellules, soit à la même position que la Dys (fig 48b). De plus, la localisation planaire polarisée de Dys n'est plus détectable à partir du stade 9. C'est à partir de ce stade que la rotation des follicules cesse et c'est donc aussi le moment où le dépôt des fibrilles polarisées de MEC est stoppé (Haigo et Bilder, 2011). La formation des fibrilles de MEC pourrait donc être liée à la localisation planaire polarisée du complexe Dys/Dg puisque celle-ci s'initie juste avant leur dépôt et s'achève de façon concomitante avec la rotation. Mieux analyser la dynamique de Dys pourrait aider à comprendre sa fonction. Un film de follicules Dys-Trap en culture a révélé une dynamique importante de la Dys mais celle-ci est difficile à analyser car le signal GFP du Dys-Trap est très faible et s'amenuise rapidement. Les conditions sont donc à optimiser en vue d'acquérir d'autres informations telles que l'éventuelle détection de vésicules mobiles associées à la Dys. Une lignée Pcan-RFP a été construite pour effectuer une étude de colocalisation entre Dys et les vésicules de MEC.

Enfin, pour déterminer si la localisation sub-cellulaire de Dys est dépendante de la voie de sécrétion de la MEC Crag/Rab10, des clones mutants *crag* ont été générés. La mutation *crag* engendre un défaut d'adressage de sécrétion de MEC (Denef *et al.*, 2008). Des coupes apico-basales de l'épithélium folliculaire ne révèlent aucune accumulation cytoplasmique ou apicale de la Dys donc, cette protéine est adressée à la membrane via un mécanisme indépendant de la voie de sécrétion Crag/Rab10 (fig 49a). De plus, des vues planaires du domaine basal montrent que la localisation planaire polarisée de la Dys n'est pas affectée dans les cellules mutantes pour *crag* (fig 49b). La voie d'adressage de Dys au pôle basal est donc indépendante de la voie Crag/Rab10.

D) Localisation de la Dystrophine en phase tardive

A partir du stade 9, le Dys-trap paraît diffus et de très faible intensité. Il ne présente plus de localisation planaire polarisée (fig 50). Au stade 11, un signal très faible paraît colocaliser avec les fibres d'actine et montre une intensité plus importante aux extrémités des fibres (fig 50). Des constructions de protein-trap, en employant les lignées MIMICs développées par Venken *et al.*, 2011, ont été réalisées. L'exon GFP a été inséré en fin de séquence du gène de la Dys, proche du site d'insertion précédent. Les résultats sont similaires, mais un signal de faible intensité est visible sur les

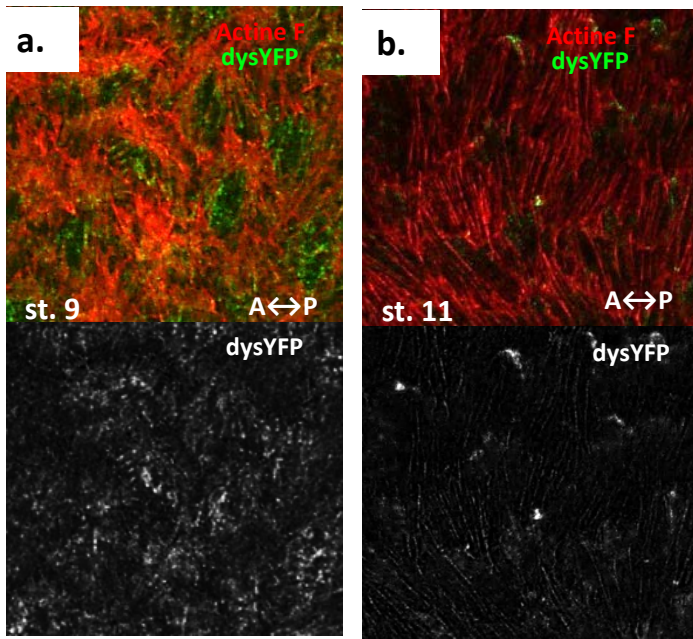


Figure 50 : Localisation basale de la dystrophine dans l'épithélium folliculaire ovarien de drosophile aux stades 9 et 11

Images du domaine basal de l'épithélium folliculaire de drosophiles Dys-Trap aux stades 9 et 11. L'actine-F est en rouge et la dystrophine, en vert ou en blanc. Les follicules sont orientés selon l'axe antéro-postérieur (AP) et les stades indiqués (st) sur les images.

a. Gène codant dystrophine

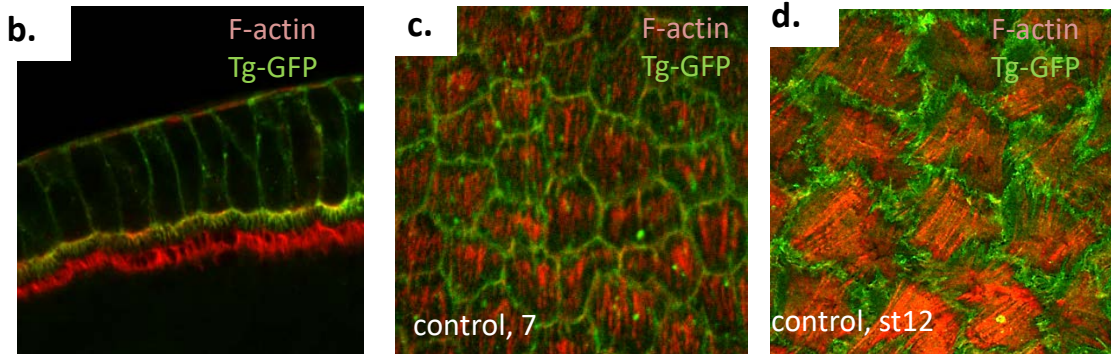
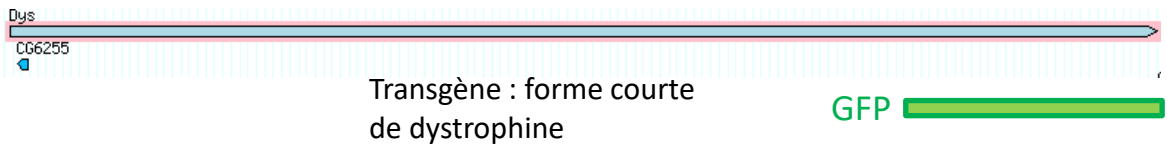


Figure 51 : Localisation de la dystrophine : expression de transgènes de formes courtes de la dystrophine

a. Schéma représentant la séquence des transgènes de formes courtes de dystrophine, fusionnés à une GFP en Nter.

Localisation du transgène dans des follicules contrôles. L'actine est marquée par de la phalloïdine (en rouge). b. Une coupe transversale de l'épithélium folliculaire montre une localisation du transgène au cortex, à la fois en basal, en latéral et en apical.

c. Au stade 7, le transgène se localise au cortex et co-localise partiellement avec les fibres d'actine basales.

d. A partir du stade 10A, le transgène forme des protrusions à l'extrémité des fibres d'actine.

stades tardifs, à partir du stade 9, et montre une localisation corticale non planaire polarisée de Dys. L'absence de localisation basale aux stades tardifs nous apparaît peu cohérente au vue de la fonction tardive de Dys décrite précédemment.

L'étude des transgènes exprimant de manière ubiquitaire des formes courtes de Dys fusionnées à la GFP a révélé une localisation particulièrement intéressante. Sur des follicules fixés de stades jeunes, une localisation au cortex a été observée et un faible signal apparaît colocalisé avec les fibres d'actine basales, mais cette localisation n'est pas planaire polarisée (fig 51). A partir du stade 10b, des protrusions basales fortement enrichies en Dys se forment à l'extrémité des fibres d'actine (fig 51). Cette localisation serait cohérente avec la fonction tardive de Dys qui réorienterait les fibres d'actine en employant les fibrilles de MEC comme support. Cependant, nous n'avons pas pu observer une telle localisation de Dys en utilisant des protein-trap et il faut donc pouvoir confirmer cette localisation pour la protéine Dys endogène. Il est possible que l'exon GFP ne soit pas traduit en raison d'un épissage alternatif ou que la fonction tardive dépende d'isoformes courtes de Dys. En effet, les deux isoformes les plus courtes présentes chez la drosophile ne sont pas marquées par le protein-trap et la lignée Mimic employés précédemment. Or les transgènes dont l'expression ubiquitaire permet de révéler cette localisation codent des protéines similaires à ces isoformes courts. Il serait donc intéressant de placer une GFP en Cter de Dys endogène afin de pouvoir suivre l'ensemble des isoformes.

Extrémité Cter de la dystrophine

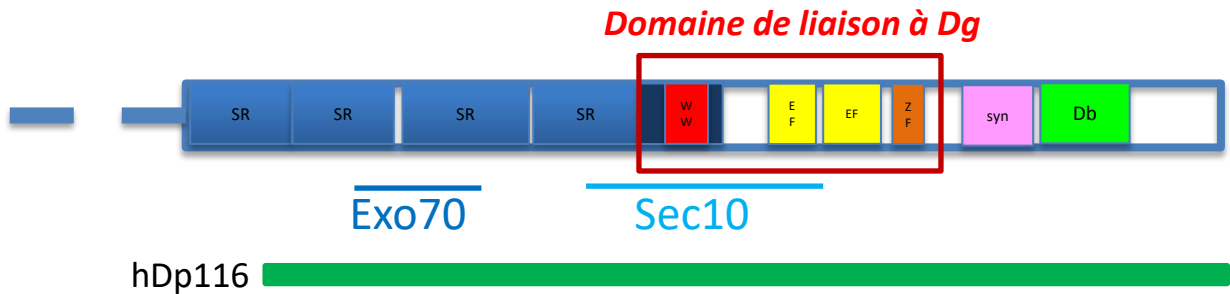


Figure 52: Extrémité C-terminale de dystrophine correspondant à la séquence de Dp116.

L'isoforme humaine Dp116 est représentée par une bande verte située sous la séquence Cter de dystrophine. Les boîtes bleues notées SR représentent les répétitions spectrines. Le domaine de liaison au dystroglycan est encadré en rouge : il contient le domaine riche en tryptophane "WW" (en rouge), deux domaines EF-hand (en jaune) et le domaine zinc-finger "ZF" (en orange). Le rectangle rose constitue le domaine d'interaction aux syntrophines (syn) et le rectangle vert, le domaine d'interaction à la dystrobrevine (Db). Les sites de liaison à l'exocyste sont indiqués par des traits horizontaux sous la séquence : exo70 se lie sur les deux avant-dernières répétitions spectrines et sec 10, à cheval sur le domaine d'interaction au dystroglycan et la dernière répétition spectrine. Ces interactions avec exo70 et sec10 sont confirmées par GST-Pull Down.

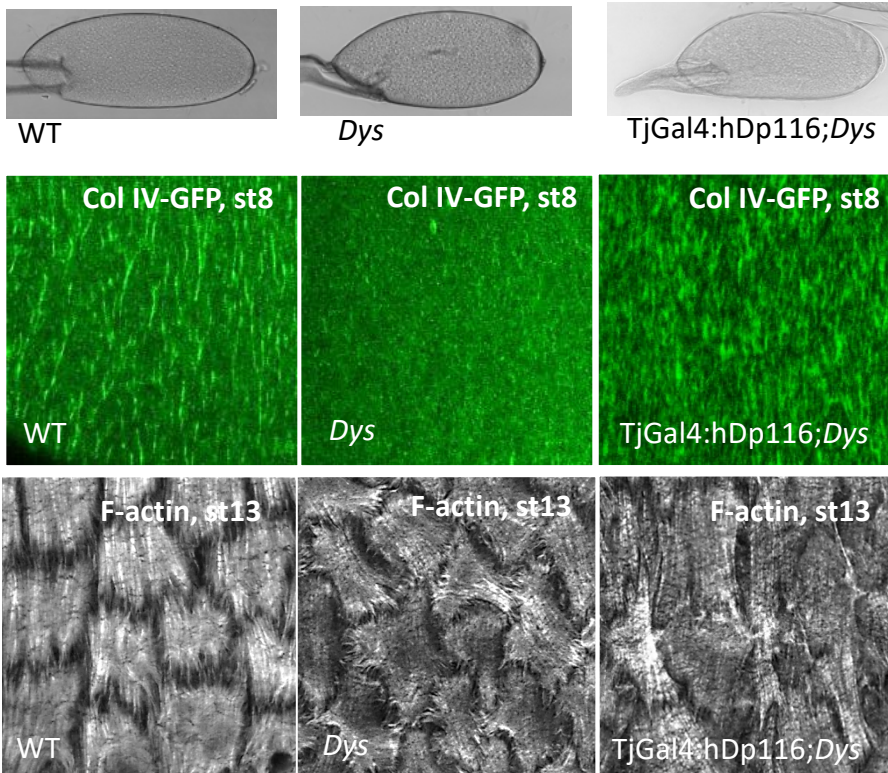
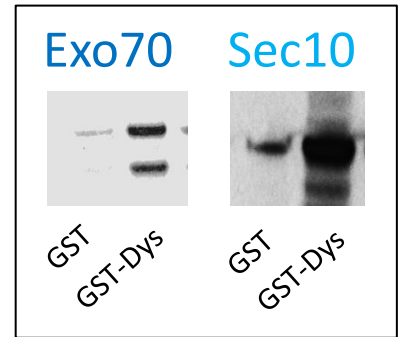


Figure 53 : L'expression de l'isoforme humaine courte de dystrophine, hDp116, sauve le phénotype d'élongation chez les drosophiles mutantes pour dystrophine.

L'expression de l'isoforme humaine hDp116 est sous le contrôle d'un promoteur UAS activé dans les cellules folliculaires par le pilote d'expression TjGal4. Les drosophiles sont mutantes pour dystrophine ($Dys^{E17}/Dys^{Exel6184}$). Images d'œufs matures en haut. L'expression de l'isoforme sauve le dépôt des fibrilles de matrice marquées par un protein-trap du collagène IV (Col IV-GFP). Les fibres d'actine sont marquées par de la phalloïdine et sont imagées sur des follicules de stade 13-14.

III- Etude structure-fonction de la Dystrophine : étude de l'isoforme courte, Dp116

De nombreuses études récentes portent sur l'analyse de formes courtes de Dys en vue de développer des thérapies géniques contre la myopathie de Duchenne, et révèlent que Dys n'agit pas seulement de façon mécanique mais aurait d'autres fonctions encore méconnues à ce jour. Par exemple, il a été montré que l'expression de l'isoforme courte Dp116, incapable de se lier au cytosquelette d'actine, améliore la durée de vie des souris mutantes pour *Dys* et *utrophine* (JuDge *et al.*, 2011). L'expression de l'isoforme humaine hDp116 chez les drosophiles mutantes *Dys*, sauve aussi leur durée de vie et la cardiomyopathie dilatée qu'elles développent (Taghli-Lamalle *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que Dys a un rôle important pour la durée de vie des souris et des drosophiles, indépendant de sa fonction mécanique.

A) L'expression de l'isoforme courte de Dystrophine, Dp116, dans le follicule ovarien de drosophile *Dys* sauve-t-elle son élongation ?

1. *Dystrophine et Dp116 interagissent avec l'exocyste*

Mes résultats montrent que, dans le follicule ovarien de drosophile, Dys est requise pour organiser la liaison de la MEC au cytosquelette et que celle-ci est nécessaire à l'élongation tardive. Le rôle de Dys dans l'organisation de la MEC reste à décrire. Chez les mammifères, le rôle de Dg dans la sécrétion et/ou l'assemblage de la MEC a été largement démontré (Henry et Campbell, 1998 ; Li *et al.*, 2003 ; Masuda Hirata *et al.*, 2009), mais une telle fonction n'a jamais été attribuée à Dys. Des données d'un crible en double-hybride ont révélé que Dys est capable d'interagir avec *exo70* et *sec10*, des constituants de l'exocyste, un complexe moléculaire participant à la sécrétion ciblée de vésicules (Formstecher, 2005). Cette interaction a été confirmée par GST-pull-down au laboratoire (fig 52). De plus, une interaction entre l'exocyste et Rab10 a été décrite dans plusieurs publications (Sano *et al.*, 2015 ; Zou *et al.*, 2015). Il est donc envisageable que, dans le follicule ovarien de drosophile, Dys participe à la voie de sécrétion latérale des fibrilles de MEC contrôlée par Rab10, via son interaction avec l'exocyste. Ces domaines de liaison à *exo70* et *sec10* sont inclus dans la séquence de Dp116 (fig 52).

2. *Une interaction Dystrophine-exocyste est-elle requise pour le dépôt des fibrilles de MEC ?*

Nous avons donc décidé d'exprimer l'isoforme humaine, hDp116, sous le contrôle du pilote d'expression TrafficJam, spécifique des cellules folliculaires, chez des mouches mutantes *Dys*. L'élongation des follicules matures est alors sauvée (fig 53). L'orientation des fibres d'actine et le dépôt des fibrilles de MEC s'effectuent également correctement (fig 53). Cette partie courte de la séquence de Dys, en dépit de son inaptitude à fixer l'actine, apparaissait donc suffisante pour l'organisation de l'interface MEC/cellule et, *in fine*, pour la morphogenèse du follicule. Pour tester

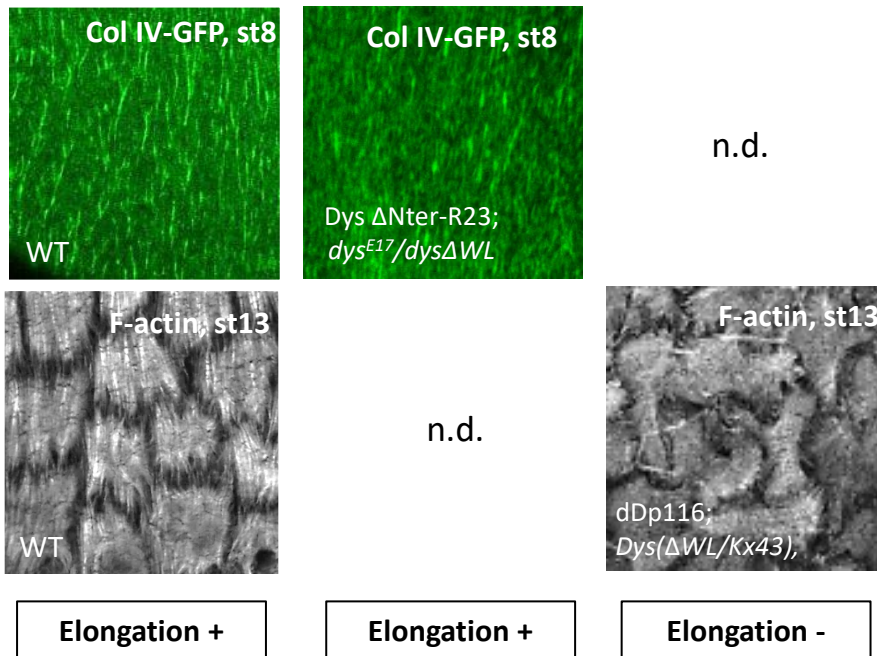
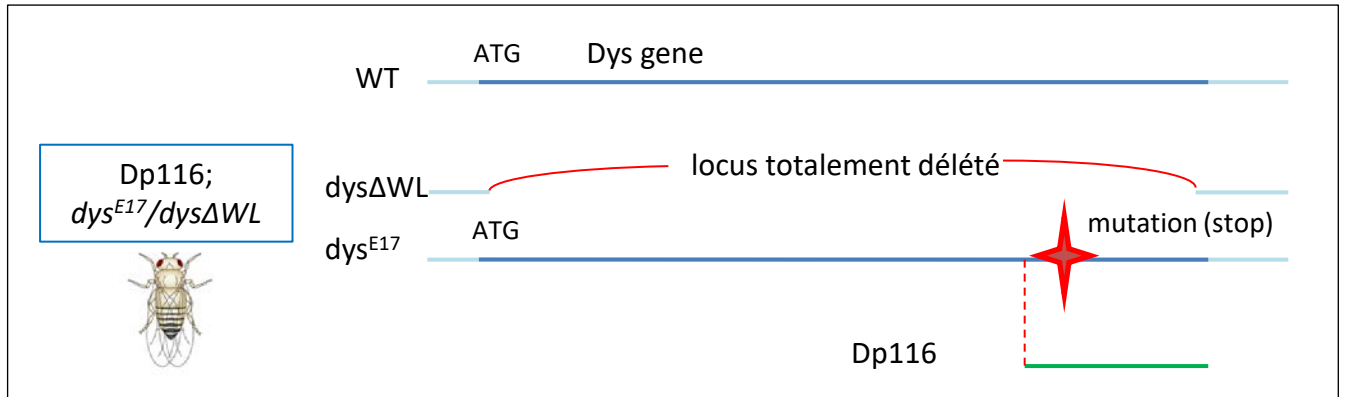
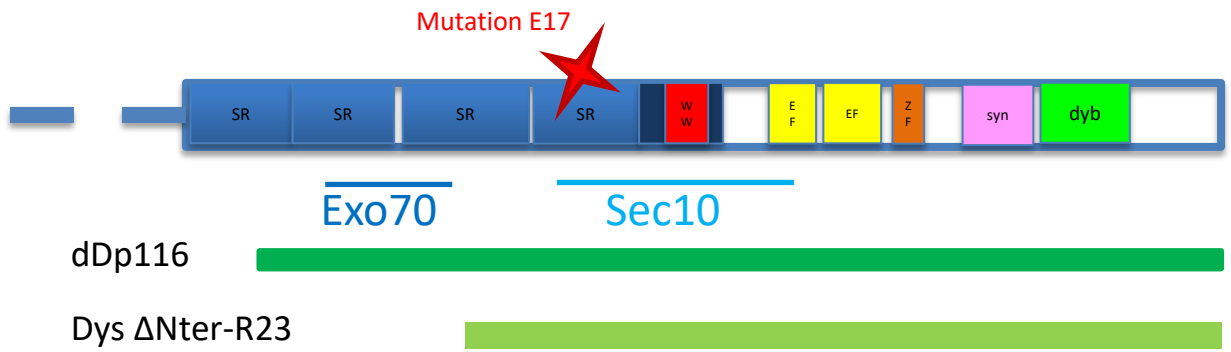


Figure 54 : Démonstration de la transcomplémentation entre *Dys^{E17}* et dDp116

En haut, schéma représentant les séquences de dDp116 et *Dys* Δ Nter-R23. La mutation E17 est représentée par une étoile rouge.

Schéma représentant le locus du gène dystrophine avec la séquence correspondant à Dp116 et la mutation ponctuelle *dys^{E17}* aboutissant potentiellement à la synthèse d'une protéine tronquée.

Dépôt des fibrilles sauvé en cas d'expression du transgène délété des domaines d'interaction avec l'exocyste chez des drosophiles *Dys^{E17}/DysExel6184*. L'expression du transgène dDp116 en cas de délétion complète du locus dystrophine ne sauve pas l'orientation des fibres d'actine tardive.

notre hypothèse quant à l'implication de l'interaction de Dys avec l'exocyste dans le dépôt des fibrilles de MEC, nous avons, par ailleurs, construit des transgènes correspondant à la séquence de hDp116 chez la drosophile que nous appellerons dDp116 et une construction délétée du domaine d'interaction à exo70, Dys Δ Nter-R23 (fig 54). L'expression de dDp116, comme hDp116, chez les drosophiles mutantes *Dys* sauve le phénotype d'élongation. De façon surprenante, l'élongation est également sauvée par l'expression de Dys Δ Nter-R23 (fig 54). Ces résultats suggèrent donc que ni l'interaction avec l'actine, ni l'interaction avec Exo70 n'interviendraient dans l'élongation du follicule.

Les allèles mutants *Dys* employés pour ces expériences sont *Dys*^{Exel6184} qui correspond à une délétion totale du locus et l'allèle *Dys*^{E17} qui présente un codon stop prématuré sur l'exon codant la dernière répétition spectrine, donc juste en amont du domaine d'interaction au Dg, essentiel à la fonction de *Dys* (fig 54). En accord, ces deux mutants présentent des phénotypes identiques à l'état homozygote. Afin, de limiter au maximum les effets du fond génétique, ces deux allèles ont été utilisés systématiquement en trans-hétérozygote dans toutes nos expériences. Cependant, il est possible qu'une protéine tronquée soit synthétisée à partir de l'allèle *Dys*^{E17}. Or, dDp116 comprend toute la séquence Cter de *Dys*, à partir des deux dernières répétitions spectrines, soit la portion de séquence absent chez les drosophiles *Dys*^{E17}. Si ces deux protéines interagissent entre elles, l'intégralité de la séquence de *Dys* serait restaurée et serait fonctionnelle. Ainsi, dDp116 sauverait l'élongation par transcomplémentation avec la protéine tronquée *Dys*^{E17}. Pour tester cette hypothèse, nous avons alors utilisé des drosophiles mutantes *Dys* avec deux allèles où le locus *Dys* est totalement délété, l'allèle *Dys*^{Exel6184} et la délétion Kx43. L'expression de dDp116, dans ce cas, ne sauve pas l'élongation, ni l'orientation des fibres d'actine, confirmant l'hypothèse d'une transcomplémentation entre l'allèle *Dys*^{E17} et dDp116 (fig 54). Un anticorps visant à reconnaître la protéine tronquée *Dys*^{E17} a été produit et est en cours de validation au laboratoire afin de détecter la présence d'une protéine tronquée *Dys*^{E17} et de l'assemblage *Dys*^{E17}-dDp116 en Western-Blot et par immunomarquage.

Dys^{E17} possédant les domaines d'interaction à l'exocyste, l'expression de Dys Δ Nter-R23 ne nous permet pas de conclure quant à l'implication de l'interaction de *Dys* avec l'exocyste dans le dépôt des fibrilles de MEC. Un projet est actuellement en cours pour déterminer quelle serait la fonction de cette interaction.

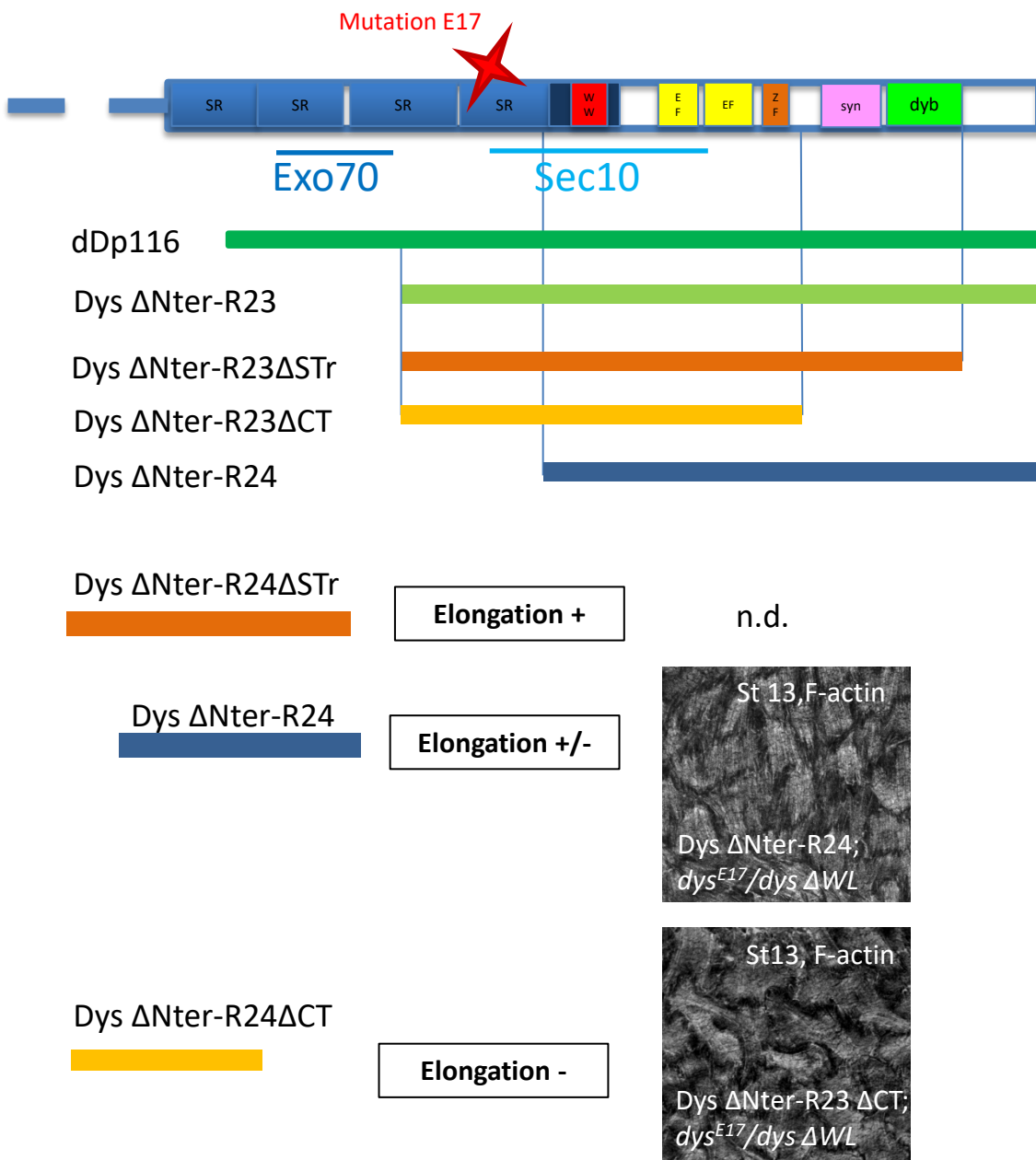


Figure 55 : Expression de constructions délétées du gène dystrophine chez des drosophiles *Dys^{E17}/DysExel6184*.

Schéma montrant la structure des différents transgènes construits.

Expression d'un transgène chez des drosophiles *Dys^{E17}/DysExel6184*. Follicules fixés et marqués par de la phalloïdine. L'élongation et l'orientation de l'actine ne sont pas sauvées en cas d'absence du domaine d'interaction à la dystrobrevine et à la syntrophine.

La délétion de la totalité des répétitions spectrines restaure partiellement le phénotype. Certains œufs présentent encore un défaut d'élongation.

B) Etude de la transcomplémentation entre Dys^{E17} et Dp116 : résultats préliminaires

D'autres constructions délétées ont été réalisées en vue de définir les domaines nécessaires à la transcomplémentation avec Dys^{E17} , celle-ci suggérant que *Dys* serait capable de former des dimères fonctionnels. L'hypothèse la plus simple pour expliquer la transcomplémentation serait l'interaction directe entre les répétitions spectrines communes de dDp116 et Dys^{E17} . Les spectrines sont typiquement capables de se dimériser (Hill *et al.*, 2014). Néanmoins, des tests *in vitro* n'ont jamais abouti à une interaction entre les répétitions spectrines de *Dys* (Chan et Kunkel, 1997). Dans notre modèle, *in vivo*, l'expression du transgène *Dys* délété de la totalité des répétitions spectrines chez les drosophiles $Dys^{E17}/Dys^{Exel6184}$ sauve partiellement l'élongation et l'orientation des fibres d'actine : certains follicules présentent encore un phénotype mutant (fig 55). Le dépôt des fibrilles de MEC n'a pas été vérifié. Le phénotype de "cross-vein" est également sauvé (non montré). Cela signifie que la transcomplémentation observée ne peut reposer sur une dimérisation des répétitions spectrines bien que celles-ci semblent la renforcer. Ce transgène présente une localisation similaire à celle de *Dys* $\Delta Nter-R23$, à la fois en contexte sauvage et chez les mutantes $Dys^{E17}/Dys^{Exel6184}$. Deuxièmement, en aval des domaines de liaison à Db et aux Syn, *Dys* présente une séquence riche en résidus tyrosine et sérine ; la délétion de cette séquence n'altère ni la transcomplémentation (fig 55), ni la localisation. Enfin, la délétion des domaines d'interaction à Db et aux Syn ne sauve pas le phénotype d'élongation (fig 55), ni le défaut de cross-vein. Il n'est pas cependant possible de dire si ces domaines sont requis spécifiquement pour la transcomplémentation ou plus généralement pour la fonction de *Dys* dans les follicules. L'expression de RNAi contre Syn ou Db n'a cependant pas d'effet sur l'élongation, suggérant qu'ils agiraient plutôt pour la transcomplémentation. Aussi, la localisation du transgène délété des domaines de liaison à Syn et Db est diffuse et les projections riches en *Dys* ne sont plus visibles, ce qui suggère que cette localisation à l'extrémité des fibres d'actine est nécessaire à sa fonction. En conclusion, cette transcomplémentation ne peut reposer sur des homodimérisations de domaines de *Dys*. Elle implique d'une part une région comprise entre l'extrémité N-ter et la dernière répétition spectrine et d'autre part, probablement, les domaines d'interaction à Db et aux Syn.

L'analyse de la MEC n'a pas été effectuée lors de ces expériences. Néanmoins, elle a été imagée dans des follicules de drosophiles $Dys^{E17}/Dys^{Exel6184}$ exprimant des transgènes humains possédant un domaine actinine et délétés des domaines Syn-Db et de plusieurs répétitions spectrines (fig 56). L'élongation et l'orientation tardive des fibres d'actine ne sont pas sauvées, confirmant la nécessité du domaine Syn-Db pour la transcomplémentation. Le transgène $\Delta H2-R19\Delta Cter$ *Dys* possède les domaines d'interaction avec *exo70* et *sec10*. Son expression restaure le dépôt des fibrilles de MEC, contrairement au transgène $\Delta R4-R23\Delta Cter$ *Dys* qui ne contient pas ces domaines. Ces données constituent un argument supplémentaire pour l'implication de *Dys*-exocyste dans la

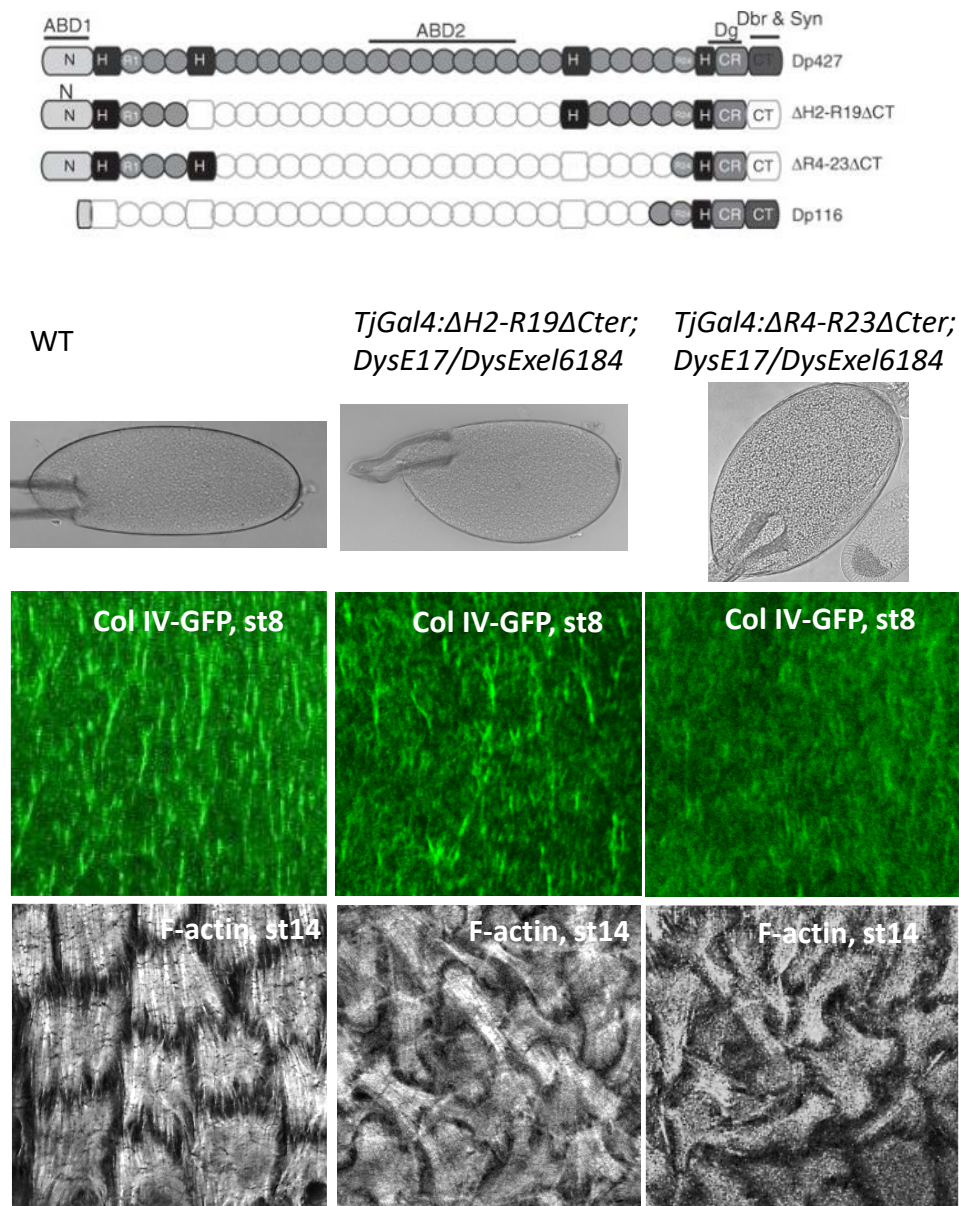


Figure 56 : Expression de constructions délétées du gène dystrophine humaine dans l'épithélium folliculaire de drosophiles *DysE17/DysExel6184*.

Schéma des séquences des 3 transgènes construits à partir de la séquence du gène humain codant dystrophine. En haut, la séquence du gène codant dystrophine chez l'Homme. $\Delta H2-R19 \Delta CT$ est délété de la séquence charnière 2 (H2) à la dix-neuvième répétition spectrine et du domaine de liaison aux syntrophines (Syn) et à la dystrobrevine (Dbr). $\Delta R4-23\Delta CT$ est délété du domaine de liaison Syn-Dbr et des répétitions spectrines 4 à 23. Dp116 ne contient pas de domaine actinine et ne comprend qu'une courte extrémité Nter associée à la séquence Cter de Dys comprenant les deux dernières répétitions spectrines, le domaine de liaison au dystroglycan et les domaines de liaison à Syn-Dbr. D'après Taghli-Lamalle *et al*, 2013.

Follicules fixés. La colonne à gauche présente des follicules sauvages. Au milieu et à droite, les drosophiles sont mutantes (*DysE17/DysExel6184*). Les transgènes sont sous le contrôle du pilote d'expression TjGal4, spécifique des cellules folliculaires. Images de la matrice extra-cellulaire (en haut, en vert) grâce au protein-trap du collagène IV fusionné à une GFP, effectuées sur des follicules de stade 8. Images de l'actine basale au stade 14; marquage par de la phalloïdine. Images de follicules matures en bas.

formation des fibrilles de MEC. Elles confirment, de plus, que les fibrilles de MEC seules ne sont pas suffisantes pour l'élongation tardive du follicule.

Ces résultats sont préliminaires et une investigation plus poussée doit maintenant être réalisée pour effectuer de façon plus précise la description des transgènes et comprendre comment s'effectue la transcomplémentation. Des quantifications seront nécessaires.

Discussion

I- Implication indirecte des fibrilles de matrice extracellulaire dans le corset moléculaire

Le modèle actuel propose qu'un corset moléculaire, formé des fibrilles de MEC et des fibres d'actine orientées perpendiculairement à l'axe AP, constituerait une contrainte mécanique envers la croissance médio-latérale du follicule et favoriserait ainsi son allongement selon l'axe AP. Cependant, il est difficile de déterminer le réel impact de chacune de ces structures ou chacun de ces événements sur l'élongation puisqu'ils sont interconnectés et dépendants les uns des autres.

A) Les fibrilles de matrice extracellulaire agissent tardivement et indirectement sur l'allongement du follicule

La MEC soutient le tissu épithélial et participe au maintien de sa forme tout en influant sur le comportement des cellules sous-jacentes notamment de par sa rigidité plus ou moins importante. Dans le follicule ovarien de drosophile, la MEC est, en effet, essentielle au maintien de la forme allongée du follicule puisqu'un traitement à la collagénase engendre un arrondissement rapide du follicule (Haigo et Bilder, 2011). Cependant, ce traitement affecte aussi bien la MEC générale que la MEC polarisée et il n'est donc pas possible de définir l'impact réel des fibrilles dans la morphogenèse du follicule. Il est à noter que ce traitement n'affecte pas la localisation de *Dys*, dépendante de *Dg*. La déplétion de la voie de sécrétion *Rab10* affecte aussi la sécrétion de MEC générale (Isabella et Horne-Badovinac, 2016) et l'arrêt de la migration collective des cellules folliculaires engendre une perte des fibrilles de MEC mais affecte également l'orientation des fibres d'actine (Gutzeit, 1991 ; Viktorinova *et al.*, 2009 ; Barlan *et al.*, 2017); il n'est donc non plus possible, à travers ces expériences, de conclure quant au rôle spécifique des fibrilles de MEC sur l'élongation folliculaire. Les mutants *Dys* et *Dg* présentent une diminution radicale de dépôt des fibrilles de MEC, sans défaut d'adressage des vésicules de MEC en apical, ni défaut de rotation. Ils constituent ainsi, à l'heure actuelle, les seuls exemples d'altération du dépôt de fibrille de MEC sans affecter fortement l'orientation des fibres d'actine au stade 8, ni l'adressage de la MEC. Il s'avère que le défaut d'élongation associé est peu expressif mais pénétrant et survient tardivement, après le stade 12, révélant que les fibrilles de MEC ne jouent pas un rôle primordial dans l'élongation folliculaire. D'ailleurs, la délétion de l'ICR de *Fat2* qui paraît altérer la structure des fibrilles de MEC, bien que ceci n'ait pas été quantifié, montre aussi un effet sur l'élongation qui survient tardivement (Squarr *et al.*, 2016), confirmant que les fibrilles de MEC auraient un effet décalé au cours du développement.

Par ailleurs, la surexpression de *Rab10* augmente la part fibrillaire mais provoque une déplétion de l'autre voie suggérant qu'il existe un équilibre entre les deux voies de sécrétion de MEC. Dans ce cas, cependant, les œufs sont sur-allongés, ce qui démontrerait un rôle des fibrilles sur l'élongation du follicule. Cependant, si la surexpression de *Rab10* en contexte RNAi contre *Dys*

restaure les fibrilles de MEC, elle n'agit pas sur le phénotype d'élongation, signifiant que le rôle des fibrilles de MEC sur l'élongation n'est pas direct.

B) Les fibrilles de matrice extracellulaire sont requises pour l'orientation tardive des fibres d'actine constituant la phase tardive de l'élongation du follicule

L'absence de fibrille de MEC associée à un défaut d'élongation peu expressif chez les mutants *Dys* et *Dg* montre que les fibrilles de MEC ne jouent pas un rôle mécanique primordial dans le corset moléculaire. Elles semblent néanmoins nécessaires à son établissement. Les analyses cinétiques réalisées au cours de cette étude montrent que les fibrilles de MEC sont essentielles à l'orientation des fibres d'actine tardives. Il a déjà été proposé qu'elles soient requises pour le maintien de l'alignement des fibres d'actine aux stades 6 à 8, de façon redondante avec la rotation, mais sans que cette hypothèse ait pu être testée (Cetera *et al.*, 2014). Un défaut d'orientation des fibres d'actine tardives est également présent chez le mutant *fat2* chez lequel, en raison d'absence de rotation, les fibrilles de MEC sont aussi absentes. Il apparaît donc que le défaut d'élongation tardif est toujours associé à un défaut d'orientation des fibres d'actine tardives. De plus, le sauvetage des fibrilles de MEC par la surexpression de *Rab10* en contexte *RNAi Dg* ne sauvant pas l'élongation, il s'en déduit que c'est cette seconde phase d'orientation des fibres d'actine qui agit sur l'allongement du follicule et émet une contrainte mécanique. Il est possible alors que cette orientation soit, comme en phase précoce, nécessaire pour l'induction d'oscillations basales générant un corset dynamique sur le follicule. Des films du domaine basal de follicules de stade 12 à 14 seront nécessaires pour définir si des oscillations s'effectuent ou non.

Nos observations suggèrent, en outre, que les fibrilles de MEC sont essentielles mais insuffisantes à l'orientation des fibres d'actine en phase tardive. Le complexe *Dys/Dg* doit également être présent et établirait un lien physique entre les fibrilles de MEC et les fibres d'actine, employant probablement les premières comme trame pour orienter les secondes. Ceci est à confirmer en exprimant un *RNAi* contre *Dg* et en surexprimant *Rab10* simultanément, pendant la phase précoce, puis en permettant l'expression de *Dg* aux stades tardifs. Si l'orientation des fibres d'actine est sauvée, alors cela prouvera que la fonction précoce de *Dg* requise pour l'orientation des fibres d'actine est bien la fonction de formation des fibrilles de MEC.

De plus, des films réalisés sur des follicules de stades tardifs révèlent la présence maintenue des fibrilles de MEC et montrent que celles-ci restent statiques notamment pendant les changements drastiques des formes des cellules et le changement d'orientation des fibres d'actine survenant notamment lors du relargage de contenu des cellules nourricières vers l'ovocyte. Les fibrilles de MEC seraient alors susceptibles d'agir comme "mémoire" de l'orientation de l'organisation du domaine basal pour la retransmettre en fin de développement folliculaire. Il faudrait alors déterminer

comment les fibrilles de MEC sont perçues par les cellules : favorisent-elles une concentration des sites d'interaction cellule/MEC ? Le complexe Dys/Dg pourrait alors être impliqué dans ce processus. Ou bien génèrent-elles une densité mécanique qui peut générer un signal pour la cellule ? Il a d'ailleurs été montré que les fibrilles de MEC sont plus rigides que la MEC uniforme (Chlasta *et al.*, 2017).

II- Fonctions du complexe Dys/Dg dans le follicule ovarien de *Drosophile*

Nos résultats montrent que le complexe Dys/Dg présente deux fonctions successives et interdépendantes : l'une, précoce, pour le dépôt des fibrilles de MEC et la seconde, pour l'organisation basale du cytosquelette.

A) Le complexe Dys/Dg participe à l'organisation de la matrice extracellulaire en promouvant le dépôt de fibrilles polarisées de matrice

L'absence de fibrille de MEC associée à l'absence d'accumulation péricellulaire accrue de MEC chez les mutants *Dys* et *Dg*, ainsi que l'augmentation de la part fibrillaire en cas de surexpression de *Dg* tendent à montrer que le complexe Dys/Dg est impliqué dans la sécrétion de MEC polarisée. Cette hypothèse est étayée par la localisation de Dys puisque, durant la phase de rotation, Dys se localise de façon planaire polarisée, à l'arrière des cellules et que c'est à cet endroit que se localise aussi Rab10 et que s'accumulent des vésicules de MEC. Le sauvetage du dépôt de fibrilles de MEC en contexte RNAi contre *Dys* ou *Dg* par la surexpression de Rab10 révèle une épistasie entre Rab10 et le complexe Dys/Dg. Celui-ci pourrait alors être impliqué dans l'activation de la voie de sécrétion latérale de MEC contrôlée par Rab10. Nous avons, par ailleurs, confirmé l'interaction de Dys avec l'exocyste et des résultats préliminaires suggèrent que cette interaction est essentielle au dépôt des fibrilles de MEC puisque l'expression, en contexte mutant pour *Dys*, de la forme courte de Dys, $\Delta H2-R19\Delta Cter$ qui présente ces domaines d'interaction, sauve les fibrilles de MEC, contrairement à la forme, $\Delta R4-R23\Delta Cter$ qui ne les possède pas.

Au laboratoire, un projet visant à explorer la sécrétion des fibrilles de MEC et notamment l'implication de Dys et Dg dans ce processus est en cours. Divers RNAi contre l'exocyste ont été étudiés et tous montrent, de façon inattendue, une augmentation de la part fibrillaire de la MEC avec présence de plus de fibrilles et des fibrilles plus longues. L'hypothèse d'une voie de sécrétion Dys/Dg-exocyste-Rab10 est donc de moins en moins cohérente. Puisqu'il a été démontré qu'il existe un équilibre entre la sécrétion basale de MEC générale et la sécrétion latérale de MEC polarisée (Cetera *et al.*, 2014), il serait envisageable que le complexe Dys/Dg agisse comme régulateur entre les deux voies de sécrétion. Son interaction avec l'exocyste lui permettrait de séquestrer celui-ci pour détourner la sécrétion basale de MEC et favoriserait ainsi la sécrétion latérale de MEC par Rab10. Les RNAi contre l'exocyste engendreraient donc une stimulation du dépôt de fibrilles de MEC. Ainsi, en

l'absence de *Dys/Dg*, la voie de sécrétion basale de MEC ne serait pas limitée au détriment du dépôt des fibrilles de MEC. En revanche, la surexpression de *Dg* stimulerait ce dépôt ainsi que la surexpression de *Rab10* même en absence de *Dg* puisque celui-ci agirait donc en amont. Cependant, cette hypothèse est en contradiction avec l'une de nos observations. En cas de mutation *fat2*, la rotation est bloquée et les fibrilles de MEC ne pouvant être déposées, une accumulation péri-cellulaire accrue de MEC est observée. Or, chez le double-mutant *fat2, Dys*, cette accumulation est toujours visible révélant que l'absence de *Dys* n'affecte pas la sécrétion latérale mais agirait plutôt en aval, dans l'assemblage des fibrilles ou leur connexion à la MEC pour leur étirement. *Dg* est, dans de nombreux modèles, essentiel comme « échafaudage » pour l'assemblage des lames basales (Henry et Campbell, 1998 ; Li *et al.*, 2003 ; Masuda Hirata *et al.*, 2009). Dans le follicule ovarien de drosophile, le mutant *Dg* ne présente aucun défaut de MEC générale. Il apparaît donc qu'un autre complexe transmembranaire jouerait ce rôle. En revanche, *Dg* pourrait alors agir comme plateforme nécessaire à l'assemblage des fibrilles de MEC et agirait donc en aval de la voie de sécrétion latérale de MEC contrôlée par *Rab10*. Néanmoins, dans ce cas, l'épistasie révélée entre *Rab10* et *Dys/Dg* ne s'explique pas. Une possibilité serait que dans la surexpression de *Rab10*, une autre protéine « échafaudage » soit déroutée vers la voie latérale et remplace le *Dg* pour former les fibrilles.

Il apparaît donc que les relations entre *Dys/Dg*, *Rab10* et l'exocyste sont plus complexes qu'initialement supposées et que la fonction de *Dys/Dg* dans le dépôt des fibrilles de MEC pourrait intervenir à différents niveaux.

B) Le complexe *Dys/Dg* participe à l'orientation des fibres d'actine

1. Interaction génétique entre *Fat2* et *Dystrophine*

Un retard d'orientation des fibres d'actine est observé durant la phase précoce chez les mutants *Dys* et *Dg*. Un tel défaut est aussi observé chez le mutant *fat2ΔICR*. L'addition des deux mutations, *Dys* et *fat2ΔICR*, provoque la perte de PCP de l'actine basale au stade 8, démontrant une redondance fonctionnelle entre le domaine ICR de *Fat2* et le complexe *Dys/Dg*. Cette interaction génétique est également observée dans l'aile puisque le défaut de "cross vein" est fortement accentué chez le double mutant. Chez le mutant *fat2ΔICR*, la rotation est altérée ; la vitesse de migration est réduite mais il semble que des fibrilles de MEC plus courtes, plus fines et en quantité amoindrie soient tout de même déposées. La rotation s'avère nécessaire au maintien de l'alignement des fibres d'actine jusqu'au stade 5. A partir du stade 6, elle est dispensable à l'orientation des fibres d'actine et serait redondante avec un autre acteur dans ce processus. Les fibrilles de MEC seraient susceptibles de prendre le relai pour maintenir l'alignement des fibres d'actine. Le complexe *Dys/Dg* qui établit une connexion physique entre le cytosquelette d'actine et la MEC pourrait alors être impliqué dans ce processus. Ainsi, *Fat2* participerait à l'établissement de la PCP pour induire la

rotation nécessaire au maintien de cette PCP et la rotation permet le dépôt de fibrilles de MEC qui via le complexe Dys/Dg rendrait ce maintien de PCP plus robuste. Ainsi, les retards d'orientation des fibres d'actine observés chez les mutants *Dys* et *fat2ΔICR* seraient liés à une perturbation de cette robustesse et l'orientation anarchique des fibres d'actine chez le double mutant *fat2ΔICR, Dys* résulterait du cumul de l'altération de la rotation et de l'absence des fibrilles de MEC. Pour tester cette hypothèse, nous bloquerons la rotation à partir du stade 5 en exprimant un RNAi contre Hem à l'aide du pilote d'expression *mirror:Gal4* en contexte mutant pour *Dys* et nous quantifierons la distribution des orientations des fibres d'actine au stade 8. Il conviendrait aussi de vérifier que dans le double mutant *fat2ΔICR, Dys*, la rotation n'est pas bloquée.

2. Le complexe Dys/Dg contrôlerait une voie de PCP

Si le complexe Dys/Dg semble agir sur le maintien de l'orientation des fibres d'actine de façon redondante avec la rotation, il est cependant intéressant de noter que sa localisation planaire polarisée s'effectue de façon très précoce, avant même l'orientation des fibres d'actine. De plus, si Fat2 contrôle la PCP basale dans le follicule ovarien, une PCP demeure établie de façon locale chez le mutant *fat2*. Une étude a également révélé que des petits clones mutants *fat2* ne provoquent pas de défaut de polarisation alors que des grands clones en engendrent et ce, de façon non cellulaire-autonome (Viktorinová *et al.*, 2009). Or, nous avons montré que Dys et Dg agissent, quant à eux, de façon cellulaire autonome sur l'orientation des fibres d'actine. Enfin, la découverte de l'interaction génétique entre Fat2 et Dys révèle une redondance fonctionnelle pour le maintien de l'alignement des fibres d'actine. Il existerait donc deux voies de polarisation planaire basale : l'une globale, contrôlée par Fat2 et située en amont de l'autre voie, plus locale, impliquant le complexe Dys/Dg. Cette dernière renforcerait la première afin de conférer une robustesse à la polarité planaire basale. Ce schéma serait assez comparable à la relation décrite, dans d'autres tissus, entre les voies de polarisation planaire Fat/Daschous, plutôt "globale", et Wntless/Wnt plutôt "locale" (Goodrich et Strutt, 2011).

3. Le complexe Dys/Dg formerait des projections entre les fibrilles de MEC et l'extrémité des fibres d'actine pour orienter ces dernières

Aux stades tardifs, nous avons déterminé que le complexe Dys/Dg était également requis pour l'orientation des fibres d'actine et que cette fonction nécessite le dépôt préalable des fibrilles de MEC. Nous retrouverions donc le même schéma : les fibres d'actine seraient orientées en utilisant les fibrilles de MEC comme trame et ce, grâce au lien effectué par le complexe Dys/Dg entre les deux types de structure. Des protrusions pouvant contenir des formes courtes de Dys ont été mises en évidence à l'extrémité des fibres d'actine, au niveau de fines extensions d'actine, sur des follicules de stades tardifs. Cette localisation particulièrement intéressante serait cohérente avec cette fonction.

Fat2 étant essentielle à la formation des lamellipodes en phase précoce, elle pourrait également être requise dans la formation de ces protrusions d'actine associées à Dys. Néanmoins, ce positionnement de Dys n'a été observé qu'avec des transgènes de formes courtes de Dys, incapables de lier l'actine. Cette localisation de certains transgènes à l'extrémité des fibres d'actine est corrélée avec leur capacité à sauver le phénotype, ce qui tend à confirmer que cette localisation de Dys est bien importante pour orienter tardivement les fibres d'actine et aboutir à une élongation correcte. De plus, ces sauvetages passent vraisemblablement par une dimérisation avec de formes plus longues de la Dys, bien que tronquées, ce qui suggère que les domaines de liaison à l'actine puissent être présents dans ces protrusions. Il faut néanmoins pouvoir confirmer cette localisation pour la protéine Dys endogène. L'exon YFP du protein-trap est inséré dans la séquence du gène endogène *Dys*, proche de l'extrémité Cter. Elle marque ainsi quasiment tous les isoformes de Dys. Néanmoins, deux isoformes courtes de séquences proches des constructions transgéniques employées ne sont pas marquées par YFP. Il est donc possible que la fonction tardive relève de ces isoformes courtes. Pour tester cette hypothèse, l'insertion d'une GFP en position Cter de Dys va être réalisée par CRISPR.

C) Transcomplémentation entre l'extrémité Cter et les répétitions spectrines de dystrophine

Nous avons montré que l'expression de l'isoforme courte de Dys, Dp116, restaure le phénotype d'élongation ainsi que le dépôt de fibrilles de MEC et l'orientation des fibres d'actine chez les drosophiles *Dys^{E17}/Dys^{Exel6184}* alors que le sauvetage ne s'effectue pas chez des drosophiles où la totalité du locus *Dys* est délété. Ces données suggèrent une transcomplémentation entre la protéine tronquée *Dys^{E17}*, non fonctionnelle en raison de son absence de domaine d'interaction au Dg, et Dp116 qui, lui, possède cette extrémité Cter de Dys. Des études de formes délétées de Dp116 suggèrent que le domaine Cter, possédant les domaines d'interaction à Db et Syn, comme essentiel à la transcomplémentation. A ce stade, nous n'avons pas d'expérience permettant de déterminer de manière formelle si ces domaines sont requis simplement pour la fonction de Dys dans le follicule ou pour la transcomplémentation. Cependant, des pertes de fonction par RNAi des deux Syn et de Db n'induisent pas de défaut d'élongation. Donc, si ces domaines n'ont pas d'autres interacteurs, ils serviraient à la transcomplémentation.

Chez les mammifères, il a été récemment démontré que Dys interagit avec les Syn via son domaine Cter mais aussi via les répétitions spectrines R17 et R22 (Adams *et al.*, 2018). La transcomplémentation entre *Dys^{E17}* et dDp116 pourrait donc s'effectuer indirectement via son interaction avec Syn qui se lierait d'une part aux répétitions spectrines R17 et R22 de *Dys^{E17}* et, d'autre part, sur l'extrémité Cter de dDp116. Il faudrait donc maintenant tester si les Syn permettent la transcomplémentation en induisant leur perte de fonction dans un contexte *dys^{E17} / dDp116*.

Enfin il est a souligné que les souris mdx:utrⁿ employées dans l'étude de Judge *et al.*, 2011, présentent une mutation ponctuelle sur le gène codant utrophine, proche de l'extrémité Cter, comme la mutation E17 chez la drosophile. Il est donc envisageable que leurs résultats soient également associés à une transcomplémentation entre Dp116 et Utrn. S'ils sont confirmés, ces résultats seraient la première preuve que la dystrophine forme des dimères fonctionnels même si cette dimérisation se ferait de manière indirecte.

III-Conclusion

L'établissement de la polarité planaire s'avère nécessaire tout au long du développement folliculaire pour la réalisation correcte de la morphogenèse. Il apparaît cependant que des structures différentes vont s'orienter successivement en suivant toujours la même direction comme si le message se relayait. Ainsi, au stade germarium, les microtubules sont alignés et orientés pour probablement déterminer le sens de la rotation qui s'établit dès la sortie du follicule du germarium. La rotation favorise, à son tour, l'orientation des fibres d'actine et permet le dépôt des fibrilles de MEC. L'orientation des fibres d'actine s'avère nécessaire à l'anisotropie des oscillations basales agissant comme corset dynamique pour allonger le follicule. Il apparaît, à travers, nos observations, que les fibrilles de MEC n'effectuent pas directement un rôle de "corset" envers la croissance médio-latérale du follicule mais elles sont nécessaires à la transmission de l'axe d'orientation aux fibres d'actine tardives qui effectuent une contrainte mécanique participant à une phase tardive d'élongation, du stade 12 au stade 14.

Le complexe Dys/Dg présente deux fonctions successives et interdépendantes au cours du développement du follicule ovarien chez la drosophile. Il participe, d'une part, à l'organisation de la MEC et il agit également dans l'organisation du cytosquelette basal. Une étude structure-fonction pourrait permettre de déterminer de façon précise les séquences essentielles à chacune de ses fonctions et s'avérerait importante pour la construction de mini-dystrophines pour le développement de thérapies géniques contre la DMD notamment. L'étude de la transcomplémentation serait également intéressante puisque la séquence de Dys pourrait être reconstruite par dimérisation de deux morceaux de la protéine. Ces fonctions doivent aussi être décrites plus précisément. Dans le follicule ovarien de drosophile, la fonction du complexe Dys/Dg dans l'organisation de MEC reste à déterminer : intervient-il dans la voie de sécrétion et/ou dans l'assemblage des fibrilles de MEC ? Quant à sa fonction d'organisation du cytosquelette d'actine, elle paraît redondante avec la rotation en phase précoce, rendant ainsi le maintien de l'alignement des fibres d'actine plus robuste, mais elle est essentielle en phase tardive, l'orientation tardive des fibres d'actine constituant l'étape ultime de la morphogenèse du follicule. De plus, le complexe Dys/Dg n'intervient pas dans la migration des cellules folliculaires et ne serait pas impliqué dans les

oscillations basales. Il ne semble pas non plus influencer la force d'adhésion des cellules à la matrice. Il ne jouerait donc pas un rôle mécanique mais constituerait plutôt un organisateur de cette adhésion mécanique entre la cellule et la MEC pour orienter les mécanismes de l'élongation folliculaire. Ainsi, le complexe Dys/Dg pourrait participer à une voie de PCP, révélée notamment par son interaction génétique avec Fat2, dont les implications développementales pourraient être multiples.

Références bibliographiques

- Adams, M.E., Odom, G.L., Kim, M.J., Chamberlain, J.S., Froehner, S.C. (2018). Syntrophin binds directly to multiple spectrin-like repeats in dystrophin and mediates binding of nNOS to repeats 16-17. *Hum Mol Genet.*
- Aigouy, B., Farhadifar, R., Staple, D.B., Sagner, A., Röper, J.C., Jülicher, F., Eaton, S. (2010). Cell flow reorients the axis of planar polarity in the wing epithelium of *Drosophila*. *Cell.* *142(5)*, 773-86.
- Alégot, H., Pouchin, P., Bardot, O., Mirouse, V. (2018). Jak-Stat pathway induces *Drosophila* follicle elongation by a gradient of apical contractility. *Elife.* *7*, e32943.
- Andersen, D., Horne-Badovinac, S. (2016). Influence of ovarian muscle contraction and oocyte growth on egg chamber elongation in *Drosophila*. *Development.* *143(8)*, 1375-87.
- Anderson, C., Winder, S.J., Borycki, A.G. (2007). Dystroglycan protein distribution coincides with basement membranes and muscle differentiation during mouse embryogenesis. *Dev Dyn.* *236(9)*, 2627-35.
- Aurich, F., Dahmann, C. (2016). A Mutation in *fat2* Uncouples Tissue Elongation from Global Tissue Rotation. *Cell Rep.* *14(11)*, 2503-10.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., Knust, E. (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature.* *414(6864)*, 638-43.
- Barlan, K., Cetera, M., Horne-Badovinac, S. (2017). Fat2 and Lar Define a Basally Localized Planar Signaling System Controlling Collective Cell Migration. *Dev Cell.* *40(5)*, 467-477.
- Barr, F.A. (2013). Review series: Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential? *J Cell Biol.* *202(2)*, 191-9.
- Barriga, E.H., Franze, K., Charras, G., Mayor, R. (2018). Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature.* *554(7693)*, 523-527.
- Bateman, J., Reddy, R. S., Saito, H., Van Vactor, D. (2001). The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. *Curr Biol* *11*, 1317–1327.
- Belanto, J.J., Olthoff, J.T., Mader, T.L., Chamberlain, C.M., Nelson, D.M., McCourt, P.M., Talsness, D.M., Gundersen, G.G., Lowe, D.A, Ervasti, J.M. (2016). Independent variability of microtubule perturbations associated with dystrophinopathy. *Hum Mol Genet.* *25(22)*, 4951-4961.
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Weydert, C. J., Harper, H. A., Willer, T., Henry, M. D., Campbell, K. D. (2009). Loss of α -dystroglycan laminin binding in epithelium-derived cancers is caused by silencing of LARGE. *J Biol Chem* *284*, 11279–11284.
- Bénazéraf, B., Pourquié, O. (2013) Formation and segmentation of the vertebrate body axis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 1-26.
- Bilder, D., and Haigo, S. L. (2012). Expanding the morphogenetic repertoire: perspectives from the *Drosophila* egg. *Dev Cell* *22*, 12–23.
- Blake, D.J., Tinsley, J.M., Davies, K.E., Knight, A.E., Winder, S.J., Kendrick-Jones, J. (1995) Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein–protein interactions. *Trends Biochem. Sci.*, *20*, p133.
- Bradley, P.L., Andrew, D.J. (2001). Ribbon encodes a novel BTB/POZ protein required for directed cell migration in *Drosophila melanogaster*. *Development.* *128(15)*, 3001-15.

- Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M.T., Persson, S. (2012). POM-POM2/cellulose synthase interacting1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in Arabidopsis. *Plant Cell*. *24(1)*, 163-77.
- Bunt, S., Denholm, B., Skaer, H. (2011). Characterisation of the Drosophila procollagen lysyl hydroxylase, dPlod. *Gene Expr Patterns*. *11(1-2)*, 72-8.
- Burridge, K., Wittchen, E.S. (2013) The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell. Biol.* *200 (1)*, 9-19.
- Campinho, P., Behrndt, M., Ranft, J., Risler, T., Minc, N., Heisenberg CP. (2013). Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly. *Nat Cell Biol.* *15(12)*, 1405-14.
- Cetera, M., Ramirez-San Juan, G.R., Oakes, P.W., Lewellyn, L., Fairchild, M.J., Tanentzapf, G., Gardel, M.L., Horne-Badovinac, S. (2014). Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during Drosophila egg chamber elongation. *Nat Commun.* *5*, 5511.
- Chan, Y., Kunkel, L.M. (1997). In vitro expressed dystrophin fragments do not associate with each other. *FEBS Lett.* *410(2-3)*, 153-9
- Chen, X.J., Squarr, A.J., Stephan, R., Chen, B., Higgins, T.E., Barry, D.J., Martin, M.C., Rosen, M.K., Bogdan, S., Way, M. (2014). Ena/VASP proteins cooperate with the WAVE complex to regulate the actin cytoskeleton. *Dev Cell.* *30(5)*, 569-84.
- Chen, D.Y., Lipari, K.R., Dehghan, Y., Streichan, S.J., Bilder, D. (2016). Symmetry Breaking in an Edgeless Epithelium by Fat2-Regulated Microtubule Polarity. *Cell Rep.* *15(6)*, 1125-33.
- Chen, D.Y., Crest, J., Bilder, D. (2017). A Cell Migration Tracking Tool Supports Coupling of Tissue Rotation to Elongation. *Cell Rep.* *21(3)*, 559-569.
- Chien, Y.H., Keller, R., Kintner, C., Shook, D.R. (2015). Mechanical strain determines the axis of planar polarity in ciliated epithelia. *Curr Biol.* *25(21)*, 2774-2784.
- Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J.L., Arias, L., Lamiré, L.A., Boudaoud, A., Grammont, M. (2017). Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Development.* *144(23)*, 4350-4362.
- Clements, R., Turk, R., Campbell, K.P., Wright K.M. (2017). Dystroglycan Maintains Inner Limiting Membrane Integrity to Coordinate Retinal Development. *J. NeuroSci.* *37(35)*, 8559-8574.
- Collinet, C., Rauzi, M., Lecuit, T., Lenne, P.F. (2015). Local and tissue-scale forces drive oriented junction growth during tissue extension. *Nat Cell Biol.* *17(10)*, 1247-58.
- Conder, R., Yu, H., Zahedi, B., Harden, N. (2007). The serine/threonine kinase dPak is required for polarized assembly of F-actin bundles and apical-basal polarity in the Drosophila follicular epithelium. *Dev Biol.* *305(2)*, 470-82.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D.Y., Fletcher, D.A., Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife.* *6*, e24958.
- Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., Cossée, M., Deburgrave, N., Saillour, Y., Tuffery, S., Urtizberea, A., Toutain, A., Echenne, B., Frischman, M., Mayer, M., Desguerre, I., Estournet, B., Réveillère, C., Penisson-Besnier, Cuisset, J.M., Kaplan J.C., Héron, D., Rivier, F., Chelly, J. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* *18(20)*, 3779-94.
- Delon, I., Brown, N.H. (2009). The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *J Cell Sci.* *122(Pt 23)*, 4363-74.

- Denef, N., Chen, Y., Weeks, S. D., Barcelo, G., and Schüpbach, T. (2008). Crag regulates epithelial architecture and polarized deposition of basement membrane proteins in *Drosophila*. *Dev Cell* *14*, 354–364.
- Devergne, O., Tsung, K., Barcelo, G., Schüpbach, T. (2014). Polarized deposition of basement membrane proteins depends on Phosphatidylinositol synthase and the levels of Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *111(21)*, 7689–94.
- Devergne, O., Sun, G.H., Schüpbach, T. (2017). Stratum, a Homolog of the Human GEF Mss4, Partnered with Rab8, Controls the Basal Restriction of Basement Membrane Proteins in Epithelial Cells. *Cell Rep.* *18(8)*, 1831–1839.
- DeWolf, C., McCauley, P., Sikorski, A.F., Winlove, C.P., Bailey, A.I., Kahana, E., Pinder, J.C., Gratzner, W.B. (1997). Interaction of dystrophin fragments with model membranes
Biophys. J. *72* pp. 2599–2604.
- Duffy, J.B., Harrison, D.A., Perrimon, N. (1998). Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development.* *125(12)*, 2263–71.
- Engler, A.J., Shamik, S., Lee Sweney, H., Disher, D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* *126*, 645–647.
- Ervasti, J.M., Campbell, K.P. (1991). Membrane organization of the dystrophin–glycoprotein complex. *Cell*, *66*, p1121.
- Ervasti J. M., Campbell K. P. (1993). A role for the dystrophin glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* *112*, 809–823.
- Fairclough, R.J., Wood, M.J., Davies, K.E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet.* *14*, 373–8
- Frydman, H., Spradling, A. (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.
- Galvagni, F., Nardi, F., Maida, M., Bernardini, G., Vannuccini, S., Petraglia, F., Santucci, A., Orlandini, M. (2016). CD93 and dystroglycan cooperation in human endothelial cell adhesion and migration. *Oncotarget.* *7(9)*, 10090–103.
- García-Cruz, C., Merino-Jiménez, C., Ceja, V., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Reyes-Grajeda, J.P., Montañez, C. (2018). The dystrophin isoform Dp71e Δ 71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells. *J Proteomics. pii: S1874-3919(18)* 30128-3.
- Goodrich, L.V., Strutt, D. (2011) Principles of planar polarity in animal development. *Development* *138*, 1877–1892.
- Grammont, M. (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J Cell Biol.* *177(1)*, 139–50.
- Grammont, M., Irvine, KD. (2001). *fringe* and Notch specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development.* *128(12)*, 2243–53.
- Grozdanovic, Z., Baumgarten, H.G. (1999). Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol Histopathol.* *14(1)*, 243–56.
- Gutzeit, H.O. (1990). The microfilament pattern in the somatic follicle cells of mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol.* *53(2)*, 349–56.
- Gutzeit, H. O. (1991). Organization and in vitro activity of microfilament bundles associated with the basement membrane of *Drosophila* follicles. *Acta Histochem Suppl.* *41*, 201–10.

- Gutzeit, H. O., Eberhardt, W., Gratwohl, E. (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J Cell Sci* *100*, 781–788.
- Haigo, S. L., and Bilder, D. (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science* *331*, 1071–1074.
- He, L., Wang, X., Tang, H.L., Montell, D.J. (2010). Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat Cell Biol.* *12*(12), 1133-42.
- Henry, M. D., Campbell, K.P. (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* *95*, 859–870.
- Hidalgo, M., Sirour, C., Bello, V., Moreau, N., Beaudry, M., Darribère, T. (2009). In vivo analyzes of dystroglycan function during somitogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* *238*(6), 1332-45.
- Hill, S.A., Kwa, L.G., Shammass, S.L., Lee, J.C., Clarke, J. (2014). Mechanism of assembly of the non-covalent spectrin tetramerization domain from intrinsically disordered partners. *J Mol Biol.* *426*(1), 21-35.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* *51*(6), 919-28.
- Hohenester, E, Yurchenco, P.D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr.* *7*(1), 56-63.
- Hutagalung, A.H., Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev.* *91*(1), 119-49.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* *355*(6362), 696-702.
- Isabella, A.J., Horne-Badovinac, S. (2015). Building from the Ground up: Basement Membranes in *Drosophila* Development. *Curr Top Membr.* *76*, 305-36.
- Isabella, A.J., Horne-Badovinac, S. (2015). Dynamic regulation of basement membrane protein levels promotes egg chamber elongation in *Drosophila*. *Dev Biol.* *406*(2), 212-21.
- Isabella, A.J., Horne-Badovinac, S.(2016). Rab10-Mediated Secretion Synergizes with Tissue Movement to Build a Polarized Basement Membrane Architecture for Organ Morphogenesis. *Dev Cell.* *38*(1), 47-60.
- Judge, L. M., Arnett, A. L. H., Banks, G. B., Chamberlain, J. S. (2011). Expression of the dystrophin isoform Dp116 preserves functional muscle mass and extends lifespan without preventing dystrophy in severely dystrophic mice. *Hum Mol Gen* *20*, 4978–4990.
- Kaunas, R., Nguyen, P., Usami, S., Chien, S. (2005). Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *102*(44), 15895-900.
- King, R. (1970). Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York p.227.
- Koenig, M., Kunkel, L.M. (1990) Detailed. analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem.* *265*, p.4560.
- Koride, S., He, L., Xiong, L.P., Lan, G., Montell, D.J., Sun, S.X. (2014). Mechanochemical regulation of oscillatory follicle cell dynamics in the developing *Drosophila* egg chamber. *Mol Biol Cell.* *25*(22), 3709-16.
- Knust, E., Tepass, U., Wodarz, A. (1993). Crumbs and stardust, two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity. *Dev. Suppl.* 261-268.

- Lai, Y., Thomas, G.D., Yue, Y., Yang, H.T., Li, D., Long, C., Judge, L., Bostick, B., Chamberlain, J.S., Terjung, R.L., Duan, D. (2009). Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest.* *119(3)*, 624-35.
- Lecuit, T., Le Goff, L. (2007). Orchestrating size and shape during morphogenesis. *Nature.* *450(7167)*, 189-92.
- Lerner, D. W., McCoy, D., Isabella, A. J., Mahowald, A. P., Gerlach, G. F., Chaudhry, T. A., Horne-Badovinac, S. (2013). A Rab10-dependent mechanism for polarized basement membrane secretion during organ morphogenesis. *Dev Cell* *24(2)*, 159–168.
- Le Rumeur, E., Fichou, Y., Pottier, S., Gaboriau, F., Rondeau-Mouro, C., Vincent, M., Gallay, J., Bondon, A. (2003). Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids: evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids *J. Biol. Chem.*, *278* pp. 5993-6001
- Levyer, R., Lecuit, T. (2008). Breaking down EMT. *Nat Cell Biol.* *10(7)*, 757-9.
- Levyer, R., Lecuit, T. (2012). Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* *22(2)*, 61-81.
- Lewellyn, L, Cetera, M., Horne-Badovinac, S. (2013) Misshapen decreases integrin levels to promote epithelial motility and planar polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* *200(6)*, 721-9.
- Lewis, W.H., Lewis, M.R. (1924). Behavior of cells in tissue cultures. *General Cytology*. E.V. Cowdry, editor. The University of Chicago Press, Chicago, IL. 385-447.
- Li, S., Edgar, D., Fässler, R., Wadsworth, W., Yurchenco, P.D. (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell.* *4(5)*, 613-24.
- Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., Wrana, J.L. (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.* *151(7)*, 1542-56
- Luxenburg, C., Heller, E., Pasolli, H.A., Chai, S., Nikolova, M., Stokes, N., Fuchs, E. (2015). Wdr1-mediated cell shape dynamics and cortical tension are essential for epidermal planar cell polarity. *Nat Cell Biol.* *(5)*, 592-604.
- Masuda-Hirata, M., Suzuki, A., Amano, Y., Yamashita, K., Ide M, Yamanaka, T., Sakai, M., Imamura, M., Ohno, S. (2009). Intracellular polarity protein PAR-1 regulates extracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex. *Genes Cells.* *14(7)*, 835-50.
- Matis, M., Axelrod, J.D. (2013). Regulation of PCP by the Fat signaling pathway. *Genes Dev.* *27(20)*, 2207-2220.
- Matsumura, K., Tomé, F.M., Collin, H., Azibi, K., Chaouch, M., Kaplan, J.C., Fardeau, M., Campbell, K.P. (1992). Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature.* *359(6393)*, 320-2.
- McClatchey, S.T., Wang, Z., Linden, L.M., Hastie, E.L., Wang, L., Shen, W., Chen, A., Chi, Q., Sherwood, D.R. (2016). Boundary cells restrict dystroglycan trafficking to control basement membrane sliding during tissue remodeling. *Elife.* pii: e17218.
- McGregor, J.R., Xi, R., Harrison, D.A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development.* *129(3)*, 705-17.
- Miner, J. H., Yurchenco, P. D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *20*, 255–284.

- Moeller, M.J., Soofi, A., Braun, G.S., Li, X., Watzl, C., Kriz, W., Holzman, L.B. (2004). Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO J.* *23(19)*, 3769-79.
- Montcouquiol, M., Kelley, M.W. (2003). Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci.* *23(28)*, 9469-78
- Morikawa, Y., Heallen, T., Leach, J., Xiao, Y., Martin, J.F. (2017). Dystrophin Glycoprotein Complex Sequesters Yap to Inhibit Cardiomyocyte Proliferation. *Nature.*
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* *287*, 785-801.
- Paré, A.C., Vichas, A., Fincher, C.T., Mirman, Z., Farrell, D.L., Mainieri, A., Zallen, J.A. (2014). A positional Toll receptor code directs convergent extension in *Drosophila*. *Nature.* *515(7528)*, 523-7.
- Pourquié, O. (2004). The chick embryo: a leading model in somitogenesis studies. *Mech. Dev.*, *121(9)*, 1069-1079.
- Prins, K.W., Humston, J.L., Mehta, A., Tate, V., Ralston, E., Ervasti, J.M. (2009). Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol.* *186(3)*, 363-9.
- Qin, X., Hannezo, E., Mangeat, T., Liu, C., Majumder, P., Liu, J., Choesmel-Cadamuro, V., McDonald, J.A., Liu, Y., Yi, B., Wang, X. (2018). A biochemical network controlling basal myosin oscillation. *Nat Commun.* *9(1)*, 1210.
- Quinlan, J.G., Hahn, H.S., Wong, B.L., Lorenz, J.N., Wenisch, A.S., Levin, L.S. (2004). Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord.* *(8-9)*, 491-6.
- Ramkumar, N., Omelchenko, T., Silva-Gagliardi, N.F., McGlade, C.J., Wijnholds, J., Anderson, K.V. (2016). Crumbs2 promotes cell ingression during the epithelial-to-mesenchymal transition at gastrulation. *18(12)*, 1281-1291.
- Rauzi, M., Lecuit, T., Lenne, P.F. (2008). Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat Cell Biol.* *10(12)*, 1401-10.
- Rauzi, M., Lecuit, T. (2009). Closing in on mechanisms of tissue morphogenesis. *Cell.* *137(7)*, 1183-5.
- Reddy, B.V., Irvine, K.D. (2008) The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development.* *135(17)*, 2827-38.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* *302(5651)*, 1704-9.
- Roberts, R.G., Coffey, A.J., Bobrow, M., Bentley, D.R. (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics.* *16(2)*, 536-8.
- Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S.E., Harrison, R., Mount, R., McNeill, H. (2008). Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet.* *40(8)*, 1010-5.
- Sato, K., Yokota, T., Ichioka, S., Shibata, M., Takeda, S. (2008). Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myol.* *27*, 30-6.
- Satz, J.S., Ostendorf, A.P., Hou, S., Turner, A., Kusano, H., Lee, J.C., Turk, R., Nguyen, H., Ross-Barta, S.E., Westra, S., Hoshi, T., Moore, S.A., Campbell, K.P. (2010) Distinct Functions of Glial and Neuronal Dystroglycan in the Developing and Adult Mouse Brain. *J. NeuroSci* *30 (43)*, 14560-14572.

- Shcherbata, H.R., Yatsenko, A.S., Patterson, L., Sood, V.D., Nudel, U., Yaffe, D., Baker, D., Ruohola-Baker, H. (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO J.* *26*(2), 481-93.
- Sherman, D.L., Wu, L.M., Grove, M., Gillespie, C.S., Brophy, P.J. (2012). Drp2 and periaxin form Cajal bands with dystroglycan but have distinct roles in Schwann cell growth. *J Neurosci.* *32*(27), 9419-28.
- Sherrard, K, Robin, F., Lemaire, P., Munro, E. (2010). Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination. *Curr Biol.* *20*(17), 1499-510.
- Schneider, M., Khalil, A.A., Poulton, J., Castillejo-Lopez, C., Egger-Adam, D., Wodarz, A., Deng, W.M., Baumgartner, S. (2006). Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the *Drosophila* follicular epithelium to maintain epithelial organization. *Development.* *133*(19), 3805-15.
- Silver, D.L., Montell, D.J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell.* *107*(7), 831-41.
- Simon, M.A. (2004). Planar cell polarity in the *Drosophila* eye is directed by graded Four-jointed and Dachshous expression. *Development.* *131*(24), 6175-84.
- Simons, M., Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet.* *42*, 517-40.
- Spradling, A. (1993) The development of *Drosophila melanogaster*. Bate M., Martinez-Arias A., editors. CSHL Press; New York, pp. 1–70.
- Squarr, A.J., Brinkmann, K., Chen, B., Steinbacher, T., Ebnet, K., Rosen, M.K., Bogdan, S. (2016). Fat2 acts through the WAVE regulatory complex to drive collective cell migration during tissue rotation. *J Cell Biol.* *212*(5), 591-603.
- St Johnston, D., Arhinger J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia : parallels and diversity. *Cell* *141*, 757-774.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., Ozawa, E. (1994). Molecular organisation at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin: three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur. J. Biochem.* *220*, 283–292.
- Taghli-Lamalle, O., Akasaka, T., Hogg, G., Nudel, U., Yaffe, D., Chamberlain, J.S., Ocorr, K., Bodmer, R. (2008). Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell.* *7*(2), 237-49.
- Taghli-Lamalle, O., Jagla, K., Chamberlain, J.S., Bodmer, R. (2014). Mechanical and non-mechanical functions of Dystrophin can prevent cardiac abnormalities in *Drosophila*. *Exp Gerontol.* *49*, 26-34.
- Tanoue, T., Takeichi, M. (2004). Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *J Cell Biol.* *165*(4), 517-28.
- Vachias, C., Fritsch, C., Pouchin, P., Bardot, O., Mirouse, V. (2014). Tight coordination of growth and differentiation between germline and soma provides robustness for *drosophila* egg development. *Cell Rep.* *9*(2), 531-41.
- Valencia-Expósito, A., Grosheva, I., Míguez, D.G., González-Reyes, A., Martín-Bermudo, M.D. (2016). Myosin light-chain phosphatase regulates basal actomyosin oscillations during morphogenesis. *Nat Commun.* *7*, 10746.
- Van De Bor, V., Zimniak, G., Papone, L., Cerezo, D., Malbouyres, M., Juan, T., Ruggiero, F., Noselli, S. (2015). Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Rep.* *13*(3), 546-560.
- Viktorinová I., König, T., Schlichting, K., Dahmann, C. (2009). The cadherin Fat2 is required for planar cell polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* *136*, 4123-4132.

- Viktorinová, I., Dahmann, C. (2013). Microtubule polarity predicts direction of egg chamber rotation in *Drosophila*. *Curr Biol* 23, 1472-1477.
- Viktorinová, I., Henry, I., Tomancak P. (2017). Epithelial rotation is preceded by planar symmetry breaking of actomyosin and protects epithelial tissue from cell deformations. *PLoS Genet.* 13(11), e1007107.
- Vladar, E.K., Bayly, R.D., Sangoram, A.M., Scott, M.P., Axelrod, J.D. (2012). Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Curr Biol.* 22(23), 2203-12.
- Wahlström, G., Norokorpi, H.L., Heino, T.I. (2006). *Drosophila* alpha-actinin in ovarian follicle cells is regulated by EGFR and Dpp signalling and required for cytoskeletal remodelling. *Mech Dev.* 123(11), 801-18.
- Wallingford, J.B., Harland, R.M. (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development.* 129, 5815–25.
- Wang, J., Hamblet, N.S., Mark, S., Dickinson, M.E., Brinkman, B.C., Segil, N., Fraser, S.E., Chen, P., Wallingford, J.B., Wynshaw-Boris A. (2006). Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development.* 2006. 133, 1767–78.
- Wang, Y., Riechmann, V. (2007). The role of the actomyosin cytoskeleton in coordination of tissue growth during *Drosophila* oogenesis. *Curr Biol.* 17(15), 1349-55.
- Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Campbell, K.P. (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum Mol Genet.* 6(6), 831-41.
- Wolpert L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol.* 25(1), 1-47.
- Yatsenko, A.S., Marrone, A.K., Shcherbata, H.R. (2014). miRNA-based buffering of the cobblestone-lissencephaly-associated extracellular matrix receptor dystroglycan via its alternative 3'-UTR. *Nat Commun.* 5, 4906.
- Yoshida, M., Ozawa, E. (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem.* 108(5), 748-52.
- Yoshimura, S., Gerondopoulos, A., Linford, A., Rigden, D.J., Barr, F.A. (2010). Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *J Cell Biol.* 191(2), 367-81.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes : cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(2), a004911.
- Zallen, J. A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129, 1051-1063.

Résumé

L'élongation du follicule ovarien de *Drosophila melanogaster* constitue un modèle élégant de morphogenèse tissulaire impliquant la polarisation planaire basale de l'épithélium folliculaire dépendante de Fat2. Celle-ci induit une rotation des follicules qui participe à l'orientation polarisée des fibres d'actine basales et permet une sécrétion des fibrilles de matrice extracellulaire (MEC). Ces structures formeraient un corset moléculaire contraignant la croissance médio-latérale du follicule et favorisant ainsi son élongation selon l'axe antéro-postérieur. Cependant, les relations entre les fibrilles de MEC et les fibres d'actine-F ne sont pas connues. Nous avons identifié un défaut d'élongation chez les mutants *dystrophine* (*Dys*) et *dystroglycan* (*Dg*). *Dys* et *Dg* forment un complexe transmembranaire interagissant avec l'actine-F et la MEC, et sont impliqués dans des maladies génétiques neuromusculaires telles que la myopathie de Duchenne. J'ai identifié deux fonctions nouvelles du complexe *Dys/Dg* : il n'est pas impliqué dans la rotation mais s'avère indispensable au dépôt des fibrilles polarisées de MEC et est également requis, tardivement, pour orienter les fibres d'actine-F. J'ai, par ailleurs, révélé que ces deux fonctions successives sont interdépendantes, suggérant que *Dys/Dg* emploie les fibrilles de MEC comme trame pour orienter les fibres d'actine-F. Des résultats préliminaires d'une étude structure-fonction de *Dys* ont également révélé une dimérisation de la protéine, ainsi qu'une interaction physique avec des acteurs du trafic cellulaire. L'ensemble de ces résultats amènent une vision nouvelle de l'organisation de l'adhésion cellule/MEC orchestrée par le complexe *Dys/Dg* et conduisent à une appréhension différente de son rôle, notamment en contexte pathologique.

Mots-clés : adhésion cellule/matrice extracellulaire, fibres d'actine-F, dystrophine, dystroglycan, morphogenèse tissulaire

Abstract

The elongation of the *Drosophila melanogaster* ovarian follicle offers a nice model of tissue morphogenesis involving the extracellular matrix (ECM). Following a fat2-dependent planar polarization of the basal domain of the epithelial follicular cells, follicles undergo rotations that allow the polarized secretion of ECM fibrils and participate in the orientation of F-actin stress fibers. ECM fibrils and stress fibers are proposed to act as a molecular corset, constraining the medio-lateral growth of the follicle and so promoting its elongation. However, the relationships between these fibrils and stress fibers are unclear. We found that Dystrophin (*Dys*) and Dystroglycan (*Dg*), which form a transmembrane complex interacting with F-actin and ECM, are involved in follicle elongation. They are implicated in genetics neuromuscular degenerative diseases as Duchenne Myopathy Disorder. I have found that they are not required for rotation but for ECM fibril deposition. Moreover, they orient in a cell autonomous manner F-actin fibers at late stages and this function also relies on the previous ECM fibril deposition, indicating two successive and interdependent functions of *Dys/Dg* complex. Moreover, preliminary results from a *Dys* structure-function study revealed a dimerization of the protein and we also identified a direct interaction between *Dys* and cell traffic actors. Together, our data show *Dys/Dg* complex works as a critical organizer of the basal domain of the cells, acting on both F-actin and ECM, and suggest that ECM fibrils act as a template for F-actin fiber orientation.

Keywords: cell/matrix adhesion, F-actin fibers, dystrophin, dystroglycan, tissue morphogenesis