



**HAL**  
open science

# Contrôle de l'évolution des tumeurs épithéliales par les propriétés mécaniques et la mort cellulaire

Marianne Montemurro

► **To cite this version:**

Marianne Montemurro. Contrôle de l'évolution des tumeurs épithéliales par les propriétés mécaniques et la mort cellulaire. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30018 . tel-04476477

**HAL Id: tel-04476477**

**<https://theses.hal.science/tel-04476477>**

Submitted on 25 Feb 2024

**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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Marianne MONTEMURRO**

Le 24 février 2023

**Contrôle de l'évolution des tumeurs épithéliales par les propriétés mécaniques et la mort cellulaire**

---

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

Spécialité : **BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT**

Unité de recherche :

**MCD - Molecular, Cellular and Developmental Biology Unit**

Thèse dirigée par

**Magali SUZANNE et Bruno MONIER**

Jury

**M. Romain LEVAYER**, Rapporteur

**Mme Muriel GRAMMONT**, Rapporteur

**Mme Delphine DELACOUR**, Rapporteur

**Mme Magali SUZANNE**, Directrice de thèse

**M. Bruno MONIER**, Co-directeur de thèse

**M. David CRIBBS**, Président



# Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres de mon jury, Romain Levayer, Delphine Delacour, Muriel Grammont ainsi que David Cribbs pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je voudrais remercier l'équipe Suzanne, au sein de laquelle j'ai évolué ces dernières années. J'ai vu passer un certain nombre de personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui ont chacune contribué à mon évolution. Merci à tous.

A Magali, ma directrice de thèse. Un grand merci. Tu m'as d'abord donné l'opportunité de rejoindre l'équipe en tant que stagiaire et tu m'as ensuite fait confiance pour faire une thèse. Si à l'époque, je n'étais pas sûre de vouloir en faire une, aujourd'hui je sais que j'ai eu une chance incroyable d'en faire une dans cette équipe et je ne le regrette absolument pas. Je pense que tu es l'une des personnes les plus dynamiques et enthousiastes que je connaisse. C'était un vrai plaisir de travailler avec toi. Encore merci pour tout.

A Bruno, mon directeur de thèse, mon chef comme j'aimais t'appeler même si tu n'aimais pas ça. Je pense que quoi que je dise, ce ne sera pas suffisant pour te dire à quel point je te suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait. Travailler avec toi était juste incroyable. Merci pour le temps énorme (vraiment énorme) que tu m'as consacré et ce, tout au long de ma thèse. On pouvait passer des heures et des heures (et encore des heures) à discuter du projet et des sciences en général et souvent c'était difficile de s'arrêter tellement tu étais passionnant dans ce que tu racontais. Merci pour tout ce que tu m'as appris. Je pense très sincèrement que je ne pouvais pas espérer un meilleur encadrement et travailler avec toi est certainement ce qui me manquera le plus. Merci pour tout.

A Coco, la première de l'équipe que j'ai connue finalement. La première à m'apprendre la génétique sur les bancs de la fac. Je n'oublie pas que c'est grâce à toi que toute cette aventure a commencé en me proposant de faire un stage dans l'équipe Suzanne. Merci pour ton soutien et surtout ta bienveillance et ta gentillesse. Nos petites discussions du soir vont me manquer. Merci pour tout.

Mélanie, Mégane et Audrey, les premières que j'ai connues en arrivant au labo. Vous avez toutes les trois été géniales. Dès mon arrivée, je me suis sentie bien dans cette équipe grâce à vous. Merci pour votre bonne humeur, votre soutien et vos encouragements depuis le début et encore maintenant.

Arnaud, Amsha, Daniela et Stéphanie, merci pour toutes ces discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir.

Manu, ça fait quelques années que l'on se connaît maintenant. Merci pour tout, ton enthousiasme, tes idées, ton aide avec les macros ImageJ et surtout ton soutien en toutes circonstances. Merci d'avoir été là.



Sophie, on a grandi ensemble puisque 6 mois séparent le début de nos thèses. Merci pour ton soutien tout au long de la thèse, même lorsque tu es partie vers d'autres horizons. Merci pour toutes ces discussions le soir jusqu'à pas d'heure au labo où on refaisait le monde.

Martine, Tatiana, Ronan et Meri, merci pour votre bonne humeur et pour l'animation que vous mettez dans le labo et pour toutes les discussions, parfois farfelues que l'on a pu avoir. Un remerciement aussi à Simon, pas tout à fait un membre de l'équipe mais presque, pour les discussions et les soirées escalade avec Ronan qui permettaient de bien décompresser, juste avant la fin.

Julien et Amélie, de la plateforme drosophile. Julien merci pour ton enthousiasme toujours communicatif le matin très tôt, ton implication et pour m'avoir toujours préparé tout ce dont j'avais besoin, même commandé à la dernière minute.

Anne, merci pour ces deux années d'enseignements. J'ai adoré cette expérience d'enseigner et j'avoue qu'arrêter a été difficile. Merci de m'avoir formée et donné l'opportunité de t'aider à monter un TP sur les tumeurs drosophile. J'ai adoré travailler avec toi.

Aurélien, mon allié des manips matinales. Merci pour ton soutien. C'était toujours sympa d'arriver tôt le matin pour une manip et de voir que tu étais là, fidèle au poste. Merci pour toutes ces discussions que nous avons eues.

Vincent, merci d'avoir toujours été là. Merci pour ton soutien inconditionnel qui m'a beaucoup aidée dans les moments pas toujours faciles. La thèse n'aurait pas été la même sans toi. Merci pour tout.

Sandra, merci d'être là. Ça ne fait pas si longtemps que ça que l'on se connaît mais merci d'être là, merci pour ton soutien, ton implication et pour tous tes conseils.

Manon, ma complice des expériences du week-end et partenaire d'escalade. Merci pour ton aide précieuse et ton soutien sur tellement d'aspects.

Merci également à David, pour tous tes conseils, toutes ces discussions. Je n'oublie pas que tu me dois toujours des bretzels en échange de toutes les madeleines que je t'ai faites pendant la thèse !

Alice, une amie fantastique que j'ai de la chance d'avoir. On a commencé ce voyage ensemble et même à 700 km l'une de l'autre tu as toujours été là quand j'avais besoin. Merci d'être là, tout simplement.

Les anciens du M2 GCD, Mathieu, Ali, Clair, Romain, Evangéline et Marie-Kerguelen, merci pour votre soutien et les moments de rigolade qu'on a pu avoir et qu'on aura encore.

Camille, ma meilleure amie. Quoique je dise, ce ne sera jamais assez. Merci pour toutes ces années où tu étais là et pour toutes celles où le seras encore, je le sais.

A mes parents, merci pour votre soutien, c'est grâce à vous que j'en suis arrivée là.

# Table des matières

<b>TABLES DES FIGURES .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>1 LE CANCER .....</b>	<b>15</b>
1.1 Les différentes étapes d'évolution .....	15
1.2 Le microenvironnement .....	16
1.3 Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs .....	17
1.4 Caractéristiques des cellules cancéreuses .....	17
1.4.1 Prolifération incontrôlée .....	19
1.4.2 Une résistance accrue à la mort cellulaire programmée .....	20
1.4.2.1 La mort cellulaire programmée ou apoptose .....	20
1.4.2.2 L'apoptose et le cancer .....	24
<b>2 LES EPITHELIUMS : POINT DE DEPART DES CARCINOMES .....</b>	<b>27</b>
2.1 L'organisation épithéliale .....	27
2.1.1 Une polarité apico-basale .....	27
2.1.2 Les jonctions de la cellule .....	29
2.1.2.1 Les jonctions cellule-matrice extra-cellulaire .....	30
2.1.2.2 Les jonctions serrées .....	32
2.1.2.3 Les jonctions adhérentes .....	33
2.2 La dynamique épithéliale .....	34
2.2.1 Le cytosquelette .....	34
2.2.1.1 L'actine .....	35
2.2.1.2 La Myosine-II non musculaire .....	36
2.2.2 Dynamique du cytosquelette dans la cellule .....	38
2.2.2.1 La constriction apicale .....	40
2.2.2.2 L'intercalation cellulaire .....	41
<b>3 LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE, UN PROCESSUS CLE DE L'EVOLUTION TUMORALE .....</b>	<b>44</b>
3.1 La TEM : régulation et dynamique .....	47
3.2 La TEM dans la progression tumorale .....	49
3.2.1 L'induction de la TEM par les cellules du microenvironnement .....	51
3.2.2 L'induction de la TEM par les propriétés mécaniques .....	52
3.2.2.1 La compression exercée par l'environnement autour de la tumeur .....	52
3.2.2.2 Les propriétés intrinsèques des cellules tumorales .....	53
3.2.2.2.1 La prolifération des cellules tumorales .....	55

3.2.2.2	<i>Dissémination des métastases</i> .....	56
3.2.2.3	<i>Transition vers un état plus agressif</i> .....	56
4	LA DROSOPHILE COMME ORGANISME MODELE D'ETUDE DE LA TUMORIGENESE .....	59
4.1	La formation de tumeurs hyperplasiques .....	63
4.1.1	<i>La prolifération incontrôlée</i> .....	63
4.1.2	<i>La résistance accrue à l'apoptose</i> .....	66
4.2	La formation de tumeurs dysplasiques .....	69
4.2.1	<i>Perturbation de la polarité apico-basale</i> .....	69
4.2.2	<i>Facteurs qui influencent les tumeurs dysplasiques</i> .....	70
4.3	Les étapes tardives de la progression tumorale .....	72
4.3.1	<i>Invasion, formation de métastases</i> .....	72
4.3.2	<i>La cachexie, un symptôme associé au cancer</i> .....	73
	<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>76</b>
	<b>RESULTATS</b> .....	<b>79</b>
1	IDENTIFICATION DE DEUX NOUVEAUX FACTEURS INTRINSEQUES INDUCTEURS DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE CHEZ LA DROSOPHILE .....	83
1.1	Un modèle pour étudier l'évolution tumorale .....	83
1.2	Des éléments du microenvironnement ou du métabolisme comme inducteurs de la TEM ? .....	87
1.3	Vers une modification des propriétés mécaniques du tissu .....	90
1.4	Est-ce que cette augmentation de tension jonctionnelle joue un rôle sur la progression tumorale ? .....	92
1.4.1	<i>Stratégies pour diminuer la tension jonctionnelle</i> .....	92
1.4.2	<i>Une stratégie alternative : induire la dégradation de la Myosine-II</i> .....	93
1.5	Augmenter la tension jonctionnelle .....	95
1.5.1	<i>Yorkie, un contexte tumoral strictement épithélial chez la drosophile</i> .....	95
1.5.2	<i>Stratégies pour augmenter la tension jonctionnelle</i> .....	98
1.5.2.1	<i>Perturbation de la régulation de la Myosine-II</i> .....	98
1.5.2.2	<i>Relocalisation de la Myosine-II</i> .....	100
1.5.3	<i>Effet de l'augmentation de tension jonctionnelle dans les tumeurs hyperplasiques</i> .	101
1.6	Une corrélation spatiale entre augmentation de tension jonctionnelle et apoptose .....	103
1.7	Un rôle de l'apoptose dans la progression tumorale ? .....	105
1.8	L'apoptose fragilise les jonctions adhérentes et septées .....	108
1.9	Un lien entre apoptose et tension jonctionnelle ? .....	112
1.10	Un rôle direct de la tension jonctionnelle sur la TEM ? .....	113
1.11	Vers l'identification d'une cible moléculaire responsable de la TEM dans un contexte tumoral .....	115

2	RESULTATS COMPLEMENTAIRES : CARACTERISATION ET ETUDE FONCTIONNELLE DE MMP1 DANS LES TUMEURS.....	118
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>121</b>
1	PROPRIETES MECANIQUES ET TUMORIGENESE .....	124
1.1	Quelle est l'origine de l'augmentation de tension jonctionnelle ?.....	126
1.2	Comment l'augmentation de tension jonctionnelle agit pour induire la transition hyperplasie-dysplasie ? .....	129
1.2.1	<i>Un effet mécanique direct sur la stabilité/intégrité des jonctions adhérentes ? .....</i>	<i>129</i>
1.2.2	<i>Un effet à plus long terme via l'activation de mécanismes de mécanotransduction ? .....</i>	<i>131</i>
2	APOPTOSE ET TUMORIGENESE .....	136
3	VERS UNE GENERALISATION DU ROLE PRO-TUMORAL DE L'APOPTOSE ET DES PROPRIETES MECANIQUES DES JONCTIONS ADHERENTES ? .....	140
	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>145</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>153</b>
	<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>209</b>



# Tables des figures

Figure 1 : Evolution de la vision du cancer .....	16
Figure 2 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses.....	18
Figure 3 : La cascade apoptotique chez les mammifères.....	21
Figure 4 : L'apoptose est impliquée dans de nombreux processus développementaux .....	23
Figure 5 : Mécanismes de résistance accrue à l'apoptose identifiés dans les cellules cancéreuses .....	26
Figure 6 : La mise en place de la polarité apico-basale.....	28
Figure 7 : Les cellules d'un épithélium sont reliées entre elles et à la matrice extracellulaire <i>via</i> différentes jonctions .....	30
Figure 8 : Structure et maturation des adhésions focales.....	32
Figure 9 : Structure et réponse aux forces des jonctions adhérentes .....	33
Figure 10 : Les différents cytosquelettes présents dans la cellule.....	34
Figure 11 : La polymérisation des filaments d'actine .....	36
Figure 12 : Dynamique de la Myosine-II .....	38
Figure 13 : Les différents réseaux d'actomyosine au sein de la cellule .....	39
Figure 14 : Mécanisme de constriction apicale.....	41
Figure 15 : Mécanisme d'intercalation cellulaire .....	43
Figure 16 : La progression des carcinomes.....	44
Figure 17 : La transition épithélio-mésenchymateuse .....	45
Figure 18 : Rôle de la TEM dans le développement.....	46
Figure 19 : Un modèle intégré de la dynamique cellulaire de la TEM.....	48
Figure 20 : L'induction de la TEM des cellules tumorales par les cellules du microenvironnement .....	51
Figure 21 : Modèle hypothétique de l'impact mécanique sur la progression tumorale .....	58
Figure 22 : Le cycle de développement de la drosophile.....	60
Figure 23 : Les tumeurs chez la drosophile .....	61
Figure 24 : Les disques imaginaux chez la drosophile .....	62
Figure 25 : Comparaison des jonctions intercellulaires entre la drosophile et les mammifères.....	63

Figure 26 : La cascade apoptotique chez la drosophile.....	66
Figure 27 : Voie de signalisation Hippo et dérégulation dans les cancers.....	68
Figure 28 : Les différentes étapes de la formation de tumeurs chez la drosophile ...	70
Figure 29 : Bilan des données connues sur la tumorigénèse chez la drosophile .....	75
Figure 30 : Objectifs de la thèse .....	77
Figure 31 : Caractérisation au niveau tissulaire des tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> au cours du temps.....	84
Figure 32 : Caractérisation cellulaire des tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	86
Figure 33 : Le microenvironnement et le métabolisme n'ont pas d'effet sur l'induction de la TEM associée à la progression des tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	88
Figure 34 : Une augmentation de la tension jonctionnelle précède la TEM dans les tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	91
Figure 35 : Cascade de régulation de la Myosine-II .....	92
Figure 36 : Stratégies pour diminuer la tension jonctionnelle .....	93
Figure 37 : Le GFP <sup>RNAi</sup> permet d'induire la dégradation de 50% de la Myosine-II ....	94
Figure 38 : Caractérisation cellulaire et tissulaire des tumeurs Yki <sup>SAX3</sup> .....	97
Figure 39 : Les tumeurs <sup>YkiSAX3</sup> ne présentent pas de modifications des propriétés mécaniques aux jonctions adhérentes .....	98
Figure 40 : Le flw <sup>RNAi</sup> permet d'augmenter la Myosine-II aux jonctions adhérentes et induire une augmentation de tension jonctionnelle.....	99
Figure 41 : L'AJ-GFP-Trap permet d'augmenter fortement la Myosine-II aux jonctions adhérentes.....	101
Figure 42 : Une augmentation de tension jonctionnelle induit la TEM dans les tumeurs Yki <sup>SAX3</sup> .....	102
Figure 43 : L'augmentation de tension jonctionnelle induit de l'apoptose dans un contexte développemental.....	103
Figure 44 : La présence d'apoptose corrèle avec une augmentation de tension jonctionnelle dans les tumeurs Yki <sup>SAX3</sup> et Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	104
Figure 45 : Stratégies pour inhiber l'apoptose dans les tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	107
Figure 46 : L'apoptose favorise la TEM dans les tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	107
Figure 47 : Stratégie d'induction d'apoptose ectopique .....	109
Figure 48 : L'apoptose induit la TEM dans une tumeur Yki <sup>SAX3</sup> .....	111
Figure 49 : L'apoptose fragilise les jonctions adhérentes et septées dans les tumeurs Yki <sup>SAX3</sup> .....	111

Figure 50 : La présence d'apoptose corrèle avec une fragilisation des jonctions dans les tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> à 96h ADO.....	112
Figure 51 : L'apoptose n'altère pas les niveaux de Myosine-II apicale dans les tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	113
Figure 52 : La tension jonctionnelle peut induire la TEM sans apoptose.....	114
Figure 53 : Schéma bilan : la tension jonctionnelle induit la progression tumorale via deux mécanismes distincts.....	115
Figure 54 : Les FT pro-mésenchymateux ne sont pas exprimés dans les tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> .....	116
Figure 55 : Grh est réprimé dans les cellules mésenchymateuses des tumeurs Syx7 <sup>RNAi</sup> et Yki <sup>SAX3</sup> + flw <sup>RNAi</sup> .....	117
Figure 56 : Expression et impact de MMP1 sur le développement des tumeurs ....	120
Figure 57 : Bilan de mes résultats de thèse.....	123
Figure 58 : L'augmentation protéique de Sqh est due à une augmentation transcriptionnelle .....	128
Figure 59 : Impact de la Myosine-II sur les jonctions adhérentes .....	130
Figure 60 : Voie de signalisation JNK chez la drosophile .....	132
Figure 61 : Les cellules apoptotiques tumorales favorisent la prolifération des cellules tumorales autour.....	136
Figure 62 : Caractérisation du contexte Polyhoméotique .....	142
Figure 63 : Caractérisation de deux autres contextes génétiques : Ras <sup>V12</sup> et aPKC <sup>DN</sup> .....	143





# Liste des abréviations

**ADO** : Après Dépôt de l'œuf  
**AFM** : Atomic Force Microscopy  
**Baz** : Bazooka  
**CAF** : Cancer associated Fibroblasts  
**Diap1** : Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein 1  
**Dlg** : Disc Large  
**Ecad** : E-cadhérine  
**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor  
**FAK** : Focal Adhesion Kinase  
**FT** : Facteur de transcription  
**Lgl** : lethal giant larvae  
**MEC** : Matrice Extracellulaire  
**miRHG** : miRNA dirigé contre *reaper*, *hid* et *grim*  
**MMP** : Métallo Protéinases de la Matrice  
**ph** : polyhoméotique  
**ROCK** : Rho associated Kinase  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**sqh** : *spaghetti squash*  
**Syx7** : Syntaxine 7  
**TAM** : Tumor Associated Macrophages  
**TEM** : transition épithélio-mésenchymateuse  
**Vkg** : viking (Collagène IV chez la drosophile)  
**Yki** : Yorkie



# Introduction



# 1 Le cancer

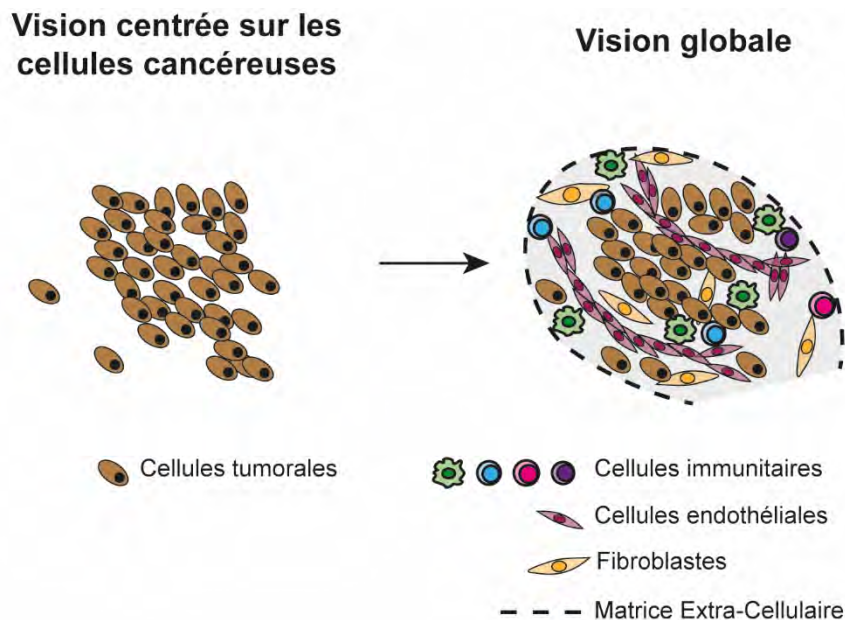
Selon le National Institutes of Health (NIH), le cancer correspond à une pathologie évolutive dans laquelle les cellules d'un organisme se multiplient de manière complètement incontrôlée et peuvent disséminer dans d'autres parties du corps. Un cancer peut se développer à partir de n'importe quel type cellulaire, bien que les cancers issus de cellules épithéliales, sur lesquels je reviendrai un peu plus tard, prédominent et représentent une grande majorité des cancers chez l'Homme (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 1.1 Les différentes étapes d'évolution

Associé généralement à la formation de tumeurs, le cancer est en réalité associé uniquement à certains types de tumeurs qu'il convient de distinguer et de définir. Une tumeur est un amas de cellules, dont la présence est anormale, et qui est le résultat d'une prolifération incontrôlée. Néanmoins, il est important de préciser qu'une tumeur n'est pas forcément associée à l'apparition d'un cancer. En effet, les tumeurs peuvent être bénignes, c'est-à-dire qu'il y a effectivement une excroissance de tissu mais (1) les cellules qui constituent la tumeur conservent les propriétés du tissu dont elles sont issues, (2) l'excroissance reste encapsulée et n'envahit pas les tissus voisins et (3) l'excroissance ne récidive pas après avoir été enlevée. C'est par exemple ce qui se passe lors de l'apparition de polypes dans l'intestin. Néanmoins, dans certains cas, il peut arriver que les tumeurs bénignes évoluent pour devenir plus agressives et sont alors qualifiées de tumeurs malignes. C'est à partir de ce stade que l'on parle de cancer. Les cellules de la tumeur, en plus de proliférer de façon importante, se différencient, perdent les caractéristiques du tissu d'origine et la tumeur envahit les tissus voisins. Enfin, l'étape la plus agressive, et responsable de la majorité des décès dans les cancers, est la formation de métastases. Au cours de cette étape, les cellules de la tumeur initiale, que l'on appelle tumeur primaire, acquièrent des propriétés migratoires, quittent la tumeur primaire, et migrent à travers les tissus jusqu'à rejoindre le système sanguin ou lymphatique. Ces cellules peuvent ensuite quitter le système circulatoire pour s'implanter dans d'autres tissus et former des tumeurs, que l'on qualifie de secondaires.

## 1.2 Le microenvironnement

Longtemps, les études se sont focalisées uniquement sur l'étude des cellules tumorales elles-mêmes afin de comprendre comment elles pouvaient induire la formation de tumeurs ou encore migrer jusqu'à des sites secondaires. Néanmoins, si ces études ont permis de très largement contribuer à notre compréhension de cette pathologie, aujourd'hui il est évident qu'elles reposaient sur une vision dite réductionniste de la tumorigénèse (Hanahan and Weinberg, 2000). En effet, si les cellules tumorales constituent effectivement la tumeur, il est maintenant admis que l'environnement tout autour de la tumeur, que l'on appelle microenvironnement joue également un rôle majeur dans la tumorigénèse (Figure 1).



**Figure 1 : Evolution de la vision du cancer**

La vision de l'étude des tumeurs a considérablement évolué au cours de ces dernières années. Si longtemps, l'étude de la tumorigénèse se focalisait sur les cellules tumorales, aujourd'hui il est devenu évident que les tumeurs doivent être considérées comme des tissus complexes constitués de différents types cellulaires qui s'influencent mutuellement. Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2000)

Ce microenvironnement est constitué de différents types cellulaires et d'une matrice extracellulaire au sein et autour de la tumeur. On y trouve par exemple des cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocyte T et B, cellules dendritiques), des fibroblastes ou encore des cellules endothéliales, chacun de ces types cellulaires affectant la tumorigénèse d'une certaine manière. Détournés de leurs fonctions par les cellules tumorales, les cellules du système immunitaire et les fibroblastes favorisent la croissance de la tumeur tandis que les cellules endothéliales, en favorisant la

vascularisation de la tumeur, permettent l'apport de nutriments et d'oxygène au centre de la tumeur (Ferguson et al., 2021; Hanahan and Weinberg, 2011; Quail and Joyce, 2013; Yaacoub et al., 2016). La prise en compte du microenvironnement dans la tumorigénèse est donc cruciale pour les études à venir.

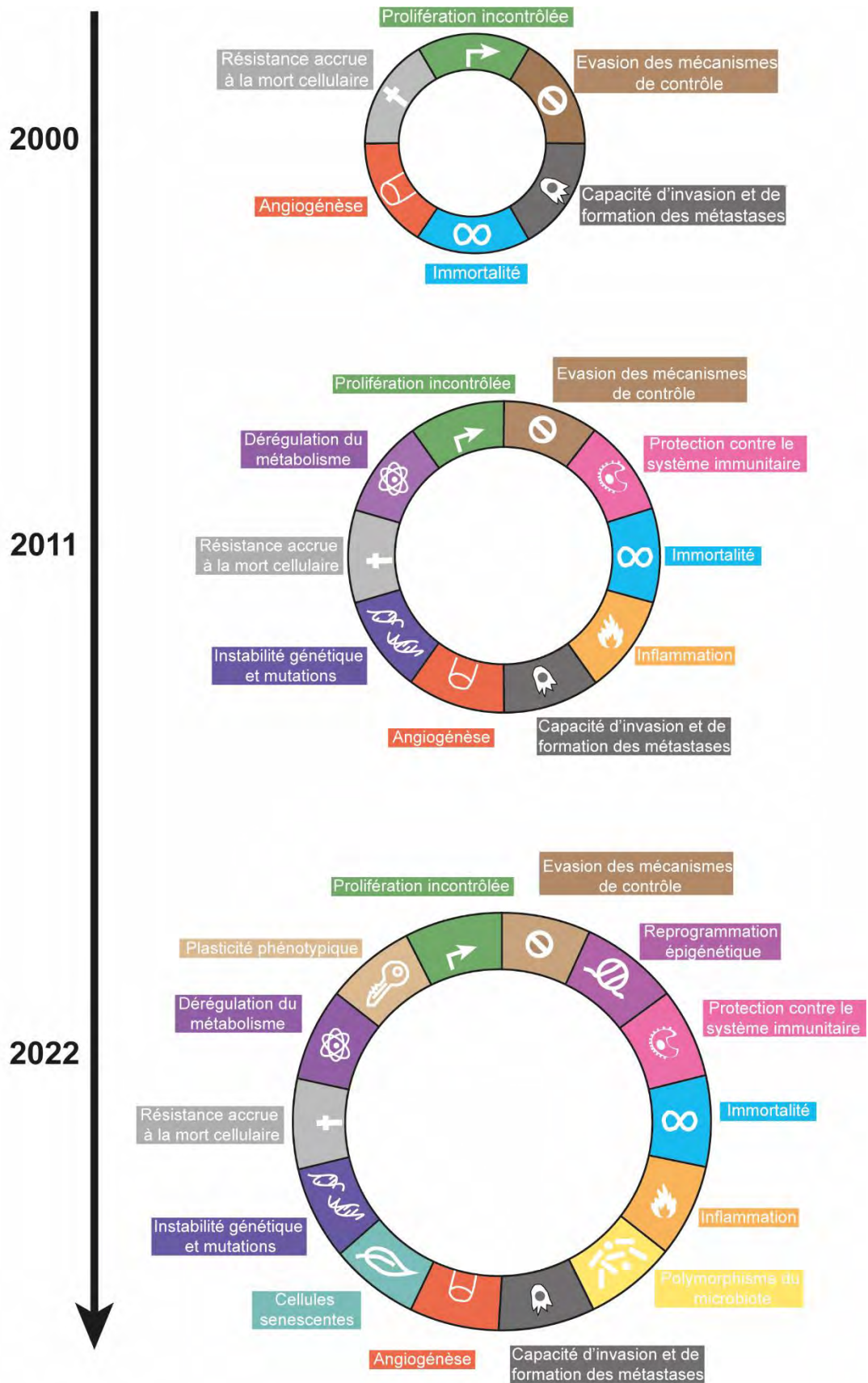
### 1.3 Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Le cancer est le résultat d'une accumulation de mutations dans des gènes clés qui perturbent le fonctionnement normal des cellules. Parmi les gènes les plus souvent affectés, on peut distinguer deux catégories, souvent associées : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les proto-oncogènes sont des gènes responsables de la prolifération des cellules. Ils permettent par exemple d'assurer un renouvellement des cellules et de maintenir l'homéostasie d'un tissu. Le gène *ras* a été un des premiers pro-oncogènes identifiés en 1982 et est aujourd'hui l'un des gènes les plus souvent observés mutés dans les cancers (Barbacid, 1987). En parallèle, de nombreux points de contrôle existent au sein de la cellule pour contrôler l'état des cellules et éliminer les cellules anormales. Parmi ces gènes on trouve notamment la protéine du rétinoblastome (pRB), premier gène suppresseur identifié en 1986 (Dannenberg and te Riele, 2006) ou encore des gènes impliqués dans la réparation après dommages à l'ADN. Des mutations au niveau d'oncogènes, en combinaison avec des mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs conduisent à une prolifération incontrôlée et au développement de tumeurs (Kontomanolis et al., 2020).

### 1.4 Caractéristiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un certain nombre de propriétés bien spécifiques qui leur confèrent ce caractère malin. A l'origine, Hanahan et Weinberg ont défini six propriétés qui, selon eux, seraient communes à tous les types de cancer (Hanahan and Weinberg, 2000). Parmi ces propriétés, on retrouve notamment : la prolifération incontrôlée, l'immortalité, la résistance accrue à l'apoptose ou encore la capacité d'invasion et de formation de métastases. Néanmoins, au cours de ces deux dernières décennies, cette liste de propriétés s'est considérablement étoffée pour être aujourd'hui au nombre de quatorze (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 2), témoignant ainsi de la complexité de cette pathologie.





**Figure 2 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses**

Le nombre de caractéristiques des cellules cancéreuses est en constante évolution et a énormément évolué en vingt ans. Adapté de (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011)

Comprendre comment et par quel(s) mécanisme(s) les cellules cancéreuses acquièrent ces propriétés si particulières représente un enjeu crucial dans la lutte contre le cancer. Aussi, je vais par la suite détailler deux des caractéristiques des cellules tumorales : la prolifération incontrôlée et la résistance accrue à l'apoptose, deux caractéristiques qui illustrent bien le rôle des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Je reviendrai sur la capacité d'invasion et de formation des métastases un peu loin dans la partie traitant de la « transition épithélio-mésenchymateuse ».

#### 1.4.1 Prolifération incontrôlée

La prolifération incontrôlée est une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses. Les cellules normales ont besoin de facteurs de croissance pour proliférer. Dans les tissus, la production et la libération de ces signaux est très finement contrôlée. Néanmoins, les cellules tumorales parviennent souvent à échapper à ce contrôle et à proliférer de manière complètement incontrôlée. On peut distinguer trois niveaux d'altération par lesquels les cellules tumorales acquièrent cette autonomie de croissance : une altération des signaux de croissance, une altération des transducteurs et une altération au niveau du circuit intracellulaire. En parallèle de ces mécanismes, les cellules tumorales développent également une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, que je ne développerai pas ici, et qui renforcent cette caractéristique de prolifération incontrôlée.

Le premier mécanisme que je souhaiterais mentionner est la production autonome de facteurs de croissance. En effet, si la plupart du temps, les cellules reçoivent des signaux produits par d'autres cellules et leur environnement, bien souvent les cellules tumorales ont été montrées comme produisant elles-mêmes différents facteurs de croissance (PDGF ou TGF $\alpha$  par exemple), conduisant par conséquent à un fonctionnement autocrine qui les libère de la dépendance aux signaux extérieurs (Aaronson, 1991; Becker et al., 1989). Les signaux de prolifération sont ensuite transmis à l'intérieur de la cellule *via* des récepteurs transmembranaires. Diverses études ont montré que plusieurs récepteurs transmembranaires sont surexprimés et/ou mutés dans de nombreux types de cancers. Par exemple, une surexpression de HER2 (pour Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) a été rapportée dans des cancers du sein et cette surexpression est corrélée avec un mauvais pronostic

(Slamon et al., 1989). Également, certains récepteurs, en plus d'être surexprimés, sont mutés et deviennent constitutivement activés, même en absence de ligand (Yarden and Ullrich, 1988).

Enfin, le dernier mécanisme utilisé par les cellules tumorales pour une prolifération incontrôlée est l'altération au niveau des composants intracellulaires des différentes voies de signalisation. En effet, de nombreuses mutations de différents composants ont été rapportées, et ce, dans différents types de cancers. L'exemple le plus connu est une altération au niveau de la cascade Ras-Raf-MEK-ERK. En effet, lorsque Ras est muté, la mutation Ras<sup>V12</sup> rend Ras constitutivement actif. Cette mutation est retrouvée dans plus de 90% des cancers pancréatiques et dans plus de 50% des cancer du côlon, induisant une prolifération incontrôlée. Cela suggère un rôle majeur de Ras dans la tumorigénèse et en fait une cible particulièrement étudiée dans les traitements anticancers (Roberts and Der, 2007).

#### 1.4.2 Une résistance accrue à la mort cellulaire programmée

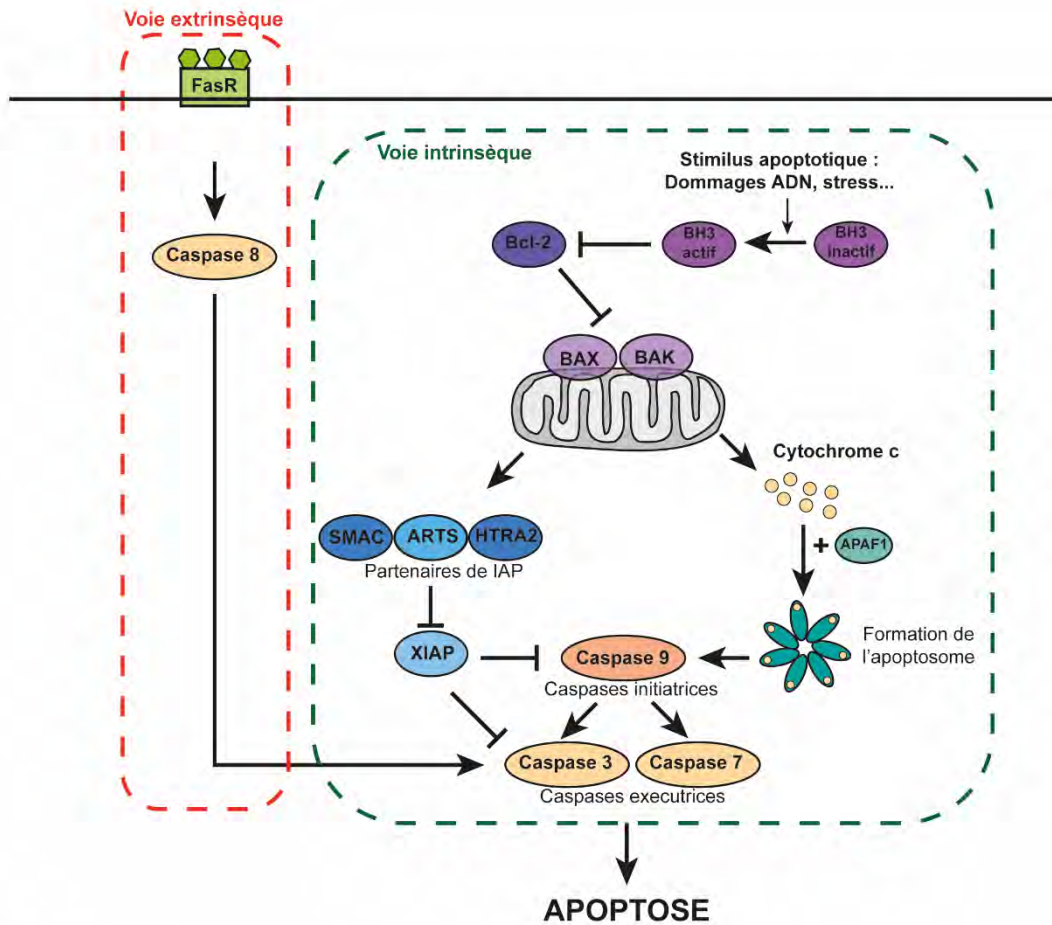
##### 1.4.2.1 La mort cellulaire programmée ou apoptose

Décrite en 1972 par John Kerr et al., l'apoptose est caractérisée par une destruction très stéréotypée de la cellule mettant en jeu un important remodelage de sa morphologie. Les étapes clés de l'apoptose consistent dans le bourgeonnement de la membrane, la condensation du noyau et la fragmentation de la cellule en petits « morceaux » que l'on nomme corps ou fragments apoptotiques.

Il s'agit d'un processus conservé au cours de l'évolution. Ainsi, l'étude de l'apoptose chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et la souris ont montré des similarités entre les acteurs bien que les voies soient plus complexes chez les organismes plus évolués (Fuchs and Steller, 2011; Fuchs and Steller, 2015).

L'apoptose peut être déclenchée de deux manières distinctes : *via* la voie intrinsèque, par exemple suite à des dommages à l'ADN ou *via* la voie extrinsèque, lorsqu'un ligand se fixe au récepteur de mort (FasR). Néanmoins, ces deux voies d'activation convergent sur l'activation des caspases, acteurs principaux du processus apoptotique. Les caspases sont des cystéines protéases et sont exprimées en permanence dans chacune de nos cellules mais maintenues sous une forme inactive (Figure 3).

A



B

**Caspases initiatrices**



**Caspases Effectrices**



**Figure 3 : La cascade apoptotique chez les mammifères**

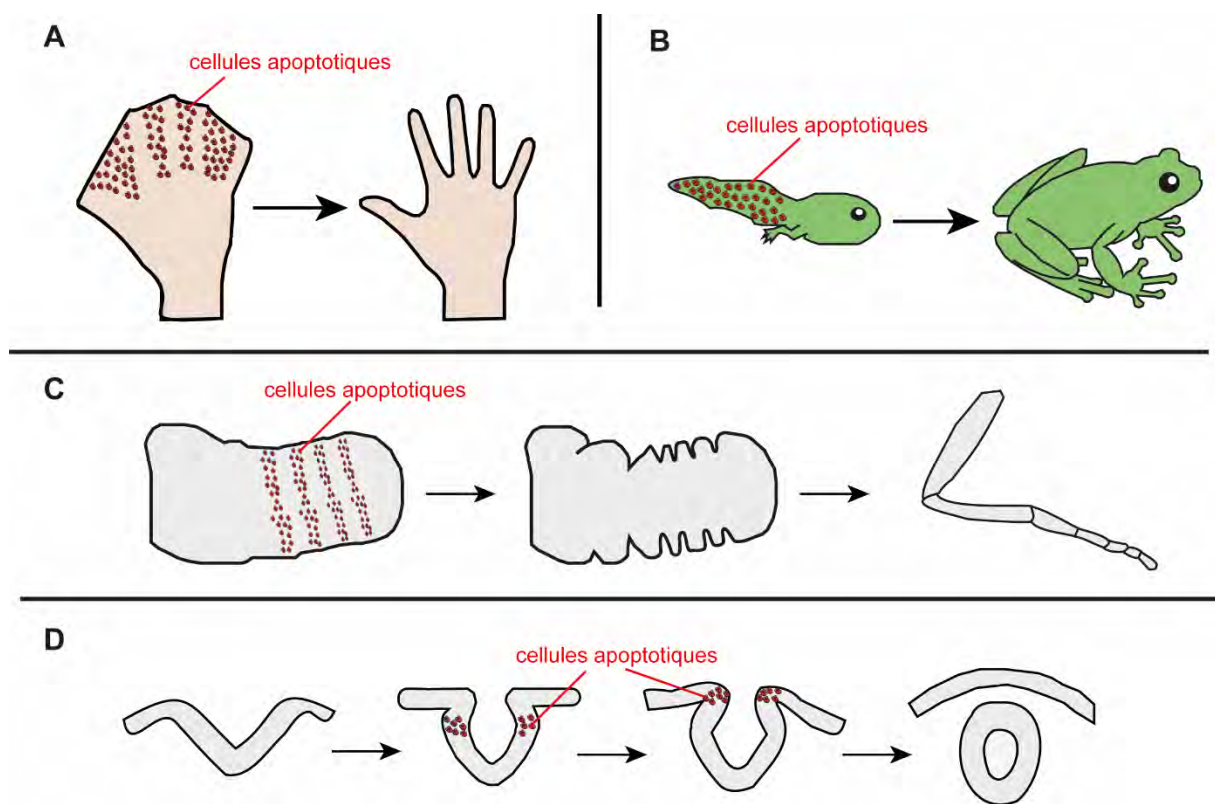
(A) L'apoptose peut être induite de deux manières différentes : *via* la voie extrinsèque (carré rouge) ou *via* la voie intrinsèque (carré vert). Pour la voie extrinsèque, suite à la fixation du ligand sur le récepteur FAS (FasR), cela induit l'activation de la caspase 8 qui active les caspases 3 et 7 qui induisent l'apoptose. Pour la voie intrinsèque, c'est un signal à l'intérieur de la cellule (dommages à l'ADN, stress) qui induit l'activation de BH3 qui va ensuite inhiber les molécules de la famille Bcl2. Cette inhibition permet l'assemblage de BAX et BAK au niveau de la mitochondrie permettant à la fois la libération des partenaires de IAP et du cytochrome c. Les partenaires de IAP inhibent la protéine XIAP, permettant l'activation des caspases 9, 3 et 7. Le cytochrome c, en s'associant à APAF1 forme l'apoptosome qui permet d'activer la caspase 9. (B) Structure et processus d'activation des caspases initiatrices et effectrices.

Chez les mammifères, le déclenchement de l'apoptose modifie la balance entre les composants de la famille anti-apoptotique Bcl2 et les composants pro-apoptotiques de la famille BH3. Suite au stimulus apoptotique, BH3, devenu actif, inhibe Bcl2 et permet l'assemblage de BAX (Bcl2-associated X protein) et BAK (Bcl2-antagonist/killer) qui vont induire une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, provoquant ainsi un relargage du cytochrome c. Le cytochrome c, en s'associant avec la protéine APAF1 permet la formation de l'apoptosome, un complexe macromoléculaire qui permet de concentrer localement les caspases initiateuses, et ainsi de les activer. Dans le même temps, des molécules antagonistes des IAP (inhibitor of apoptotic protein) sont libérées par la mitochondrie et permettent d'inhiber XIAP qui maintient normalement les caspases inactives. Une fois cette inhibition levée et grâce à l'activation par l'apoptosome, les caspases activateuses activent ensuite les caspases effectrices, notamment les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui vont pouvoir déclencher l'apoptose en agissant sur différentes cibles dans la cellule (Figure 3) (Fuchs and Steller, 2011).

L'apoptose est un processus essentiel et particulièrement important, que ce soit pendant le développement ou à l'âge adulte. Au cours du développement, l'apoptose permet de sculpter des organes en permettant l'apparition ou la disparition de structures. L'exemple le plus parlant est l'interdigitation chez les vertébrés supérieurs. En effet, les cellules se trouvant entre les futurs doigts vont progressivement mourir par apoptose, ce qui va permettre la bonne formation des doigts (Figure 4A) (Suzanne and Steller, 2013). L'apoptose permet également de faire disparaître des structures inutiles comme par exemple la queue chez les têtards qui va être éliminée par apoptose au moment de la métamorphose (Figure 4B). De plus, l'apoptose a également été montrée comme participant activement aux changements de forme des tissus au cours du développement de certains organismes. Chez la drosophile au cours de la métamorphose, les cellules apoptotiques induisent des forces, modifiant ainsi l'environnement mécaniques des cellules voisines, conduisant *in fine* à la formation de plis qui préfigureront les articulations de la patte chez l'adulte (Figure 4C) (Ambrosini et al., 2019; Monier et al., 2015). Chez le poulet également, les cellules apoptotiques participent à la formation correcte du tube neural en induisant des forces qui aident à la fermeture du tube neural (Figure 4D) (Roellig et al., 2022; Yamaguchi et al., 2011).



A l'âge adulte, l'apoptose assure principalement un mécanisme de « contrôle qualité ». En effet, c'est elle qui va permettre de réguler le nombre de cellules d'un individu et surtout d'éliminer les cellules dangereuses qui pourraient émerger. Au niveau du système immunitaire par exemple, tous les lymphocytes B et T nouvellement formés passent deux points de contrôle ayant pour but de vérifier qu'ils ne réagissent pas aux cellules du soi. Ceux qui réagissent aux cellules du soi sont aussitôt éliminés par apoptose afin d'éviter de développer une auto-immunité (Opferman and Korsmeyer, 2003). C'est également par apoptose que les cellules dangereuses, cellules infectées par des virus ou qui présentent des dommages à l'ADN, sont normalement éliminées.



**Figure 4 : L'apoptose est impliquée dans de nombreux processus développementaux**

Différents processus développementaux impliquant l'apoptose. (A) Mécanisme d'interdigitation chez les vertébrés où l'apoptose permet l'élimination des cellules entre les futurs doigts. (B) Mécanisme d'élimination de la queue chez les têtards par apoptose au cours de la métamorphose. (C) Formation des articulations de la patte de drosophile. Les cellules apoptotiques qui apparaissent permettent de modifier les propriétés du tissu environnant et de former quatre plis parallèles qui donneront les articulations chez la mouche adulte. (D) Fermeture du tube neural chez les vertébrés où l'apoptose permet au tube de se plier et se fermer correctement. Adapté de (Pérez-Garijo and Steller, 2015)

La régulation de l'apoptose, aussi bien dans le développement qu'à l'âge adulte est donc cruciale. En effet, une apoptose mal régulée chez l'adulte peut conduire à l'apparition de certaines pathologies : une apoptose trop importante peut conduire à

l'apparition de maladies neurodégénératives tel que la maladie de Parkinson tandis qu'à l'inverse, une apoptose trop peu importante ou détournée peut conduire à l'apparition de maladies auto-immune ou de cancers. En effet, dans le cas des cancers, les cellules cancéreuses parviennent souvent à échapper à la mort cellulaire grâce à différents mécanismes qui leur confèrent une résistance accrue à la mort cellulaire.

#### 1.4.2.2 *L'apoptose et le cancer*

C'est en 1972 que Kerr, Wyllie et Curie ont proposé pour la première fois que « l'hyperplasie pourrait résulter d'une diminution de l'apoptose plutôt que d'une augmentation de la prolifération cellulaire » (Kerr et al., 1972).

L'identification de l'oncogène Bcl-2 va permettre de supporter cette théorie. En effet, c'est une translocation présente dans plus de 80% des lymphomes qui a permis d'identifier Bcl-2 (Korsmeyer, 1992; Pegoraro et al., 1984). Cette translocation t[14 ;18] fusionne le gène Bcl-2 au gène codant pour la chaîne lourde de l'immunoglobuline, modifiant ainsi son activité transcriptionnelle (Graninger et al., 1987). Par la suite, plusieurs études ont rapporté (1) qu'il y avait une corrélation entre cette translocation et un mauvais pronostic dans différents cas de lymphomes (Gascoyne et al., 1997; Hermine et al., 1996; Yunis et al., 1989) et (2) que cette translocation conférait une activité anti-apoptotique aux cellules, les protégeant ainsi contre différents agents de chimiothérapie (Minn et al., 1995; Miyashita and Reed, 1993; Vaux et al., 1988).

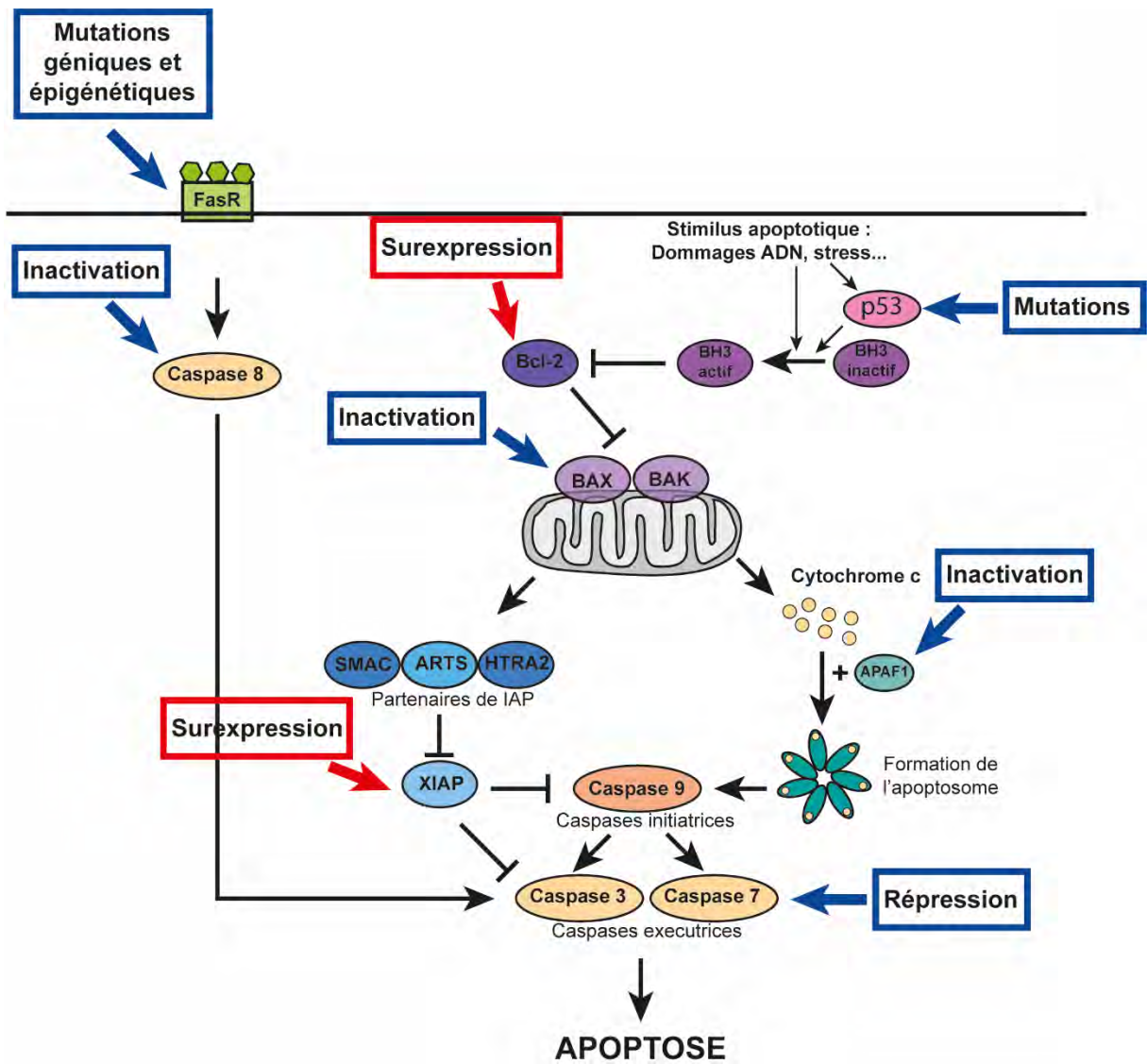
Depuis ces études pionnières, de nombreuses études ont par la suite identifié d'autres mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses acquièrent une résistance accrue à l'apoptose. Les cellules cancéreuses peuvent altérer les voies apoptotiques au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel et ce, à différents niveaux de la voie (Fulda, 2010). Ces modifications permettent aux cellules cancéreuses de modifier la balance entre les signaux pro et anti-apoptotiques, leur conférant ainsi une résistance accrue mais pas pour autant totale à l'apoptose.

Par exemple, au niveau de la voie intrinsèque, plusieurs études ont rapporté un déséquilibre entre les molécules de la famille pro-apoptotique BH3 et les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 (Galluzzi et al., 2010). Ainsi, dans des cas de cancers de l'endomètre ou dans des lymphomes folliculaires à cellules B, une surexpression des protéines de la famille Bcl-2 a été identifiée, conférant ainsi une résistance accrue à

l'apoptose à ces cellules cancéreuses (Rassidakis et al., 2003; Sakuragi et al., 2002). Également, une diminution des niveaux de caspase 3 a été rapportée dans des cas de cancer du sein (Devarajan et al., 2002). De plus, la voie extrinsèque peut également être altérée *via* la répression de l'expression des récepteurs de mort à la surface des cellules cancéreuses (Friesen et al., 1997) ou encore en modifiant l'expression ou la fonction de la caspase 8 (Kim et al., 2003). Enfin, si les voies même d'induction d'apoptose sont altérées, les signaux inducteurs d'apoptose en amont de ces voies, sont souvent modifiés également. L'exemple le plus connu est l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53, observée dans plus de 50% des cancers (Figure 5) (Vousden and Lane, 2007).

Les mécanismes de résistance accrue à l'apoptose étant de mieux en mieux caractérisés, de plus en plus de traitements ont pour but de cibler les protéines anti-apoptotiques dont l'expression est altérée dans le but de rendre les cellules cancéreuses de nouveau sensibles à l'apoptose (Vogler et al., 2017). Cependant, si le but principal des thérapies actuelles comme la chimiothérapie est d'éliminer les cellules cancéreuses, certaines études ont montré que l'apoptose peut aussi avoir un effet pro-tumoral. Ainsi, dans certains contextes, la mort cellulaire pourrait en réalité être délétère et favoriser la repopulation des cellules cancéreuses, comme nous le verrons un peu plus loin.





**Figure 5 : Mécanismes de résistance accrue à l'apoptose identifiés dans les cellules cancéreuses**

Les cellules cancéreuses emploient différents mécanismes qui leur confèrent une résistance accrue à l'apoptose. Globalement on peut distinguer deux mécanismes : l'inhibition des molécules pro-apoptotiques (cadres bleus) comme par exemple l'inactivation de BAX, BAK et de la caspase 8 et la surexpression de molécules anti-apoptotiques (cadres rouges).

## 2 Les épithéliums : point de départ des carcinomes

Si la plupart des propriétés mentionnées précédemment sont partagées par toutes les cellules cancéreuses, certaines peuvent varier selon le type cellulaire à l'origine du cancer. En effet, quasiment tous les types de cellules peuvent être à l'origine de cancer. Il en existe d'ailleurs plus d'une centaine différents répertoriés à ce jour. Cependant, parmi la grande diversité des cancers que l'on peut trouver, les cancers issus de cellules épithéliales prédominent et représentent plus de 80% des cancers chez l'homme (Hanahan and Weinberg, 2000). C'est d'ailleurs sur ce type de cancers, que l'on appelle carcinomes, que je me suis focalisée au cours de ma thèse. Néanmoins, pour comprendre la formation et l'évolution des carcinomes, il faut dans un premier temps bien comprendre les propriétés des cellules épithéliales, ce que je vais maintenant présenter à travers les connaissances acquises sur cellules en culture et pendant le développement.

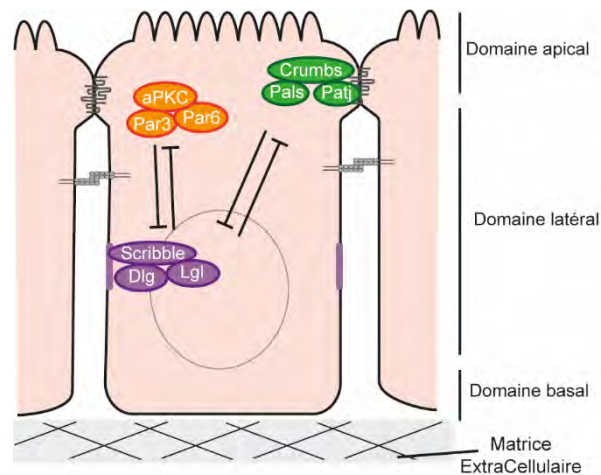
### 2.1 L'organisation épithéliale

Les cellules épithéliales, par opposition aux cellules mésenchymateuses sur lesquelles je reviendrai par la suite, sont reliées les unes aux autres et forment une barrière appelée épithélium, permettant de séparer deux compartiments. Les épithéliums sont les tissus les plus abondants dans l'organisme et on en retrouve dans la plupart des organes. Par exemple, au niveau de la peau, les cellules épithéliales assurent la fonction de barrière contre l'environnement extérieur tandis qu'au niveau de l'intestin, elles permettent l'absorption des nutriments. Si les cellules épithéliales peuvent présenter certaines caractéristiques propres à leur fonction (présence de micro-villi pour les cellules intestinales par exemple), de façon générale, elles présentent plusieurs caractéristiques communes, que je vais détailler par la suite.

#### 2.1.1 Une polarité apico-basale

Une des caractéristiques d'une cellule épithéliale est le fait qu'elle soit polarisée le long de l'axe apico-basal. En effet, on peut diviser la cellule en trois domaines : le domaine apical qui fait face à la lumière extérieure, le domaine basal qui repose sur une matrice extracellulaire et entre les deux le domaine latéral (Figure 6). Les différents complexes d'adhésions et de communication intercellulaires sont répartis sur la surface apico-latérale comme nous le verrons un peu plus loin.

La mise en place de cette polarité apico-basale est permise grâce à trois complexes protéiques : le complexe Crumbs (composé de Crumbs, Pals et Patj), le complexe Par (composé de Par3, Par6 et aPKC) et le complexe Scribble (composé de Scribble, Dlg et Lgl). Les complexes Crumbs et Par sont localisés au niveau apical des cellules tandis que le complexe Scribble est localisé au niveau baso-latéral (Figure 6). L'identité le long de l'axe apico-basal est conférée par une activité antagoniste entre ces complexes. En effet, les complexes Crumbs et Par inhibent la présence du complexe Scribble en apical et inversement, le complexe Scribble inhibe la présence des complexes Crumbs et Par au niveau basolatéral. Cette exclusion mutuelle permet de restreindre l'activité de chaque complexe à une localisation particulière de la cellule, conférant ainsi une identité de position le long de l'axe apico-basal (Figure 7) (Buckley and St Johnston, 2022a; Humbert et al., 2008).



**Figure 6 : La mise en place de la polarité apico-basale**

La polarité apico-basale est mise en place grâce à une activité antagoniste des différents complexes Crumbs (composé de Crumbs, Pals, Patj) Par (composé d'aPKC, Par3, Par6) et le complexe Scribble (composé de Scribble, Dlg, Lgl).

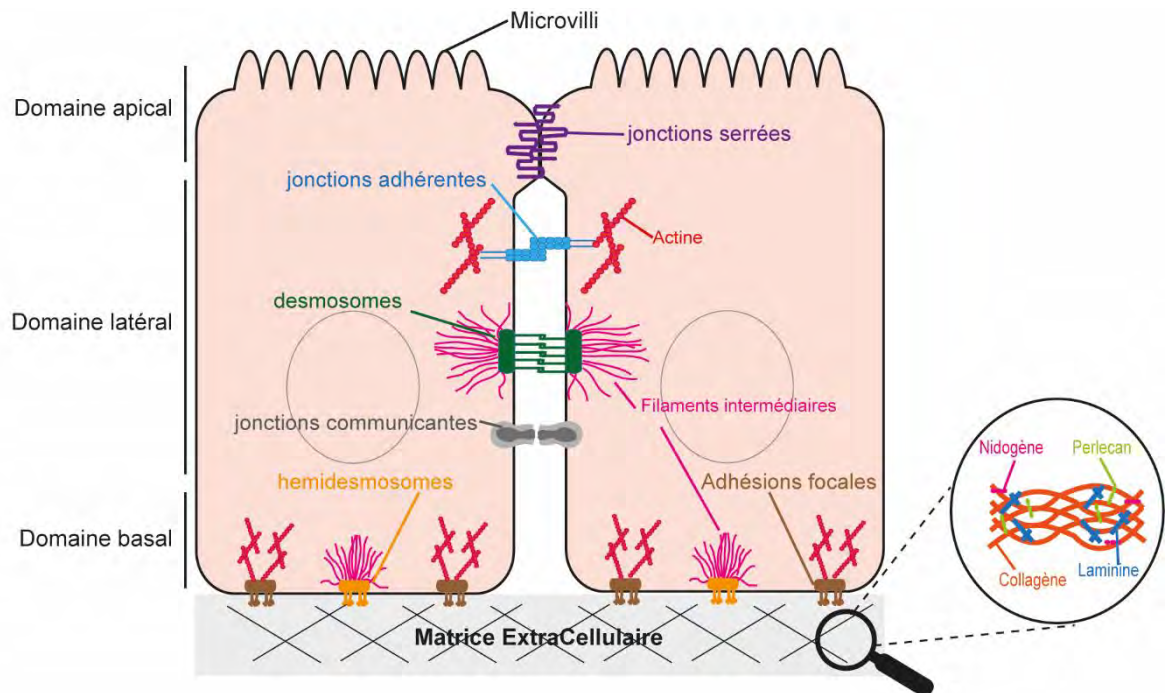
La mise en place de cette polarité est essentielle puisque c'est elle qui va permettre la mise en place correcte des différents éléments impliqués dans la fonction des cellules épithéliales, notamment la bonne localisation des jonctions intercellulaires. Une mauvaise mise en place ou une perturbation de la polarité apico-basale peut être à l'origine de défauts de développement ou de pathologies. Par exemple, une mutation de Scribble a été montrée comme responsable de défauts de la fermeture du tube neural chez la souris (Lesko et al., 2021; Murdoch et al., 2003). Une perturbation de la polarité apico-basale a également été associée au développement et à la progression des cancers. En effet, une mutation au niveau des composants responsables de la

polarité apico-basale peut induire une dérégulation de certaines voies de signalisation à l'origine d'une prolifération incontrôlée ou encore de la formation de métastases. Particulièrement bien étudié chez la drosophile, je reviendrai sur cet aspect dans la partie 4 (Buckley and St Johnston, 2022a; Jung et al., 2019; Kamei et al., 2007; Waghmare and Kango-Singh, 2016; Zhan et al., 2008).

### 2.1.2 *Les jonctions de la cellule*

Les cellules d'un épithélium sont reliées les unes aux autres grâce à différentes jonctions intercellulaires, essentielles pour l'homéostasie tissulaire, la transmission de signaux ou encore pour un comportement synchronisé des cellules. Ces différentes jonctions, réparties le long de l'axe apico-basal ont chacune une fonction bien spécifique (Figure 7). Par exemple, les jonctions serrées permettent de créer une barrière étanche au niveau apical des cellules tandis que les jonctions adhérentes et les desmosomes permettent de faire le lien entre les réseaux d'actine et de filaments intermédiaires respectivement de deux cellules voisines (Figure 7). Les cellules possèdent également des jonctions au niveau basal qui permettent de faire le lien entre la matrice extracellulaire sur laquelle reposent les cellules et l'intérieur de la cellule, notamment *via* les filaments intermédiaires et le cytosquelette d'actine (Figure 7).

Je vais par la suite détailler la structure et le rôle des jonctions basales, de manière conjointe à une brève description de la matrice-extracellulaire avec laquelle elles interagissent, des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, qui ont un rôle central dans mon projet de thèse.



**Figure 7 : Les cellules d'un épithélium sont reliées entre elles et à la matrice extracellulaire via différentes jonctions**

Au niveau apical, on trouve les jonctions serrées qui permettent de maintenir l'étanchéité de l'épithélium. Au niveau latéral, on trouve les jonctions adhérentes et les desmosomes qui permettent de relier les réseaux d'actine et de filaments intermédiaires respectivement de deux cellules voisines. Les jonctions communicantes permettent le passage de petites molécules. Au niveau basal, on trouve les hémidesmosomes et les adhésions focales qui font le lien entre la matrice extracellulaire, dont le réseau est représenté dans la loupe et respectivement les filaments intermédiaires et le cytosquelette d'actine.

#### 2.1.2.1 Les jonctions cellule-matrice extra-cellulaire

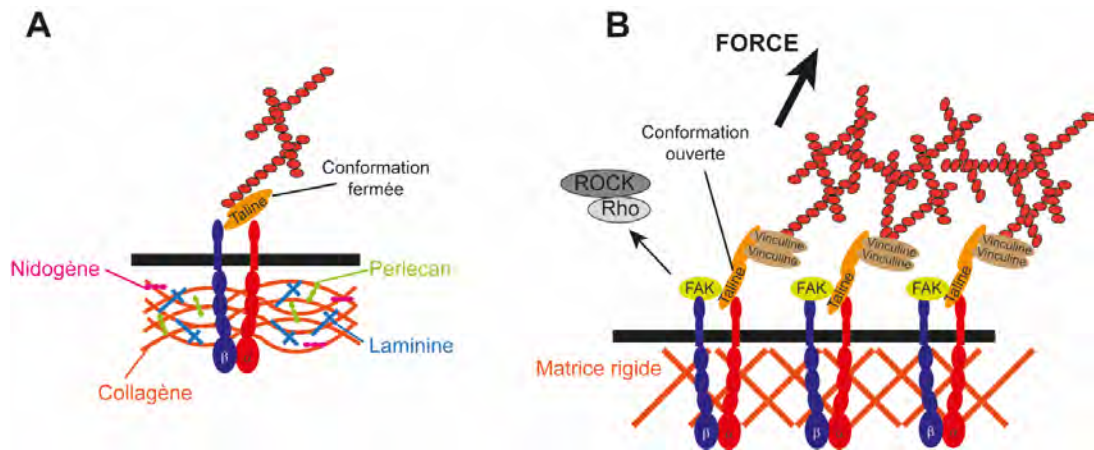
Les jonctions basales sont des complexes multiprotéiques qui permettent de faire le lien entre la matrice extracellulaire, et l'intérieur de la cellule. La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de protéines et de protéoglycans, parmi lesquels on retrouve notamment la Laminine, le Collagène, Nidogène et Perlecan (Figure 8A). Si la MEC assure avant tout un rôle de support pour la plupart des cellules, elle a également un rôle sur le comportement de la cellule. En effet, en modulant la diffusion de certains facteurs sécrétés ou en envoyant des signaux mécaniques à la cellule via les jonctions basales, la MEC peut influencer le comportement de la cellule en favorisant par exemple la prolifération, la survie ou la différenciation (Yurchenco, 2011).

Parmi les jonctions basales, on retrouve notamment les hémidesmosomes qui font le lien entre la MEC et les filaments intermédiaires et les adhésions focales, sur lesquelles je vais me concentrer. Les adhésions focales sont constituées d'un ensemble de protéines parmi lesquelles on retrouve notamment les intégrines. Les

intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques, constitués d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Au niveau de leur queue intracellulaire, les intégrines interagissent avec de multiples protéines adaptatrices parmi lesquelles on retrouve par exemple la Taline, la Vinculine ou la Paxiline qui permettent de faire le lien avec le cytosquelette d'actine (Figure 8) (Campbell and Humphries, 2011; Humphrey et al., 2014). Elles interagissent également avec des molécules de signalisation, comme les kinases FAK (pour Focal Adhesion Kinase) et Src, qui, en cas de stress pourront activer certaines voies de signalisation conduisant à un remodelage du cytosquelette. En effet, les adhésions focales permettent de faire le lien et de transmettre des signaux mécaniques entre la MEC et le cytosquelette de la cellule et sont donc constituées de différentes protéines mécanosensibles. Les intégrines par exemple, réagissent et transmettent des signaux suite à des changements de propriétés de la MEC. Cultiver des cellules sur substrat rigide conduit à la formation de clusters d'intégrines et au recrutement de FAK qui va pouvoir induire un réarrangement du cytosquelette d'actine et modifier le comportement de la cellule *via* l'activation de Rho/ROCK par exemple (Figure 8B) (Northey et al., 2017).

L'application de forces mécaniques sur les intégrines induit également un changement de conformation au niveau de la Taline qui passe d'une conformation « fermée » à une conformation « ouverte » révélant ainsi des sites de fixation, ce qui permet le recrutement de Vinculine qui stabilise le complexe (Figure 8B) (Levental et al., 2009; Martino et al., 2018; Northey et al., 2017; Ross et al., 2013). Ainsi, l'application de forces sur les complexes Intégrine, grâce à leur couplage à la fois à la MEC résistante et au cytosquelette sous tension, permet la maturation des adhérences basales grâce à une régulation mécanique.





### Figure 8 : Structure et maturation des adhésions focales

(A) Structure de la matrice extracellulaire et des adhésions focales. (B) Maturation des adhésions focales suite à une culture sur matrice rigide ou à l'induction de forces tirant sur le cytosquelette. Cela induit la formation de cluster d'intégrines, le recrutement de FAK, le changement de conformation de la Taline permettant le recrutement de la Vinculine. L'activation de FAK active ROCK et Rho qui induisent des réarrangements du cytosquelette d'actine.

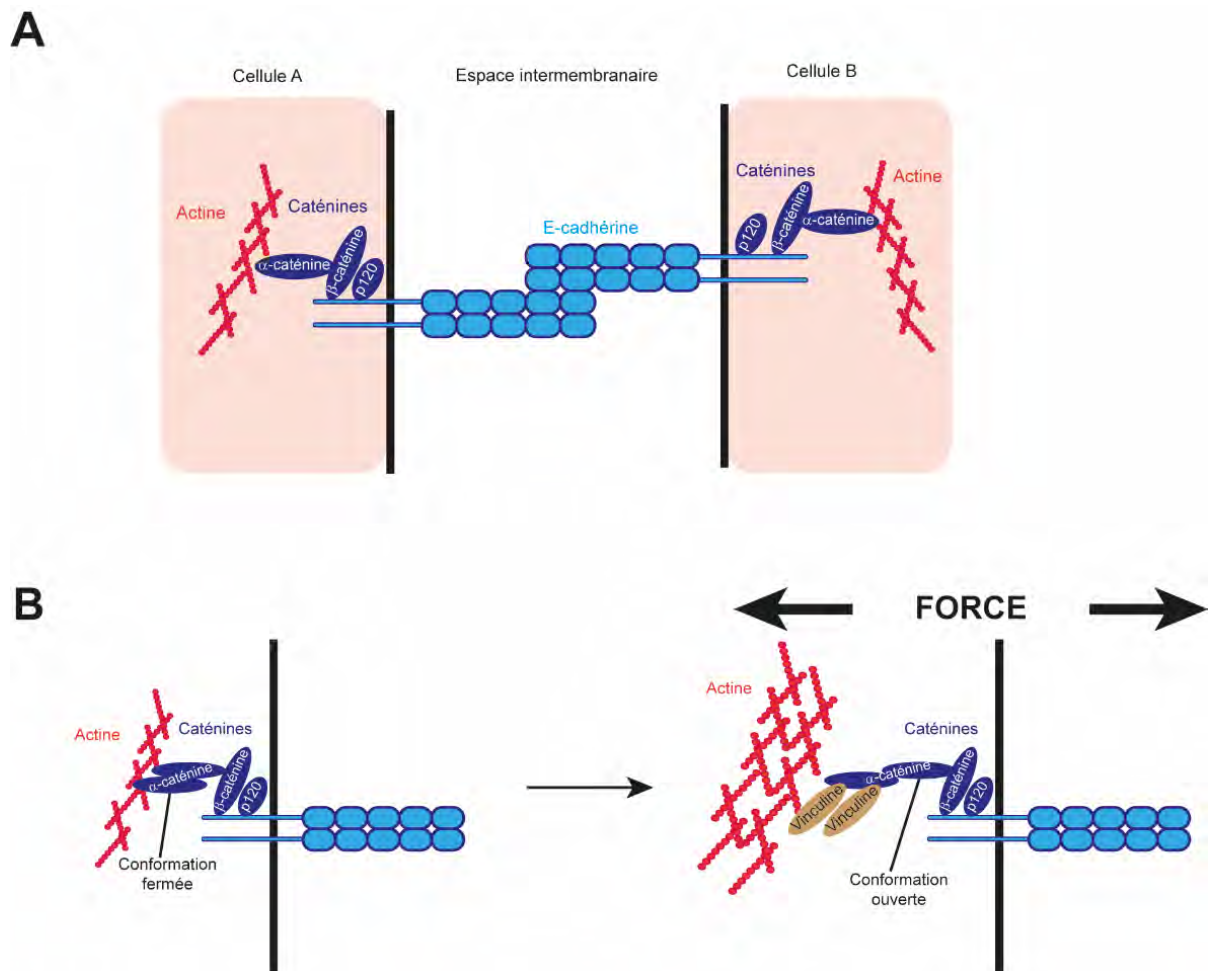
#### 2.1.2.2 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées permettent un contact étroit entre les membranes de deux cellules voisines, ce qui leur permet d'assurer une fonction de perméabilité et de maintien de l'intégrité du tissu. Elles ont également un rôle clé dans le maintien de la polarité apico-basale puisque certaines protéines constituant les jonctions serrées servent de point d'ancrage pour les protéines des complexes Par et Crumbs (Hurd et al., 2003). Chez les mammifères, elles sont localisées au niveau apical de la cellule, contrairement aux invertébrés où elles sont localisées sous les jonctions adhérentes, comme nous le verrons un peu plus loin.

Au niveau moléculaire, les jonctions serrées sont constituées par trois grandes familles de protéines : les claudines, les occludines et les Junctional adhesion molecules (JAM). Les claudines et occludines sont des protéines possédant quatre domaines transmembranaires tandis que les JAMs sont des protéines possédant deux domaines Ig. Ces protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine *via* des protéines adaptatrices appelées Zonula Occludens (ZO) (Otani and Furuse, 2020).

### 2.1.2.3 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes, conservées au cours de l'évolution, sont des complexes protéiques dont la E-cadhérine (Ecad) est un composant important (Halbleib and Nelson, 2006). La Ecad est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion calcium-dépendante entre deux cellules (Takeichi, 1977). Le domaine extra-cellulaire (domaine N-terminal de la protéine) de la Ecad est constitué de 5 domaines EC1 qui permettent de former une liaison homophile *trans* au domaine extra-cellulaire de la Ecad de la cellule voisine (Patel et al., 2006). Le domaine intra-cellulaire est quant à lui connecté au réseau d'actine grâce à différentes protéines appelées les caténines parmi lesquelles on retrouve  $\alpha$ -caténine,  $\beta$ -caténine et p120 (Figure 9A) (Coopman and Djiane, 2016).



**Figure 9 : Structure et réponse aux forces des jonctions adhérentes**

(A) Les jonctions adhérentes sont principalement constituées de la E-cadhérine (bleu clair). La E-cadhérine est constituée d'un domaine extracellulaire qui fait le lien avec une molécule de E-cadhérine de la cellule voisine et un domaine intracellulaire qui fait le lien avec le réseau d'actine *via* différentes caténines (bleu foncé). (B) Réponse des jonctions adhérentes aux forces. Suite à l'induction de forces au niveau des jonctions adhérentes, l' $\alpha$ -caténine change de conformation permettant de révéler des sites de la Vinculine qui peut être recrutée et stabiliser le complexe.

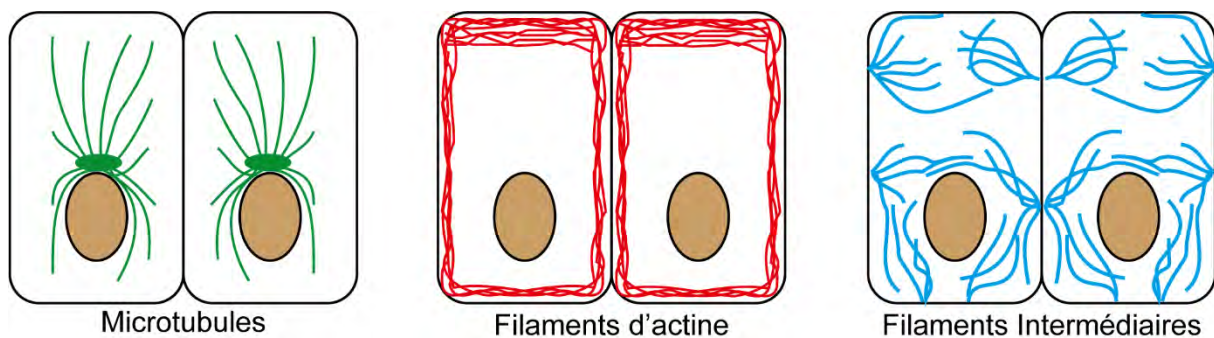


Les jonctions adhérentes assurent donc une fonction de cohésion mais également de couplage mécanique. En effet, les jonctions adhérentes sont constituées de protéines mécanosensibles qui réagissent aux forces mécaniques et permettent de transmettre des signaux mécaniques aux cellules voisines. L'application de forces sur les jonctions adhérentes induit un changement de conformation de la protéine  $\alpha$ -caténine. Normalement dans une conformation fermée, les forces induisent un dépliement de la protéine et permettent de révéler des sites de liaison et le recrutement de la Vinculine. L'interaction entre  $\alpha$ -caténine et Vinculine permet de stabiliser le complexe des jonctions adhérentes (Figure 9B) (Yao et al., 2014; Yap et al., 2018).

## 2.2 La dynamique épithéliale

### 2.2.1 Le cytosquelette

Au sein d'une cellule, il existe plusieurs cytosquelettes, chacun ayant des caractéristiques, une fonction et une régulation propre. On distingue les microtubules, plutôt impliqués dans le transport de molécules dans la cellule, les filaments intermédiaires, impliqués dans la migration, l'adhésion et faisant le lien avec les autres cytosquelettes et le réseau d'actine, que je vais détailler par la suite (Figure 10) (Hohmann and Dehghani, 2019). Ces réseaux sont très bien conservés au cours de l'évolution bien qu'il n'existe pas de filaments intermédiaires dans le cytoplasme chez la drosophile. Si les cytosquelettes ont longtemps été vus comme des structures très stables pour protéger la cellule des différents stress mécaniques qu'elle peut subir, ce sont en réalité des composants particulièrement dynamiques.



**Figure 10 : Les différents cytosquelettes présents dans la cellule**

### 2.2.1.1 L'actine

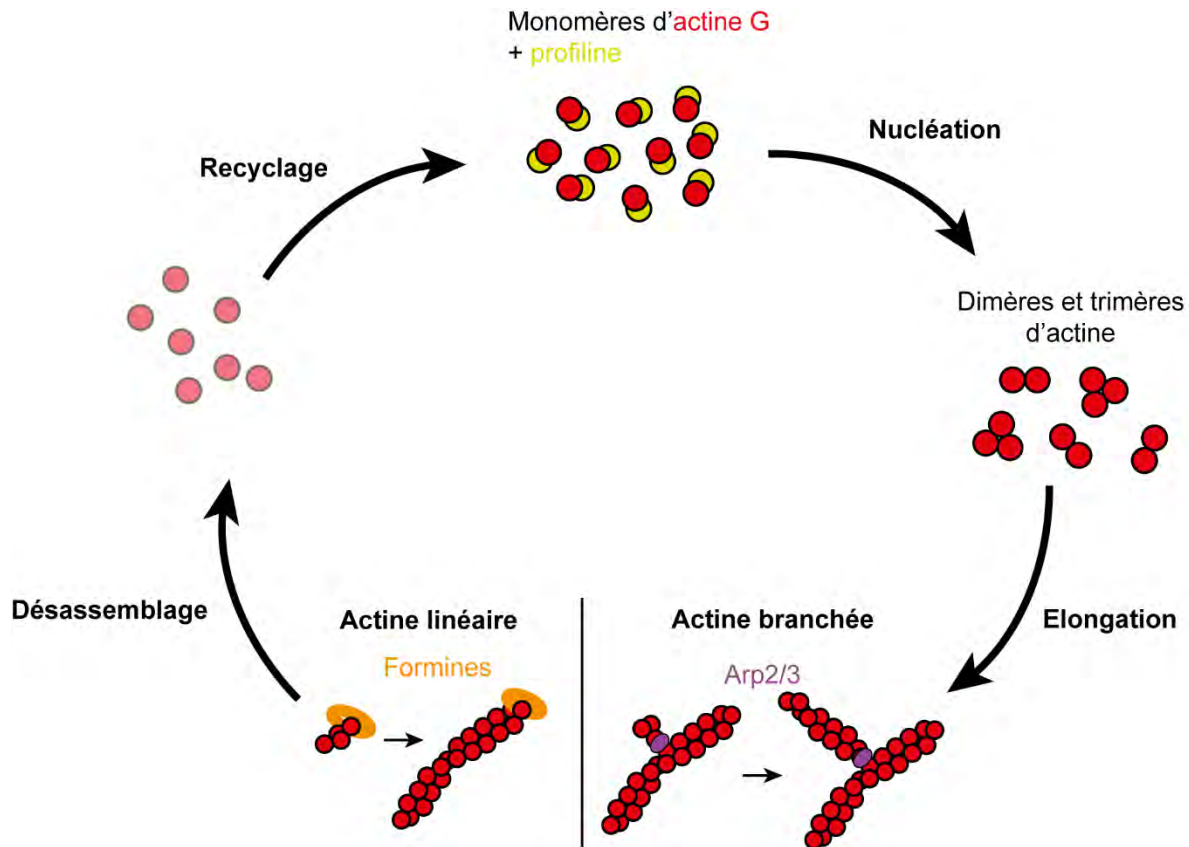
Dans la cellule, l'actine est présente sous deux formes : l'actine G (globulaire) et l'actine F (filamenteuse). L'actine G est un monomère qui, en s'assemblant permet la formation de filaments d'actine en double hélice de façon ATPase dépendante. La formation de filaments d'actine suit quatre étapes : la nucléation, l'élongation et le coiffage, le désassemblage et le recyclage (Plastino and Blanchoin, 2018).

La nucléation est la formation de dimères et de trimères par les monomères d'actine. Cette étape est directement proportionnelle à la concentration d'actine monomérique (Pollard et al., 2000). En effet, *in vitro*, au-delà d'une certaine concentration, l'actine monomérique forme spontanément des dimères et des trimères. En revanche, *in vivo*, cette étape est très contrôlée, notamment par la profiline qui séquestre l'actine monomérique et empêche la formation spontanée de dimères et de trimères (Figure 11) (Plastino and Blanchoin, 2018).

L'élongation est l'étape qui permet d'assembler plusieurs dimères ou trimères d'actine et de former des filaments d'actine. Elle se fait *via* des facteurs nucléateurs qui vont permettre de former différents types de réseaux d'actine. On distingue trois types de facteurs nucléateurs : les facteurs Arp2/3, la famille des formines et une troisième famille comprenant les protéines Spire et Cobl (Campellone and Welch, 2010). Les facteurs nucléateurs appartenant à la famille des formines ainsi que les protéines Spire et Cobl permettent la polymérisation de l'actine en formant des réseaux de filaments d'actine linéaires. A l'inverse, les facteurs Arp2/3 induisent la formation de réseaux d'actine branchée en démarrant la polymérisation d'un nouveau filament d'actine sur un filament déjà existant (Figure 11). Les réseaux parallèles et branchés ayant une organisation différente, ils vont également être localisés à différents endroits de la cellule et avoir différentes fonctions. Ainsi, le réseau linéaire d'actine sera plutôt localisé au niveau des filopodes et des fibres de stress tandis que le réseau branché sera plutôt localisé au niveau des lamellipodes (Letort et al., 2015). L'élongation est ensuite bloquée par les protéines de coiffage qui vont se fixer à l'extrémité des filaments d'actine et empêcher la polymérisation. Ces protéines contrôlent donc la longueur des filaments d'actine.

Les filaments d'actine sont ensuite désassemblés. Le désassemblage se fait en deux étapes : il y a d'abord une fragmentation en petits filaments puis une dépolymérisation en monomères d'actine par les protéines ADF/Cofiline (Figure 11) (Blanchoin, 2014).

Enfin, les monomères d'actine issus du désassemblage sont ensuite recyclés une fois qu'ils sont de nouveau associés à une molécule d'ATP (Figure 11) (Matsumura, 2005). Assemblée en filaments, l'actine peut s'associer à d'autres facteurs comme la Myosine-II, essentielle pour conférer une activité contractile et induire des forces.



**Figure 11 : La polymérisation des filaments d'actine**

La polymérisation d'actine se fait en quatre étapes. Les monomères d'actine G, séquestrés par la profiline forment des dimères et des trimères d'actine grâce à plusieurs facteurs nucléateurs. Vient ensuite l'étape d'élongation où les facteurs nucléateurs assemblent les dimères et trimères d'actine pour former des filaments. Les filaments sont ensuite désassemblés puis les monomères d'actine G sont recyclés une fois de nouveau associés à de l'ATP.

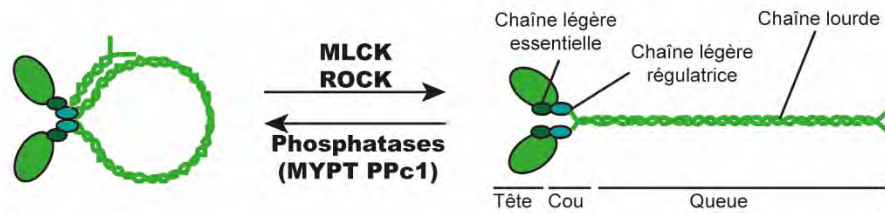
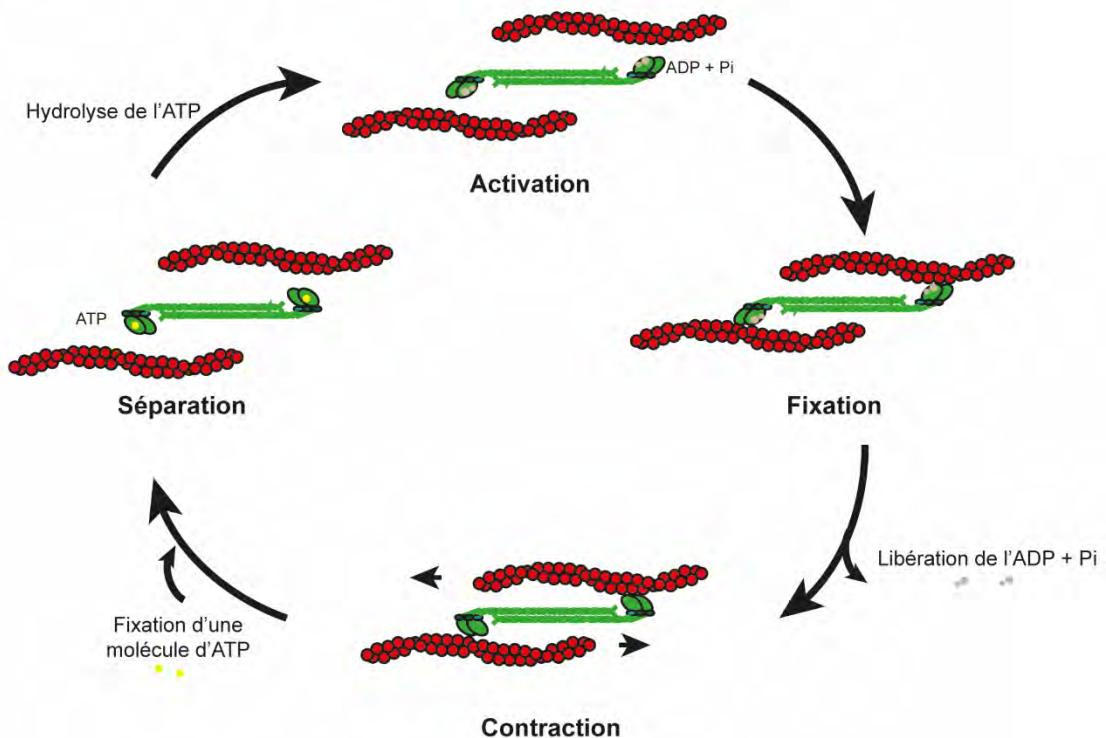
### 2.2.1.2 La Myosine-II non musculaire

Dans la cellule, il existe plusieurs types de myosine, qui sont des moteurs moléculaires. Ici, je me concentrerai sur la Myosine-II non musculaire que j'appellerai par la suite Myosine-II. La Myosine-II est une protéine essentielle à la cellule qui régule un certain nombre de fonctions comme la division cellulaire en permettant notamment la cytokinèse ou en permettant les changements de forme des cellules au cours du développement.

Une molécule de Myosine-II est constituée d'un hexamère contenant deux chaînes lourdes, deux chaînes légères essentielle et deux chaînes légères régulatrices (Figure 12A). La chaîne lourde contient un domaine N-terminal qui forme une tête globulaire et qui contient un site d'hydrolyse de l'ATP. C'est ce domaine qui confère l'activité motrice de la Myosine-II (Lecuit et al., 2011; Munjal and Lecuit, 2014). Une molécule seule de Myosine-II est incapable d'induire des forces, elle doit d'abord s'associer de façon antiparallèle à une autre molécule de Myosine-II pour former un mini-filament de Myosine-II.

L'activation de la Myosine-II est permise grâce la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice (MLC) qui permet à la Myosine-II de changer de conformation et de former un mini-filament qui pourra ensuite s'associer à un filament d'actine (Figure 12A). Cette phosphorylation est réalisée par MLCK (Myosine Light Chain Kinase) ou ROCK (Rho-associated Kinase) tandis qu'à l'inverse, la Myosine-II peut être inhibée par des phosphatases parmi lesquelles on trouve notamment MYPT (Matsumura, 2005).

Le mécanisme de contraction de la Myosine-II est cyclique et est possible grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. En effet, en s'associant à la tête globulaire de la Myosine-II, une molécule d'ATP est hydrolysée en ADP et en Phosphate inorganique, ce qui permet la fixation à un filament d'actine. La libération de l'ADP et du Pi permet un mouvement de la tête de la Myosine-II, ce qui induit une contraction. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP détache la tête de Myosine-II et le cycle peut de nouveau recommencer (Figure 12B) (Houdusse and Sweeney, 2016).

**A****B**

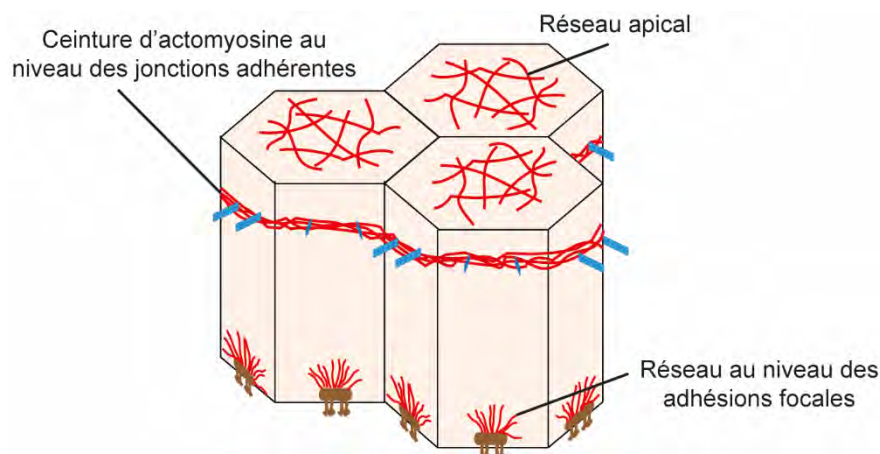
### Figure 12 : Dynamique de la Myosine-II

(A) Représentation schématique de la Myosine-II inactive (à gauche) et active (à droite). Les kinases ROCK et MLCK permettent d'activer la Myosine-II tandis que les phosphatases inactivent la Myosine-II. (B) Cycle d'activation de la Myosine-II. La fixation d'une molécule d'ATP sur la tête globulaire et son hydrolyse permet l'activation de la Myosine-II qui change de conformation et se fixe sur un filament d'actine. Lorsque l'ADP et le Pi sont relargués, cela permet un mouvement de la tête de Myosine-II qui induit une contraction. La Myosine-II se sépare des filaments d'actine lorsqu'une nouvelle molécule d'ATP se fixe au niveau de la tête globulaire et le cycle peut recommencer.

#### 2.2.2 Dynamique du cytosquelette dans la cellule

Le cytosquelette d'actomyosine forme différents réseaux au sein de la cellule. Localisé au niveau du cortex de la cellule pour maintenir la forme des cellules (Figure 10), il joue un rôle important au niveau des jonctions adhérentes et des adhésions focales.

Ainsi, au niveau des jonctions adhérentes, le cytosquelette d'actomyosine forme une ceinture tout autour de la cellule qui permet d'induire des forces qui seront transmises aux cellules voisines (Figure 13). Le cytosquelette d'actomyosine est également lié à la MEC *via* les adhésions focales (Figure 13), permettant des interactions entre la cellule et la MEC. En effet, suite à des modifications de propriétés mécaniques de la MEC, la cellule réagit mécaniquement en remodelant son cytosquelette mais elle peut également en retour induire des modifications de propriétés mécaniques de l'environnement et un remodelage de la MEC. Enfin, le cytosquelette d'actomyosine forme également un réseau complexe au niveau apical et qui joue un rôle essentiel dans le maintien de la forme des cellules. Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée au pôle apical des cellules, c'est pourquoi je me concentrerai ici sur les réseaux apicaux et au niveau des jonctions adhérentes. Les jonctions de la cellule et le cytosquelette d'actomyosine forment un ensemble particulièrement dynamique dans le temps. Parfaitement coordonnés, le cytosquelette d'actomyosine permet d'induire des forces et les jonctions intercellulaires de transmettre ces forces aux cellules voisines, pouvant conduire à un comportement coordonné des cellules d'un tissu. Cette communication est essentielle, et elle a été particulièrement étudiée lors de la morphogenèse où le changement de forme des cellules conduit *in fine* à un remodelage épithélial (Heisenberg and Bellaïche, 2013).



### Figure 13 : Les différents réseaux d'actomyosine au sein de la cellule

Au sein de la cellule, il existe plusieurs réseaux d'actomyosine. On trouve le réseau au niveau apical et au niveau des jonctions adhérentes, un réseau d'actomyosine forme une ceinture autour de la cellule. Enfin, au niveau des adhésions focales, le réseau d'actomyosine fait le lien avec la MEC.

Ici, je vais détailler deux processus dynamiques au niveau de la cellule conduisant à des changements de forme des tissus lors du développement : la constriction apicale

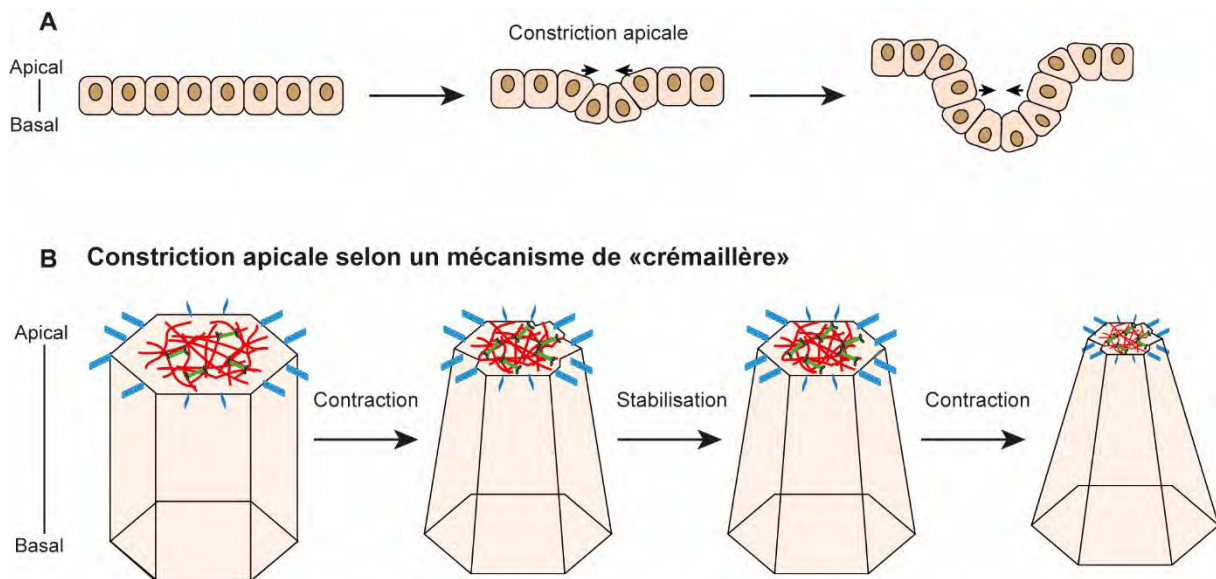


et l'intercalation cellulaire ayant permis de mettre en évidence qu'il existe une régulation fine du cytosquelette d'actomyosine sur les jonctions adhérentes.

#### 2.2.2.1 *La constriction apicale*

La constriction apicale est un processus par lequel une cellule réduit sa surface apicale. Au cours du développement, ce mécanisme permet notamment à partir d'un épithélium plat d'induire la courbure des tissus pour former un tube comme c'est le cas lors des étapes précoces de l'invagination du mésoderme ou lors de la neurulation chez les vertébrés (Figure 14A) (Lecuit and Lenne, 2007; Lecuit et al., 2011; Martin and Goldstein, 2014; Sawyer et al., 2010). C'est également un processus qui permet l'extrusion d'une cellule d'un épithélium, comme nous le verrons dans la partie 3.

La constriction apicale est principalement médiée par le réseau apical d'actomyosine qui va progressivement se contracter, vers le centre de la cellule et conduire au rétrécissement de la surface apicale. La constriction apicale se fait *via* un mécanisme dit de « crémaillère » (« ratchet-mechanism » en anglais), c'est-à-dire que la constriction ne se fait pas de manière continue mais *via* des phases de contraction et de stabilisation successives (Figure 14B) (Martin et al., 2009). Toutefois, pour induire la constriction apicale, il est essentiel que le cytosquelette d'actomyosine soit couplé aux jonctions adhérentes. En effet, une étude a montré que des contractions du réseau apical d'actomyosine apparaissent dans les cellules avant l'initiation du processus de constriction sans pour autant que cela conduise à la réduction de la surface apicale. Ce n'est qu'après le couplage aux jonctions adhérentes que ces contractions permettent d'induire une réduction efficace de la surface apicale (Roh-Johnson et al., 2012). Une fois le couplage effectué, une régulation très fine des jonctions adhérentes par le cytosquelette se met en place, permettant de maintenir les jonctions adhérentes et d'induire la courbure d'un tissu (Figure 14A). En effet, les jonctions adhérentes doivent pouvoir résister aux forces appliquées par les contractions du réseau apical. Une étude a montré que la présence de Myosine-II, responsable de la constriction apicale stabilise les jonctions adhérentes et que celles-ci ne sont démantelées qu'une fois la constriction apicale terminée (Weng and Wieschaus, 2016).



### Figure 14 : Mécanisme de constriction apicale

(A) La constriction apicale coordonnée conduit à la courbure d'un tissu, comme dans le cas de l'invagination du mésoderme chez la drosophile ou de la neurulation chez les vertébrés par exemple. (B) La constriction apicale se fait selon un mécanisme de « crémaillère » : la surface apicale est réduite, puis stabilisée, puis réduite etc.

Cet exemple illustre bien la coordination des propriétés mécaniques des cellules jointives et la coordination des forces au sein d'un tissu.

#### 2.2.2.2 L'intercalation cellulaire

Un autre remodelage tissulaire particulièrement important au cours du développement est l'intercalation cellulaire qui permet notamment l'élongation d'un tissu. Il est par exemple essentiel au processus d'extension de la bande germinale lors de la gastrulation chez la drosophile (Figure 15A). Ce processus a longtemps été étudié pour comprendre comment les cellules pouvaient, de façon dynamique, modifier leurs jonctions avec les cellules voisines sans que cela n'affecte l'intégrité du tissu.

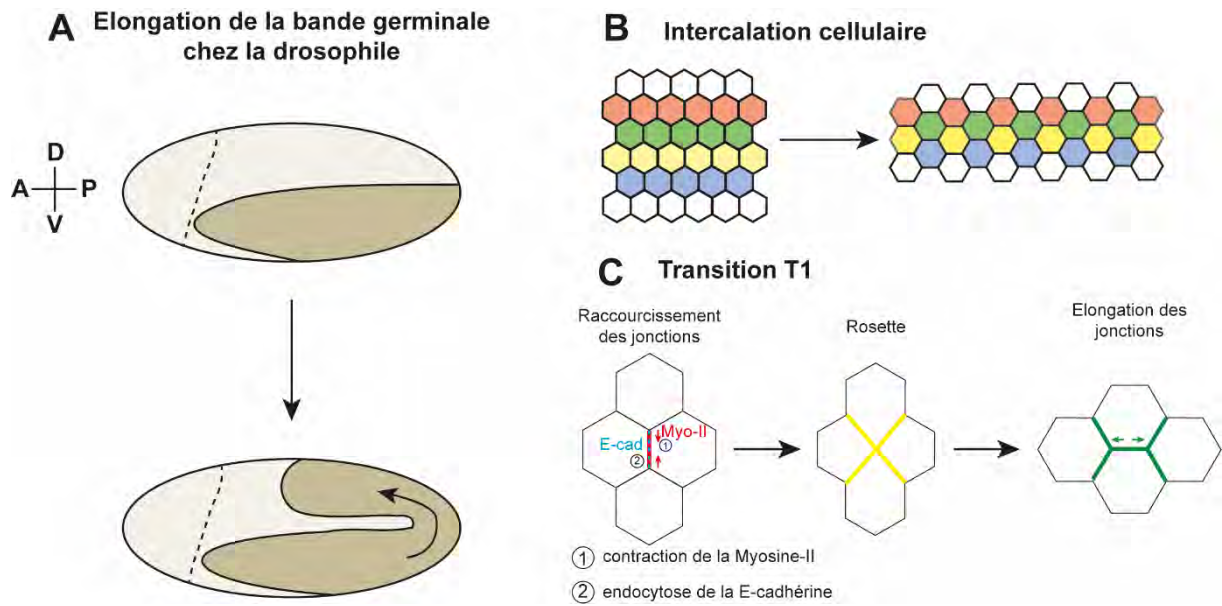
Au cours de l'extension de la bande germinale, les cellules modifient les interactions qu'elles ont avec leurs voisines, conduisant à une élongation du tissu dans le sens de l'axe antéro-postérieur (A-P). Pendant ce processus, les jonctions dans le sens dorso-ventral (D-V), perpendiculaires au sens de l'élongation, sont progressivement raccourcies jusqu'à disparaître complètement et former une organisation cellulaire particulière que l'on appelle « rosette ». Par la suite une nouvelle jonction se forme et s'allonge perpendiculairement à la jonction démantelée. L'intercalation cellulaire coordonnée conduit *in fine* à une élongation du tissu (Figure 15B).



Plusieurs études ont mis en évidence les mécanismes impliqués et comment les jonctions étaient démantelées puis reformées suite aux changements de forme du tissu. Tout d'abord, des observations ont permis de montrer que la Myosine-II et la E-cadhérine sont réparties de façon asymétrique autour des cellules. En effet, la Myosine-II s'accumule sur les jonctions orientées dans le sens D-V et, en induisant des forces, conduit à la diminution de la taille des jonctions (Bertet et al., 2004; Kale et al., 2018; Rauzi et al., 2010). La E-cadhérine, quant à elle est localisée au niveau des jonctions orientées dans le sens A-P et est présente à des niveaux nettement plus faibles sur les jonctions D-V. Ici, il y a donc une corrélation spatiale entre la présence de Myosine-II et une nette diminution de la E-cadhérine. De manière intéressante, la Myosine-II est localisée sur les jonctions D-V et induit le recrutement de Clathrine (une molécule impliquée dans la formation de vésicule d'endocytose) qui va ensuite induire l'endocytose des molécules de E-cadhérine (Levayer et al., 2011). Ainsi, la tension jonctionnelle due à l'accumulation de Myosine-II conduit à un démantèlement des jonctions adhérentes en induisant notamment l'endocytose des molécules de E-cadhérine.

Le cytosquelette d'actomyosine peut donc fortement affecter les jonctions adhérentes et ce, de différentes manières. Si au cours de la constriction apicale, la contractilité de l'actomyosine conduit à une stabilisation des jonctions adhérentes, au cours de l'intercalation cellulaire, l'induction de forces conduit au contraire au démantèlement des jonctions adhérentes. Si à première vue, ces résultats peuvent sembler contradictoires, il est toutefois important de garder en tête que dans ces deux processus, les réseaux d'actomyosine engagés ne sont pas les mêmes. En effet, c'est le réseau apical d'actomyosine qui est impliqué lors de la constriction apicale et qui va donc exercer une force centripète, c'est-à-dire vers le centre de la surface apicale et donc tirer sur les jonctions adhérentes. A l'inverse, au cours de l'intercalation cellulaire, c'est la ceinture d'actomyosine localisée au cortex de la cellule qui *via* des forces, induit un repliement de la membrane cellulaire et la formation de vésicules d'endocytose pour démanteler les jonctions adhérentes (Figure 15C).

De façon générale, ces mécanismes montrent que les forces peuvent avoir différents impacts sur les propriétés adhésives des cellules.



### Figure 15 : Mécanisme d'intercalation cellulaire

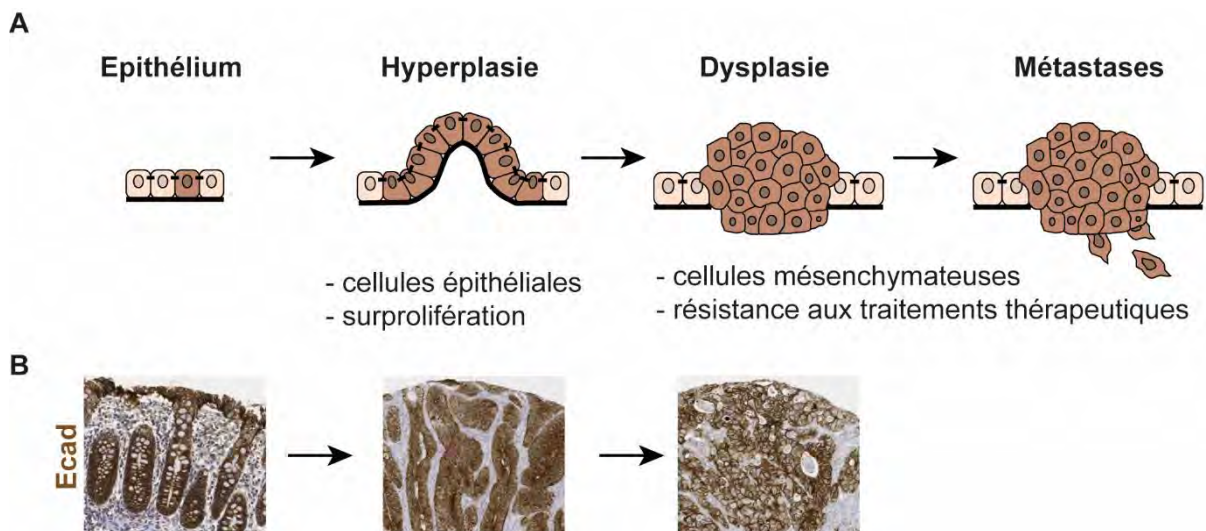
(A) Schématisation de l'élongation de la bande germinale au cours de la gastrulation chez la drosophile. (B) Schématisation du mécanisme d'intercalation cellulaire à l'échelle du tissu et à l'échelle de la cellule (C) Les jonctions verticales se raccourcissent progressivement jusqu'à être complètement démantelées avant qu'une nouvelle jonction se forme dans le sens perpendiculaire à la première, conduisant à une élongation du tissu. A, antérieur, P, postérieur, D, dorsal, V, ventral. Adapté de (Bertet et al., 2004)

L'ensemble de cette partie a permis de voir les différents acteurs impliqués dans le maintien d'un épithélium et de comprendre comment ces différents acteurs interagissent et communiquent pour former une structure dynamique, pouvant être remodelée, au cours du développement par exemple. Toutefois, le développement de certaines pathologies, comme l'apparition d'un carcinome, peut fortement affecter ces différents acteurs et induire des changements drastiques de l'organisation épithéliale, comme nous allons le voir dans la prochaine partie.

### 3 La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus clé de l'évolution tumorale

Si en introduction, j'ai défini de façon générale les différentes étapes d'évolution tumorale en mentionnant notamment les termes de tumeurs bénignes et de tumeurs malignes, ici je vais détailler spécifiquement les étapes de la progression des carcinomes, c'est-à-dire les cancers issus de cellules épithéliales, auxquels je me suis intéressée au cours de ma thèse.

A la suite d'une prolifération incontrôlée, les cellules d'un épithélium forment ce que l'on appelle une tumeur hyperplasique. Il s'agit d'une tumeur, que l'on peut qualifier de bénigne, au sein de laquelle les cellules conservent leurs propriétés épithéliales, le tissu reste donc organisé malgré une surprolifération importante des cellules. Par la suite, l'évolution en tumeur maligne est associée à la transformation d'une tumeur hyperplasique en tumeur dysplasique. A ce stade, les cellules perdent leur morphologie normale, se différencient, deviennent désorganisées, conduisant à un tissu anormal ayant un aspect complètement désorganisé. Enfin les cellules peuvent ensuite quitter la tumeur primaire, migrer et envahir d'autres tissus où elles formeront des tumeurs secondaires. L'ensemble de ces étapes est schématisé et illustré en Figure 16.

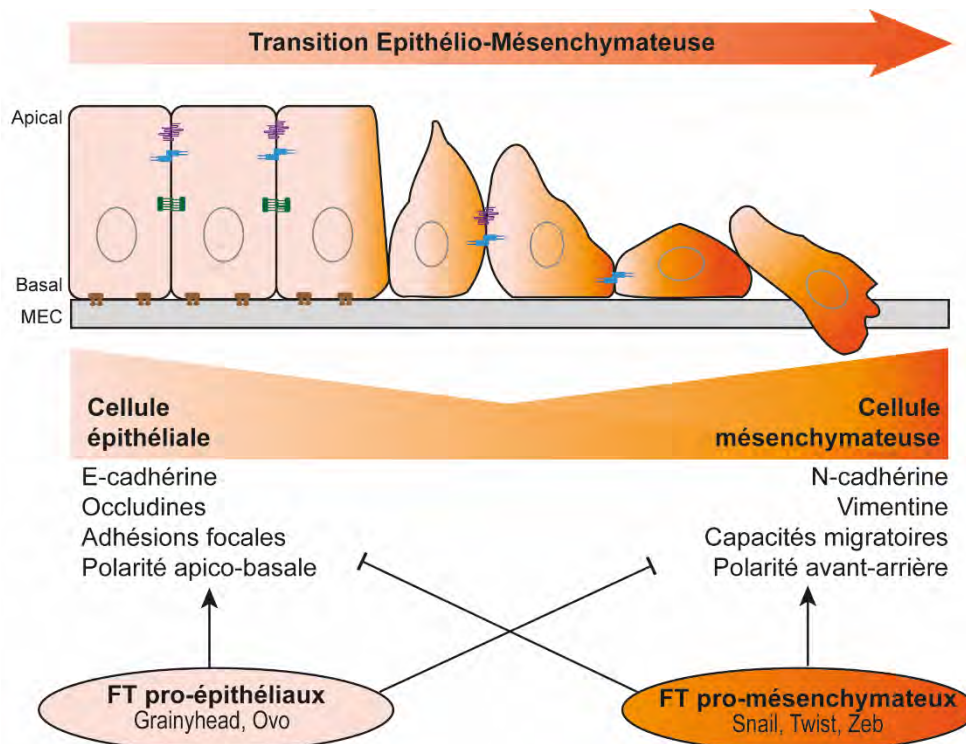


**Figure 16 : La progression des carcinomes**

(A) Schématisation de la progression des carcinomes. A la suite d'une surprolifération incontrôlée, les cellules, toujours épithéliales forment une tumeur dite hyperplasique. L'hyperplasie peut ensuite se transformer en dysplasie lorsque les cellules perdent au moins une partie de leurs caractéristiques épithéliales et deviennent mésoenchymateuses. Les tumeurs dysplasiques sont également connues pour être plus résistantes aux traitements thérapeutiques et permettre la formation de métastases, l'étape la plus agressive. (B) Biopsies de cancer du côlon avec un marquage Ecad permettant d'illustrer les différentes étapes représentées en (A). Adapté de (Bell and Thompson, 2014)

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à la transition hyperplasie-dysplasie. Cette transition, qui est une étape clé de la progression tumorale fait principalement appel à un processus cellulaire particulièrement important et conservé au cours de l'évolution : la transition épithélio-mésenchymateuse.

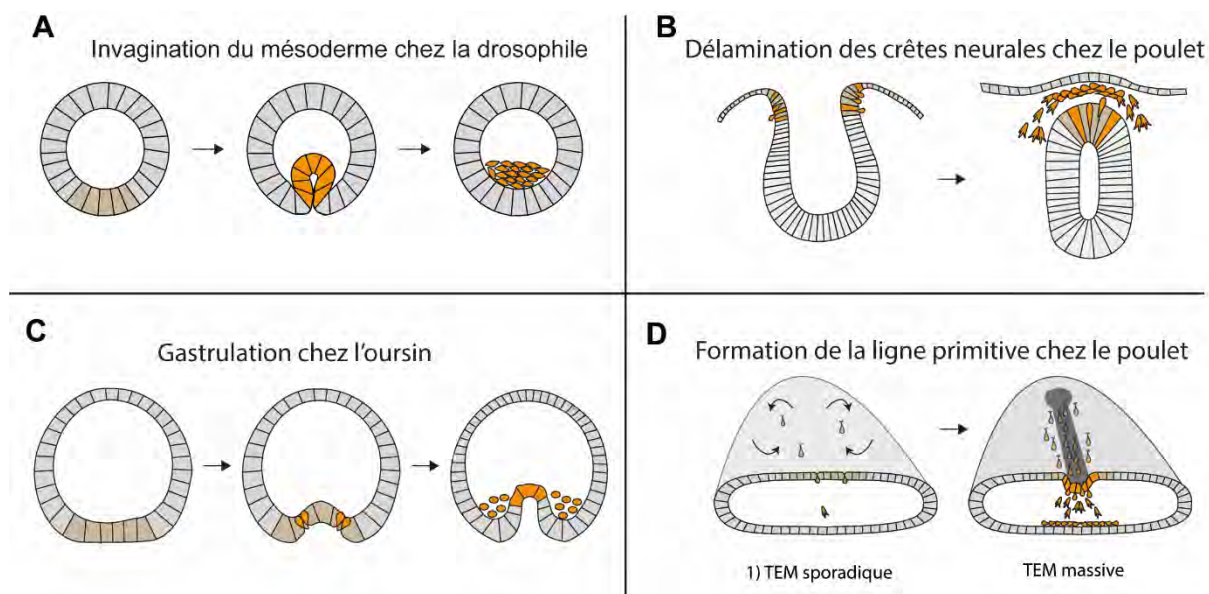
La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus réversible par lequel une cellule épithéliale perd ses caractéristiques au profit d'un caractère mésenchymateux. Si les cellules épithéliales sont caractérisées par une forme colonnaire, cuboïdale ou squameuse, une forte cohésion entre elles et une polarité apico-basale, les cellules mésenchymateuses sont au contraire caractérisées par une forme plus allongée, une polarité avant/arrière et parfois des propriétés migratoires (Figure 17) (Nieto et al., 2016). Ce changement morphologique s'accompagne également d'importantes modifications au niveau du programme transcriptionnel qui vont promouvoir la survie de la cellule par exemple.



**Figure 17 : La transition épithélio-mésenchymateuse**

Les cellules épithéliales perdent progressivement leurs caractéristiques épithéliales au profit de caractéristiques mésenchymateuses. La transition entre les deux états est régulée par des facteurs de transcription (FT) pro-épithéliaux ou pro-mésenchymateux.

Conservé au cours de l'évolution, c'est un processus particulièrement important dans le développement de nombreux organismes. Chez la drosophile par exemple, l'invagination du mésoderme, première étape de la gastrulation, est possible grâce à la TEM qui va permettre d'internaliser une population de cellules qui formeront le mésoderme (Figure 18A) (Winklbauer and Müller, 2011). Également importante lors de l'organogénèse, la TEM permet par exemple la formation des crêtes neurales chez le poulet en induisant la délamination de cellules du tube neural (Figure 18B) (Piacentino et al., 2020). D'autres exemples de l'implication de la TEM au cours du développement sont représentés en Figure 18.



**Figure 18 : Rôle de la TEM dans le développement**

(A) Invagination du mésoderme chez la drosophile : les cellules du mésoderme (marron) constrictent leur surface apicale pour initier le processus d'invagination, ce qui permettra de former un tube à l'intérieur de l'embryon avant que les cellules ne se détachent les unes des autres pour former le mésoderme. (B) Délamination des crêtes neurales chez le poulet : les crêtes neurales délaminent depuis les bords du tube neural au cours de la phase de la fermeture du tube neural. (C) Gastrulation chez l'oursin : les cellules mésenchymateuses primaires (d'abord en marron puis en jaune) délaminent vers l'intérieur de l'embryon. (D) Formation de la ligne primitive chez le poulet : la ligne primitive se forme suite à deux phases de TEM : des cellules de l'épiblastes délaminent d'abord de manière sporadique (en jaune) puis de manière massive pour former le feuillet mésodermique. Adapté de (Font-Noguera et al., 2021)

Essentiel pendant le développement comme nous venons de le voir, la TEM peut être à l'origine d'un certain nombre de troubles pathologiques, lorsqu'elle est mal régulée.

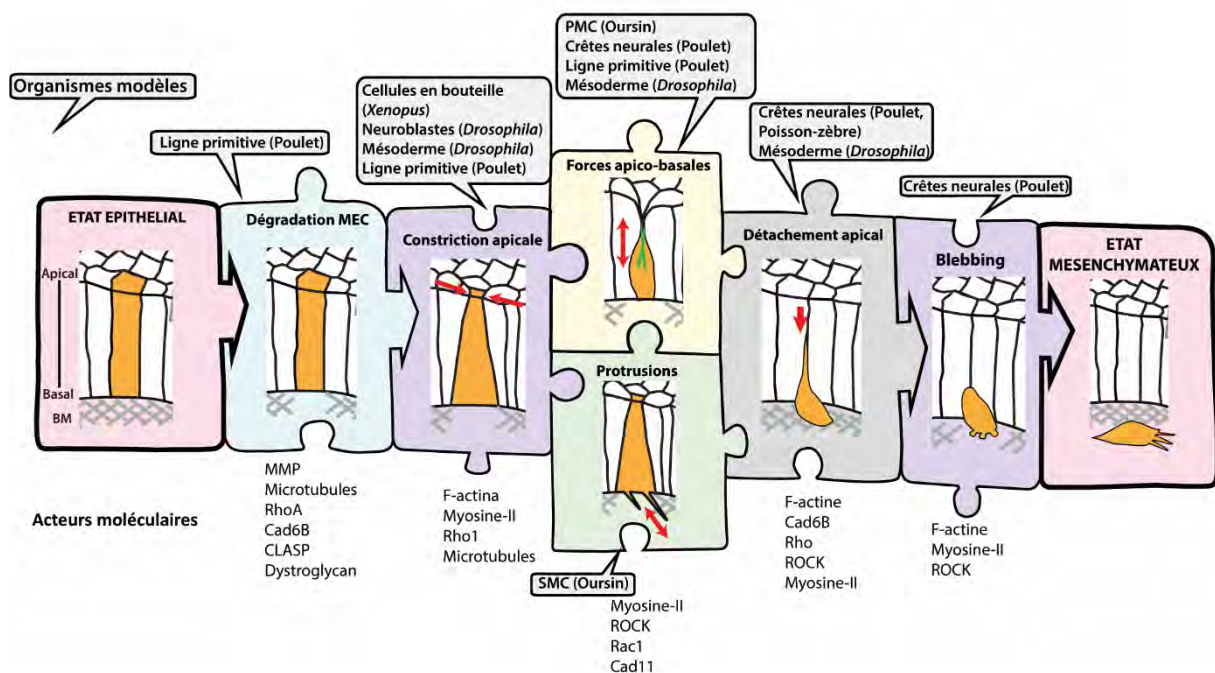


### 3.1 La TEM : régulation et dynamique

La TEM est un processus finement régulé, et contrôlé par différents facteurs de transcription (FT) qui vont induire des changements transcriptionnels. Dans le développement, de nombreuses voies de signalisation, comme les voies TGF $\beta$ , Wnt ou Notch induisent la TEM en régulant l'expression de FT (Dongre and Weinberg, 2019). Parmi ces FT, on distingue deux catégories : les FT dits pro-épithéliaux et les FT pro-mésenchymateux (Nieto et al., 2016). C'est la balance entre ces deux types de FT qui va permettre d'induire ou non la TEM. Les FT pro-épithéliaux comme Grainyhead (Grh) et Ovo vont, comme leur nom l'indique, protéger l'état épithélial de la cellule en induisant l'expression de gènes impliqués dans le maintien de l'état épithélial comme la E-cadhérine ou les protéines de la polarité apico-basale. A l'inverse, les FT pro-mésenchymateux, parmi lesquels on retrouve notamment les facteurs SNAIL, TWIST, ZEB et SLUG, induisent l'expression de gènes impliqués dans l'état mésenchymateux et en même temps répriment les gènes impliqués dans le maintien de l'état épithélial (Figure 17). Par exemple, ZEB induit l'expression des gènes de la Vimentine, un filament intermédiaire et de la N-cadhérine tandis que SNAIL réprime le gène de la E-cadhérine en recrutant des complexes de modifications de la chromatine (Cano et al., 2000; Herranz et al., 2008; Sánchez-Tilló et al., 2010).

Les différentes étapes de la TEM ont souvent été discutées et sont, encore aujourd'hui sujettes à débat pour de nombreuses équipes travaillant sur ce processus. De nombreuses études de la TEM se concentrent sur la caractérisation des propriétés migratoires des cellules. Toutefois, c'est en réalité un processus beaucoup plus complexe, comprenant bien d'autres étapes, plus précoces. En effet, si l'acquisition de propriétés migratoires et la migration des cellules fait effectivement partie des étapes de la TEM, il s'agit au fond d'une étape très tardive. La TEM, qui, strictement, désigne le passage d'une cellule épithéliale vers une cellule mésenchymateuse démarre en réalité lorsque la cellule est toujours intégrée au sein de l'épithélium et prend la décision de faire cette transition. La TEM comprend donc toutes les étapes qui vont permettre de préparer la cellule à sa sortie de l'épithélium pour ensuite éventuellement migrer. C'est principalement sur les premières étapes, que je qualifie de précoces, que je me suis concentrée au cours de ma thèse et sur lesquelles je me concentrerai ici.

Ainsi, au cours de la TEM, la cellule passe par une succession d'évènements spécifiques conduisant à sa sortie de l'épithélium, étapes pouvant varier d'une espèce à l'autre. Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'écriture d'une revue, dont le manuscrit est en annexe, et dont l'objectif était de faire un bilan des différentes étapes montrées chez divers organismes. Dans cette revue, notre objectif était de proposer une vision intégrée de la mécanistique cellulaire de la TEM en se basant sur les connaissances de différentes étapes caractérisées dans divers organismes modèles au cours du développement (Figure 19) (Font-Noguera et al., 2021).



**Figure 19 : Un modèle intégré de la dynamique cellulaire de la TEM**

Cette figure montre les différentes étapes de la TEM. Pour chaque étape, les organismes dans lesquels elle a été observée sont écrits dans les bulles et les acteurs moléculaires impliqués dans chaque étape sont mentionnés sous chaque pièce de puzzle. Tiré de (Font-Noguera et al., 2021).

Parmi ces étapes, une des premières étapes observées est la dégradation de MEC. Si aujourd'hui il est admis que les cellules remodelent la MEC pour pouvoir migrer, ici il s'agit d'une étape particulièrement précoce, où la cellule est toujours parfaitement intégrée dans l'épithélium et présente encore toutes les caractéristiques de cellules épithéliales. Néanmoins, si cette étape a été observée et caractérisée lors de la formation de la ligne primitive chez le poulet, elle n'est cependant pas présente chez tous les organismes. Par exemple, au cours de l'invagination du mésoderme chez la drosophile, la MEC n'ayant pas encore été déposée lorsque les cellules délaminent, la première étape observée est la constriction apicale. Décrite précédemment dans la

partie 2.2.2.1, la constriction apicale est une étape qui semble particulièrement bien conservée puisqu'elle a été observée chez de nombreuses espèces. Il s'agit de l'une des étapes les mieux caractérisées (voir partie 2.2.2.1).

Par la suite, des travaux ont montré récemment que si le cytosquelette d'actomyosine est particulièrement dynamique au niveau apical, comme nous l'avons vu au moment de la constriction apicale par exemple, il l'est également le long de l'axe apico-basal. En effet, ces études montrent que, juste après la constriction apico-basale dans l'invagination du mésoderme chez la drosophile, le cytosquelette se réorganise et forme une structure apico-basale appelée câble de Myosine-II qui induit des forces le long de l'axe apico-basal (Gracia et al., 2019). Si l'existence de forces apico-basales n'a été montrée que dans ce modèle, d'autres observations suggèrent fortement qu'il pourrait s'agir d'un processus conservé. Par exemple, des observations faites sur des embryons d'oursins montrent qu'au cours de la gastrulation, les PMCs (pour Primary Mesenchyme Cells) présentent une accumulation d'actine le long de l'axe apico-basal, associée à une déformation de la surface apicale, suggérant la présence de forces apico-basales (Kinnander and Gustafson, 1960; Nakajima and Burke, 1996). Également, au cours de la formation de la ligne primitive chez le poulet, des déformations apicales ont été observées juste après la constriction apicale des cellules de l'épiblaste qui délaminent, suggérant une nouvelle fois l'induction de forces apico-basales (Bancroft and Bellairs, 1974; Voiculescu et al., 2014).

Parmi les autres étapes, on retrouve également le détachement apical ou encore la formation de protrusions, que je ne développerai pas.

Néanmoins, si la TEM est un processus clé du développement, c'est également un processus majeur impliqué dans plusieurs contextes pathologiques comme la fibrose ou la progression tumorale lorsqu'il est dérégulé.

### 3.2 La TEM dans la progression tumorale

Au cours de la progression tumorale, la TEM a principalement été associée à la formation de métastases. C'est en effet, lorsque les cellules ont terminé la TEM et quitté l'épithélium qu'elles acquièrent des propriétés migratoires et sont capables de migrer vers d'autres tissus et par un processus inverse appelé transition mésenchyme-épithélium, sont capables de former des tumeurs secondaires. Plusieurs études ont



d'ailleurs montré que l'expression des FT tel que TWIST, SNAIL et ZEB induit la formation de métastase et ce, dans différents types de cancers (Kahlert et al., 2011; Krebs et al., 2017).

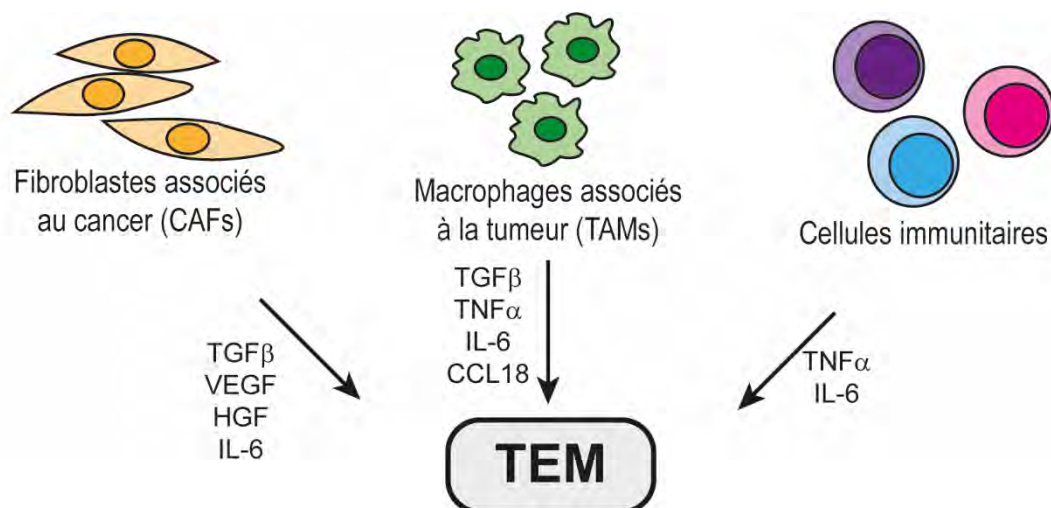
Néanmoins, la TEM est aujourd'hui considérée comme un processus beaucoup plus complexe qui influence la progression tumorale de bien d'autres manières que par la formation de métastases. En effet, la TEM n'est pas un processus noir-blanc, c'est-à-dire que les cellules ne sont pas uniquement épithéliales ou mésenchymateuses mais peuvent acquérir des états intermédiaires où elles possèdent à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses (Nieto et al., 2016). C'est par exemple ce que l'on retrouve au niveau de la transition hyperplasie-dysplasie, étape clé de la progression tumorale sur laquelle je me suis concentrée au cours de ma thèse. En effet, il s'agit d'une étape au cours de laquelle les cellules cancéreuses perdent leurs caractéristiques épithéliales pour arborer un phénotype plus désorganisé et devenir indifférenciées, sans pour autant devenir complètement mésenchymateuses. C'est une étape cruciale car c'est le passage vers une tumeur dysplasique qui peut induire la transformation d'une tumeur bénigne en tumeur maligne devenant alors particulièrement dangereuse (Hanahan and Weinberg, 2011). Au cours de cette transition, les cellules, qui ont à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses, acquièrent un certain nombre de propriétés posant de réels problèmes lors des thérapies.

En effet, plusieurs études réalisées sur des coupes de différentes tumeurs humaines, ont d'abord montré qu'il existait une corrélation entre la présence de marqueurs mésenchymateux (diminution de l'expression de E-cadhérine, expression anormale de E-cadhérine ou expression de N-cadhérine) et un mauvais pronostic et ce, dans différents types de cancers (Gravdal et al., 2007; Prudkin et al., 2009; Richmond et al., 1997; Shioiri et al., 2006; Umbas et al., 1994). Par la suite, d'autres études ont montré que les cellules qui subissaient une TEM partielle et se retrouvaient dans un état hybride acquéraient dans le même temps une forte résistance aux traitements thérapeutiques, qu'il s'agisse de drogues ou d'agents utilisés en chimiothérapie (Singh and Settleman, 2010) mais également dans le cas de l'immunothérapie. En effet, ces cellules hybrides développent des mécanismes de détournement du système immunitaire, rendant l'immunothérapie inefficace (Dongre et al., 2017; Kudo-Saito et al., 2009; Shibue and Weinberg, 2017).

Si la formation de métastases est l'étape de la progression tumorale responsable de la majorité des décès dans les cancers (Hanahan and Weinberg, 2000), la transition hyperplasie-dysplasie est également une étape cruciale dans le développement des cancers, nécessaire pour la formation de métastases. Comprendre comment cette transition est régulée représente donc un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer.

### 3.2.1 L'induction de la TEM par les cellules du microenvironnement

Alors que la TEM est un processus particulièrement bien contrôlé dans un contexte développemental, au cours de la progression tumorale, de nombreux mécanismes permettent aux cellules cancéreuses d'effectuer la TEM sans aucun contrôle. Mis en évidence par des expériences de co-culture entre des lignées de cellules cancéreuses et des cellules du microenvironnement, ces mécanismes reposent principalement sur la libération de cytokines par les cellules du microenvironnement parmi lesquelles on trouve les fibroblastes et les cellules du système immunitaire.



**Figure 20 : L'induction de la TEM des cellules tumorales par les cellules du microenvironnement**

Ainsi, les fibroblastes, normalement impliqués dans le renouvellement de la matrice-extracellulaire, sont détournés de leur fonction, deviennent des fibroblastes associés au cancer (CAF) et libèrent du TGFβ, de l'IL-6 et du EGF qui induit la TEM des cellules tumorales (Kalluri and Zeisberg, 2006; Shintani et al., 2016; Yu et al., 2014). De la même manière, les cellules du système immunitaire (macrophages associés à la tumeur, TAM, lymphocytes T) libèrent du TGFβ, du TNFα et de l'IL-6, responsables de

l'induction de la TEM (Figure 20) (Bates and Mercurio, 2003; Bonde et al., 2012; Che et al., 2017; Fan et al., 2014; Goebel et al., 2015).

### *3.2.2 L'induction de la TEM par les propriétés mécaniques*

Si les cellules du microenvironnement, notamment les cellules du système immunitaire ont été montrées comme induisant la TEM des cellules tumorales, de nombreuses études ont montré que les propriétés mécaniques de la tumeur et de son environnement jouent également un rôle capital dans la progression tumorale.

En effet, les tumeurs sont soumises à différents stress mécaniques que l'on peut diviser en stress « liquide », dû à la pression du liquide interstitiel et le stress « solide », sur lequel je vais me concentrer, qui peut être dû d'une part à la compression exercée par l'environnement autour de la tumeur et d'autre part à la surprolifération de la tumeur elle-même (Broders-Bondon et al., 2018; Jain et al., 2014).

#### *3.2.2.1 La compression exercée par l'environnement autour de la tumeur*

La compression exercée par l'environnement de la tumeur est principalement due à la matrice extracellulaire (MEC) (voir 2.1.2.1) qui entoure la tumeur. En effet, dans la plupart des cancers, la balance entre dépôt de MEC et dégradation est fortement modifiée par les cellules du microenvironnement, induisant à la fois un changement de composition et d'organisation de la MEC (Lu et al., 2012). Les fibroblastes augmentent le dépôt de collagène I induisant ainsi une MEC plus rigide (Kalluri and Zeisberg, 2006). C'est d'ailleurs à cause de cette augmentation de rigidité que certaines tumeurs peuvent être détectées lors d'un examen par des palpations, comme dans le cas du cancer du sein par exemple (Khaled et al., 2004). Si l'augmentation de rigidité de la MEC est associée à de réels problèmes d'accessibilité de la tumeur pour les différents agents de traitements (Dewhirst and Secomb, 2017), plusieurs études suggèrent que la rigidité de la MEC pourrait également fortement influencer la progression tumorale.

En effet, plusieurs études ont montré par technique AFM sur des biopsies humaines qu'il existait une corrélation entre l'agressivité et la rigidité de différentes tumeurs (Acerbi et al., 2015; Conklin et al., 2011; Laklai et al., 2016; Lopez et al., 2011; Miroshnikova et al., 2016). Par la suite, des études principalement faites sur des cultures 2D ou 3D de cellules montrent que la rigidité de la MEC pourrait induire la TEM des cellules tumorales. En effet, la culture de cellules sur substrat rigide induit (1)

une modification du programme transcriptionnel en favorisant la translocation nucléaire de FT impliqués dans la TEM tel que TWIST et SNAIL, (2) une augmentation de la motilité de ces cellules et (3) une augmentation de la résistance au traitement Laptinib qui inhibe normalement la prolifération cellulaire, trois caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux (Elosegui-Artola et al., 2017; Lin et al., 2015; Seo et al., 2015; Wei et al., 2015; Zhang et al., 2016). De plus, une étude réalisée chez la souris va également dans le sens d'un rôle important de la MEC dans la progression tumorale. Miller et al. ont en effet montré que l'inhibition pharmacologique de LOX, une enzyme impliquée dans l'organisation du collagène, réduit fortement la progression tumorale dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique en bloquant complètement la formation de métastases (Levental et al., 2009; Miller et al., 2015).

La MEC semble donc jouer un rôle important dans la progression tumorale. Néanmoins, la plupart de ces études sont principalement faites sur des cellules en culture qui reproduisent difficilement les véritables conditions dans lesquelles se développe une tumeur, soumise à de nombreux signaux *in vivo*. En effet, il existe de nombreux dialogues entre les différentes cellules du microenvironnement et les cellules tumorales qui vont s'influencer mutuellement pour faire progresser la tumeur. Par exemple, dans un cas de cancer du pancréas, une MEC rigide induit une forte tension au sein des cellules tumorales, qui vont à leur tour appliquer des forces sur la MEC, augmenter sa rigidité et favoriser la progression tumorale (Laklai et al., 2016).

Si les propriétés de la MEC sont particulièrement importantes dans la progression tumorale, de plus en plus d'études montrent que les propriétés intrinsèques des cellules tumorales semblent l'être également. Néanmoins, les résultats contradictoires de ces études soulignent clairement le besoin de clarifier le rôle des propriétés mécaniques des cellules tumorales.

#### 3.2.2.2 *Les propriétés intrinsèques des cellules tumorales*

L'étude des propriétés intrinsèques des cellules tumorales est un domaine en pleine expansion mais particulièrement difficile à adresser. En effet, l'examen de l'état des cellules repose principalement sur des techniques de mesure de la rigidité comme la technique d'AFM ou par les pinces optiques, souvent réalisées sur des cellules en culture. Néanmoins, nous avons vu précédemment que les cellules en culture ne reproduisent pas les conditions physiologiques dans lesquelles se développent les tumeurs au sein d'un individu. D'autre part, si de plus en plus d'études réalisent des

expériences d'AFM sur des biopsies réalisées chez l'homme, il est souvent difficile de décorréler la rigidité de la cellule tumorale elle-même et celle de son micro-environnement, souvent entremêlées.

Néanmoins, je vais tâcher dans cette partie de fournir une vue d'ensemble des études réalisées dans ce domaine pour montrer un lien entre propriétés mécaniques intrinsèques et progression tumorale et essayer d'éclaircir des résultats parfois contradictoires.

Alors que plusieurs études ont montré que les cellules tumorales agressives sont plus souples que les cellules saines autour (Cross et al., 2007; Guck et al., 2005; Swaminathan et al., 2011), d'autres études ont montré qu'au contraire, les cellules tumorales, *via* une modification de leur cytosquelette d'actomyosine sont plus rigides que les cellules saines autour (Wu et al., 2020; Zhang et al., 2002).

Si au premier abord, ces résultats semblent opposés puisqu'ils associent l'agressivité tumorale à la fois à des cellules souples et à des cellules rigides, ici plusieurs choses sont à prendre en considération dans l'interprétation de ces résultats. Tout d'abord, il est désormais admis qu'au sein d'une tumeur, il existe une forte hétérogénéité entre les cellules. Si au départ, la tumeur se forme à partir d'une cellule qui se multiplie rapidement, très vite, les cellules acquièrent d'autres mutations et peuvent se comporter de manière différente les unes des autres, pouvant conduire *in fine* à une hétérogénéité au niveau des propriétés mécaniques. De plus, la plupart des études réalisées sur ce sujet font référence aux propriétés mécaniques impliquées dans la « progression tumorale ». Cependant, la progression tumorale est un terme général employé dans des situations très différentes : la prolifération des cellules tumorales, la transition d'un état hyperplasique vers un état dysplasique ou encore la formation de métastases. La plupart du temps, les études font référence à la « progression tumorale » ou « l'agressivité tumorale » sans pour autant préciser de quelle étape il s'agit, pouvant conduire à des contradictions.

Une étude de 2012 a permis de montrer par AFM sur des biopsie humaines que les cellules tumorales semblent avoir des propriétés mécaniques différentes selon l'état d'avancement de la tumeur. Dans cette étude, les résultats d'AFM réalisé sur des biopsies de sein contrôle, d'une tumeur bénigne et d'une tumeur maligne cancéreuse montrent (1) que les cellules tumorales d'une tumeur bénigne sont plus rigides que les

cellules normales et (2) qu'au stade de tumeur maligne cancéreuse, les propriétés mécaniques des cellules sont beaucoup plus hétérogènes (Plodinec et al., 2012).

Au vu de ces données disparates, je vais faire le bilan des connaissances actuelles des propriétés mécaniques des tumeurs suivant leur avancée dans la progression tumorale.

#### *3.2.2.2.1 La prolifération des cellules tumorales*

L'impact des propriétés mécaniques sur la prolifération des cellules tumorales a été montré par plusieurs études. Les propriétés mécaniques sont régulées par les différents cytosquelettes de la cellule mais ici, je me concentrerai sur le cytosquelette d'actomyosine.

La dynamique du cytosquelette d'actomyosine est régulée par de nombreux acteurs, qui peuvent être dérégulés dans les cancers. Par exemple, les Rho GTPases, régulateurs de l'actine, sont particulièrement dérégulées dans les cancers (Fife et al., 2014; Fritz et al., 1999; Orgaz et al., 2014). La surexpression de Rac1 est associée à une augmentation de la prolifération dans un modèle de cellules du cancer du côlon (Espina et al., 2008). Une autre étude a également montré dans une lignée de cellules de cancer du sein, que suite à l'activation de Src, les cellules passent par un état de rigidité transitoire, dépendant de EVL (pour Ena/VASP-like, un régulateur de l'actine) et que cela induit une importante prolifération de ces cellules, de façon ERK-dépendante. De façon intéressante, ils suggèrent dans cette étude que cette augmentation de rigidité transitoire serait une étape qui précède l'évolution de la tumeur vers un état malin (Tavares et al., 2017).

Certains régulateurs de la Myosine-II ont également été rapportés comme étant également dérégulés dans un certain nombre de cancers. ROCK, l'activateur de la Myosine-II non musculaire a plusieurs fois été observé comme étant surexprimé et associé à un mauvais pronostic dans différents types de cancers. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que l'activation de ROCK induit une forte augmentation de la prolifération des cellules tumorales (Paszek et al., 2005; Rath et al., 2017; Samuel et al., 2011).

Néanmoins, si la dérégulation de facteurs régulateurs du cytosquelette d'actomyosine a été associée à une augmentation de la prolifération, elle a également été associée à la dissémination des métastases.

#### 3.2.2.2 Dissémination des métastases

Les métastases représentent une étape bien particulière de la progression tumorale où des cellules quittent la tumeur primaire, migrent et envahissent d'autres tissus pour y former des tumeurs secondaires. Les études mentionnées précédemment associent les métastases à un état souple des cellules, ce qui semble cohérent avec la capacité des métastases à rejoindre les vaisseaux sanguins et s'extravaser pour envahir d'autres tissus (Cross et al., 2007; Guck et al., 2005; Swaminathan et al., 2011). Plusieurs études ont d'ailleurs montré qu'il y avait une corrélation inverse entre rigidité intracellulaire et capacité d'invasion et qu'augmenter la rigidité intracellulaire (*via* un knock-down de TWIST ou une activation de la Myosine-II non musculaire) inhibe la migration, la formation des métastases et améliore grandement la survie des individus dans un modèle de xénogreffes chez la souris (Bryan et al., 2020; Chen et al., 2018).

Néanmoins, d'autres études ont montré au contraire, qu'augmenter les niveaux de ROCK et de Rho, deux régulateurs de la Myosine-II, stimule l'invasion et la formation de métastases dans un modèle de cellules de carcinome de colon (Croft et al., 2004). Une autre étude suggère que ROCK, pourrait faciliter la dissémination des métastases en perturbant l'intégrité de la MEC. En effet, cette étude montre qu'une inhibition transitoire de ROCK *via* un inhibiteur pharmacologique (1) perturbe l'intégrité de la MEC, (2) réduit fortement la dissémination de métastases et (3) permet d'obtenir une meilleure réponse de la tumeur à des molécules de chimiothérapie (Vennin et al., 2017). Cette étude, ainsi que d'autres, suggèrent fortement que des inhibiteurs de ROCK pourraient être une bonne stratégie pour lutter contre la dissémination des métastases et offrir une meilleure réponse à des traitements thérapeutiques (Croft et al., 2004; Rodriguez-Hernandez et al., 2016; Sadok et al., 2015; Vennin et al., 2017).

#### 3.2.2.3 Transition vers un état plus agressif

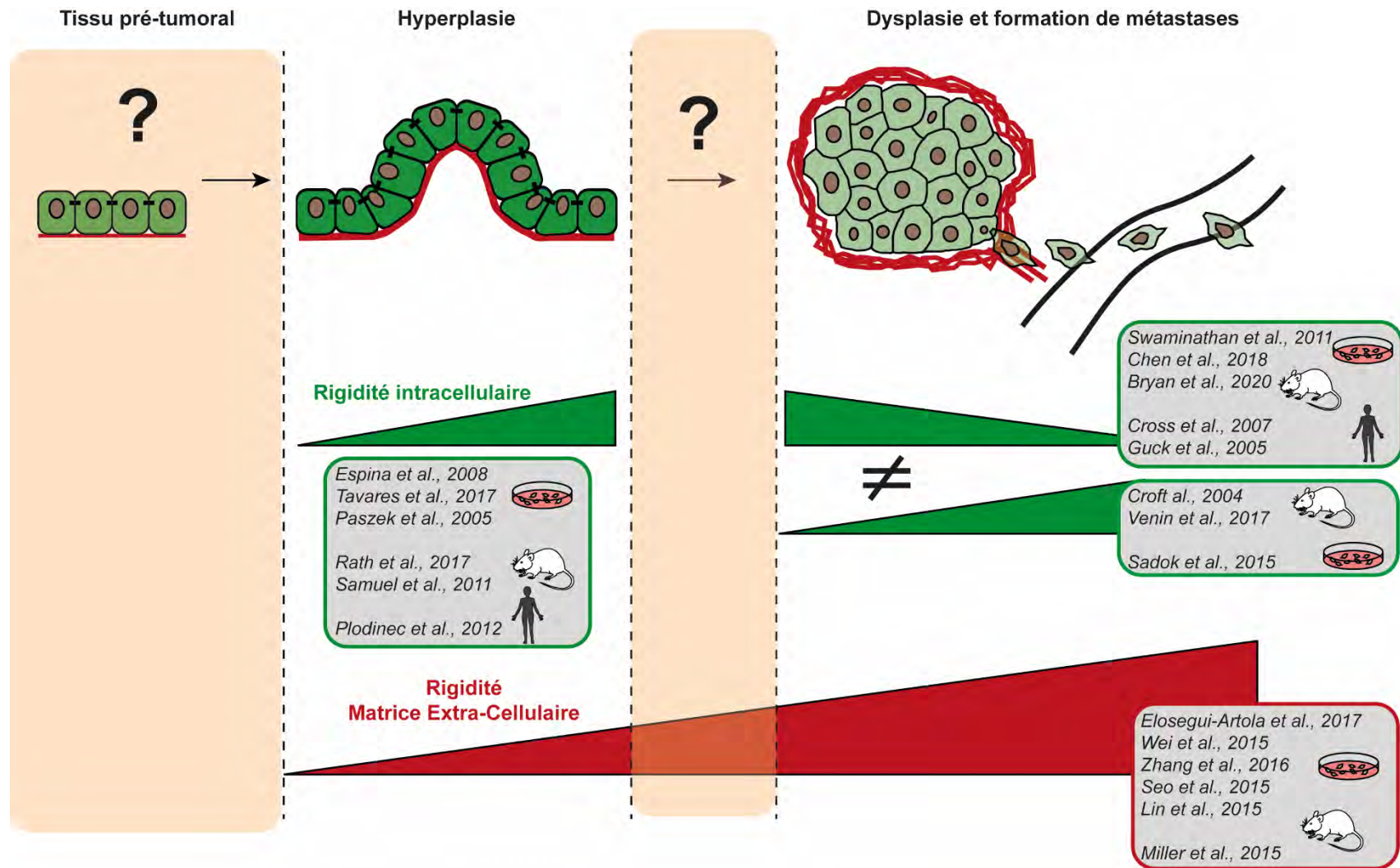
L'étape sur laquelle je me suis concentrée au cours de ma thèse est la transition d'un état hyperplasique vers un état dysplasique, plus agressif. Si les propriétés mécaniques intrinsèques des cellules ont particulièrement été étudiées pour leur rôle sur la prolifération et la dissémination des métastases comme nous l'avons vu précédemment, cette étape est clairement moins documentée. Une étude a tout de même montré chez la souris que l'augmentation de contractilité des cellules, *via* une activation de ROCK, accélère l'évolution de papillomes en carcinomes, des tumeurs plus agressives (Samuel et al., 2011). Néanmoins, dans cette étude les critères de

classification entre papillomes et carcinomes ne sont pas clairement évoqués ni démontrés.

L'ensemble de cette partie a permis de voir qu'un certain nombre d'études a été mené pour étudier les propriétés mécaniques dans la progression tumorale, *via* la prolifération, l'évolution ou la dissémination de métastases. Avec l'ensemble de ces résultats, je propose en Figure 21 un modèle hypothétique de l'impact mécanique sur le développement des tumeurs. Les cellules de la tumeur passeraient par un état de rigidité transitoire qui favoriserait la prolifération et donc la formation de tumeurs hyperplasiques. La dissémination des métastases serait à l'inverse plutôt médiée par une souplesse de la cellule, qui lui permettrait de s'extravaser et de s'intravaser dans les différents tissus, même si certaines études présentent des résultats contradictoires. En parallèle, la rigidité croissante de la MEC joue également un rôle sur l'état mésenchymateux et la dissémination des métastases (Figure 21). Néanmoins, certains mécanismes identifiés semblent dépendants du type de cancers et un certain nombre de questions restent encore sans réponses :

- (1) Les propriétés mécaniques influencent-elles les étapes précoces de la progression tumorale ? Ont-elles un impact sur la transition hyperplasie-dysplasie *in vivo* ?
- (2) Par quels mécanismes la tension cellulaire pourrait-elle affecter la progression tumorale ?





**Figure 21 : Modèle hypothétique de l'impact mécanique sur la progression tumorale**

Résumé de l'impact des propriétés mécaniques sur la progression tumorale en prenant en considération la rigidité intracellulaire (en vert) et la rigidité de la MEC (en rouge). Si les études se sont focalisées sur les étapes de prolifération incontrôlée formant des tumeurs hyperplasiques et sur les étapes tardives comme la dissémination des métastases, rien n'est connu sur les étapes précoces du développement tumoral et la transition hyperplasie-dysplasie.

De façon générale, l'étude de la progression tumorale est souvent réalisée sur des cellules en culture même si d'autres modèles se développent de plus en plus. Ainsi, la co-culture entre différents types cellulaires, les organoïdes, les xénogreffes chez la souris ou le poulet permettent de plus en plus de se rapprocher des conditions de développement *in vivo*.

Néanmoins, si les études sur cellules en culture ont permis d'avancer considérablement notre compréhension de la tumorigénèse, il est essentiel de les combiner à des études réalisées sur des organismes modèles. En effet, chaque modèle, qu'il s'agisse de cellules en culture ou d'organismes modèles, présente ses avantages et ses inconvénients mais les deux restent complémentaires.

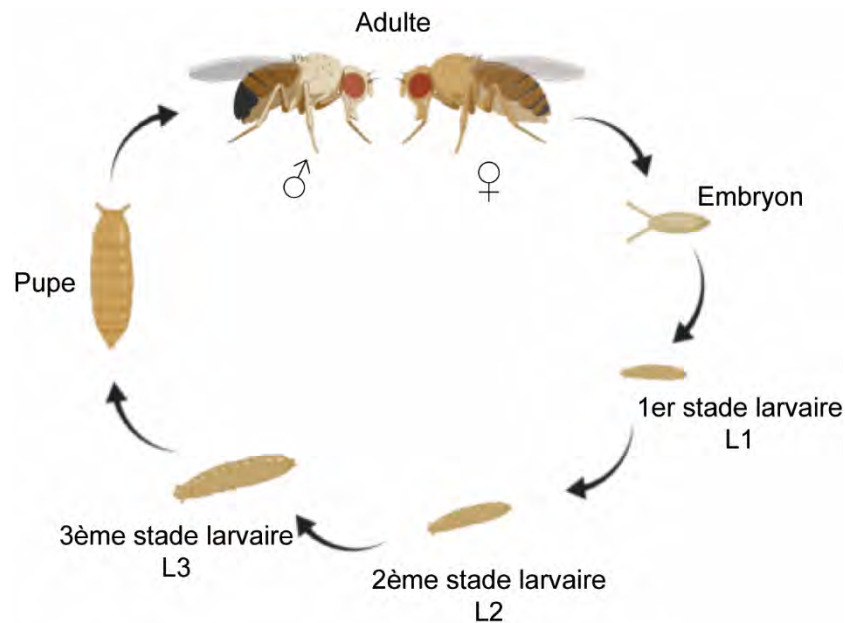
## **4 La drosophile comme organisme modèle d'étude de la tumorigénèse**

Parmi les organismes modèles les plus utilisés, la souris est le premier auquel on pense lorsqu'il s'agit de progression tumorale. Toutefois, la drosophile *Drosophila melanogaster* s'est révélée être un modèle particulièrement intéressant pour étudier cet aspect, comme nous allons le voir.

Aussi appelée mouche du vinaigre, la drosophile est un organisme modèle utilisé maintenant depuis plus de 100 ans pour aborder toute sorte de questions de biologie cellulaire ou du développement et de plus en plus pour des aspects d'oncologie. Son faible coût, sa rapidité de reproduction ou encore le grand nombre d'individus que l'on peut obtenir rapidement en font un modèle très facile à utiliser et manipuler. Ce modèle présente également de gros atouts au niveau génétique. Si de nombreux outils génétiques (lignées ARNi, lignées rapportrices, mutants...) sont à disposition de la communauté, c'est le système UAS/Gal4 et les autres systèmes du même genre (LexA et QF) qui font de la drosophile un modèle particulièrement puissant (Brand and Perrimon, 1993; Potter and Luo, 2013; Yagi et al., 2010). En effet, ces systèmes permettent d'exprimer un transgène (ARNi, GFP, etc...), dans des domaines spécifiques afin de suivre facilement leurs effets, au sein d'un territoire d'intérêt.

Comme mentionné précédemment, la drosophile présente l'avantage d'avoir un développement plutôt rapide qui dure environ 11 jours à 25°C. Après un accouplement,

la femelle pond des œufs desquels sortiront au bout de 24 heures des larves. Les larves grandissent et passent par trois stades larvaires différents (L1, L2 et L3), stades au cours duquel la prolifération est particulièrement importante et auxquels je me suis intéressée. Vient ensuite la métamorphose, stade qui dure environ 5 jours pendant lequel l'individu s'entoure d'un cocon appelé puppe jusqu'à ce que l'adulte sorte (Figure 22).

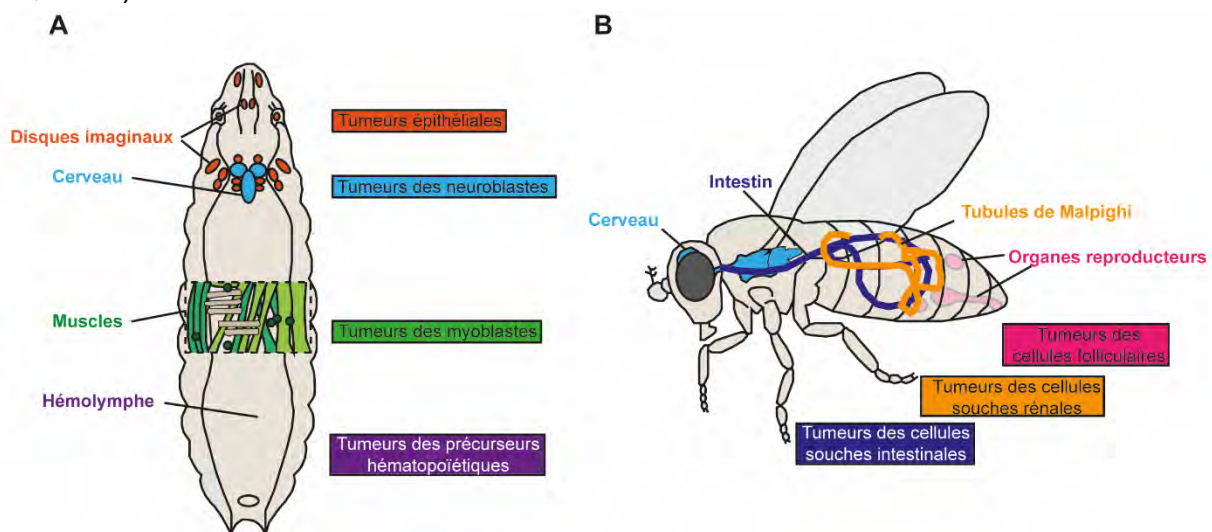


### Figure 22 : Le cycle de développement de la drosophile

Le cycle de développement dure environ 11 jours à 25°C. Après l'accouplement, la femelle drosophile pond des œufs desquels sortiront des larves au bout de 24h. Après avoir passé trois stades larvaires successifs (L1, L2, L3), les larves rentrent en métamorphose, protégées par un cocon appelé puppe. Au bout de 5 jours, un individu adulte sort de la puppe et est prêt à se reproduire.

Le cancer provient avant tout d'une dérégulation du processus de prolifération et de différenciation des cellules. Si plusieurs aspects du cancer ne peuvent pas être reproduits chez la drosophile, l'étude de la fonction d'un ou plusieurs gènes sur la prolifération est au contraire très facile à mettre en œuvre chez cet organisme. En effet, si chez les mammifères le développement d'un cancer nécessite souvent plusieurs mutations qui s'accumulent avec le temps, chez la drosophile, l'induction d'un cancer peut se faire à partir d'une seule mutation, rendant l'analyse et la compréhension du processus plus simple.

De plus, de nombreux mécanismes et voies de signalisation sont conservées entre l'Homme et la drosophile. Par exemple, 75% des gènes mutés ou délétés impliqués dans des pathologies humaines ont leurs homologues chez la drosophile (Mirzoyan et al., 2019). Par ailleurs, de nombreux gènes impliqués dans la formation de cancers chez l'Homme ont d'abord été identifiés chez la drosophile comme responsables de la formation de tumeurs. L'exemple du gène le plus souvent cité pour illustrer ce fait est l'identification du gène *lethal giant larvae (lgl)* dans les années 1930. Ce gène, impliqué dans la polarité apico-basale induit, lorsqu'il est muté, la surprolifération importante des tissus puis conduit à la mort de l'individu (Bryant and Schubiger, 1971; Froidi et al., 2008; Gateff, 1978). *lgl* est donc le premier gène suppresseur de tumeurs identifié chez la drosophile. Des résultats similaires ont été obtenus avec les interacteurs de Lgl, Dlg et Scribble, également impliqués dans la mise en place et le maintien de la polarité apico-basale (Bilder et al., 2000). Ces trois composants ont par la suite été rapportés comme étant mutés et réprimés chez l'homme et ce, dans de nombreux cancers (Grifoni et al., 2004; Kuphal et al., 2006; Navarro et al., 2005; Schimanski et al., 2005).



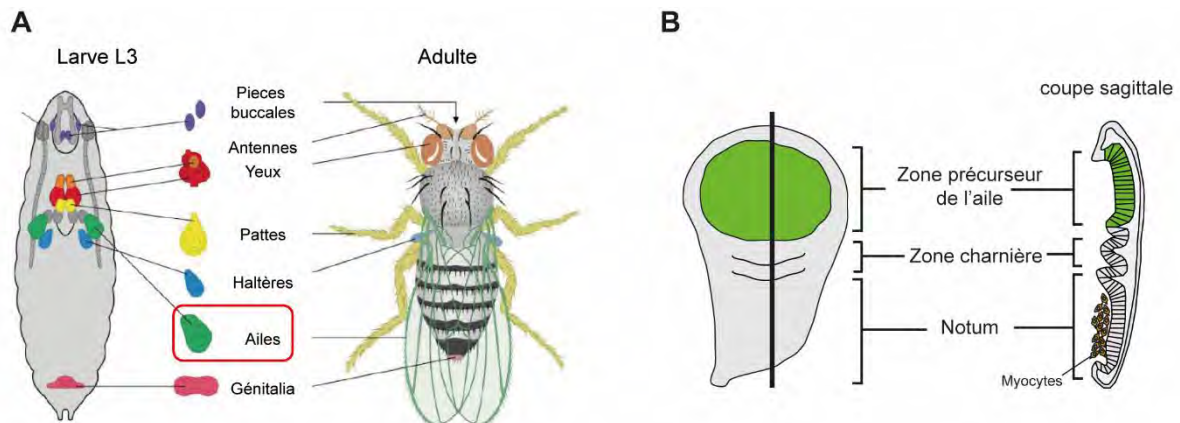
**Figure 23 : Les tumeurs chez la drosophile**

Exemples de tissus qu'il est possible de manipuler chez la larve (A) et chez l'adulte (B) pour induire la formation de tumeurs. Adapté de (Gonzalez, 2013)

Si les cancers peuvent se développer à partir de plusieurs tissus différents chez l'homme, il est également possible d'induire des mutations dans différents tissus chez la drosophile grâce au système UAS-Gal4 ; que cela soit chez la larve ou chez l'adulte. Par exemple, en induisant certaines mutations spécifiquement au niveau des muscles, des précurseurs hématopoïétiques chez la larve ou encore des cellules de l'intestin

chez l'adulte, il est possible de reproduire jusqu'à une certaine limite des myosarcomes, leucémie aigüe myéloïde et cancer de l'intestin respectivement (Gonzalez, 2013; Tipping and Perrimon, 2014) (Figure 23).

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux cancers issus de cellules épithéliales, que l'on peut facilement reproduire dans des structures que l'on appelle les disques imaginaux.

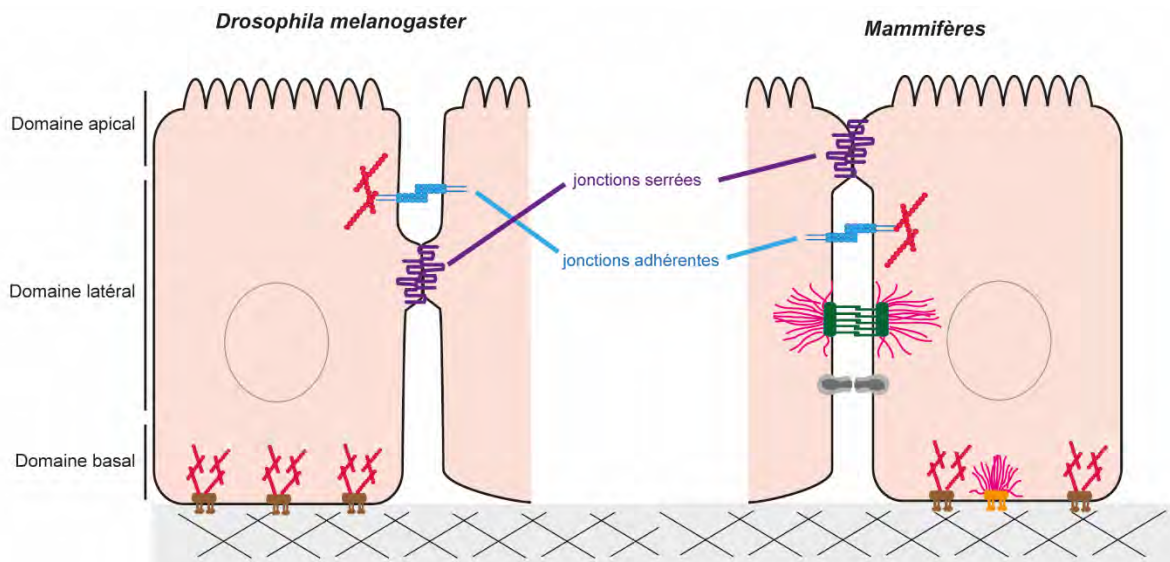


**Figure 24 : Les disques imaginaux chez la drosophile**

(A) Les disques imaginaux sont des structures que l'on retrouve chez la larve et qui donneront les différents appendices que l'on trouve chez l'adulte comme les pattes et les ailes par exemple. (B) Schématisation du disque imaginal d'aile, constitué d'un épithélium monocouche entouré d'une membrane péricellulaire. Des myocytes (en orange sur le schéma) sont présents sous les cellules épithéliales constituant le notum. Adapté de (Wolpert et al., 1998)

Les disques imaginaux sont des structures particulières que l'on trouve chez la larve et qui, au cours de la métamorphose, se transforment pour donner les différents appendices chez l'adulte comme les ailes et les pattes (Figure 24A). Ils sont constitués d'un épithélium monocouche, comprenant entre 20 000 et 50 000 cellules et sont entourés de cellules squameuses qui constituent la membrane péricellulaire. Les cellules de l'épithélium, reliées entre elles par des jonctions intercellulaires et reposant sur une matrice extracellulaire présentent une organisation très similaire à ce que l'on trouve chez les mammifères, bien que la position respective selon l'axe apico-basal des jonctions adhérentes et des jonctions serrées (que l'on appelle jonctions septées chez la drosophile) soit inversée (Figure 25) (Buckley and St Johnston, 2022b).





**Figure 25 : Comparaison des jonctions intercellulaires entre la drosophile et les mammifères**

Schémas représentant les jonctions intercellulaires chez la drosophile où les jonctions adhérentes et serrées sont inversées par rapport aux mammifères.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé le disque imaginal d'aile. Il est constitué de trois régions : la zone précurseur de l'aile (qui donnera l'aile chez l'individu adulte), la région charnière (qui servira d'attache entre l'aile et le thorax) et la zone du notum (qui donnera une partie du thorax chez l'adulte (Figure 24B). Pour mes travaux, j'ai utilisé plus particulièrement la région précurseur de l'aile (Figure 24B, en vert) qui présente l'avantage d'être simple à manipuler, relativement étendue (ce qui permet de s'affranchir d'un phénomène de compétition cellulaire) et qui ne présente pas d'interactions avec d'autres types cellulaires contrairement à la région du notum qui repose sur des myocytes par exemple (Figure 24B, en orange).

La drosophile est donc un modèle particulièrement intéressant pour étudier la tumorigénèse. En effet, ses nombreux outils génétiques permettent de reproduire facilement les différentes étapes de la progression tumorale comme nous allons le voir dans cette partie.

## 4.1 La formation de tumeurs hyperplasiques

### 4.1.1 La prolifération incontrôlée

Chez la drosophile, de nombreuses mutations ont été identifiées comme responsables de l'apparition d'une tumeur à la suite d'une prolifération incontrôlée. Par exemple, la

mutation Ras<sup>V12</sup> de l'élément Ras de la voie des MAPK/ERK qui est fréquemment observée dans de nombreux cancers chez l'Homme (Bos, 1988), conduit aussi à la formation de tumeurs hyperplasiques chez la drosophile (Karim and Rubin, 1998). De plus, il est également possible de jouer à d'autres niveaux de cette même voie, par exemple en surexprimant le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Herranz et al., 2016). Si la voie des MAPK/ERK a été particulièrement étudiée, la perturbation d'autres voies de signalisation peut aussi conduire à la formation de tumeurs. Par exemple, une mutation activatrice au niveau de Notch, un récepteur protéique impliqué dans de nombreux processus développementaux, conduit à son activation en continu, une surprolifération et la formation d'une tumeur dans le disque d'aile (Go et al., 1998). Les mutations au niveau de Notch sont d'ailleurs très fréquentes dans les cancers chez l'homme (Zhou et al., 2022). Également, des mutations au niveau des différents acteurs de la voie de signalisation Hippo (Figure 27), fréquemment affectée dans les cancers, conduisent à une forte surprolifération (Justice et al., 1995; Mahoney et al., 1991; Tapon et al., 2002).

Si la perturbation de certaines voies de signalisation peut conduire à la formation de tumeurs hyperplasiques, l'environnement des cellules tumorales, particulièrement les interactions avec d'autres types cellulaires, tout comme chez les mammifères, peut avoir une certaine importance dans la prolifération des cellules tumorales chez la drosophile. Si la drosophile ne possède pas de fibroblastes, d'autres types cellulaires autour de la tumeur ont été montrés comme influençant la progression tumorale. Par exemple, dans un modèle de tumeur induite dans la partie notum du disque imaginal d'aile, Boukhatmi et al., montrent que l'interaction des cellules tumorales avec les myocytes (cellules précurseurs des muscles situées sous le notum, en orange sur la Figure 24B), conduit à l'activation de Notch dans les myocytes qui surprolifèrent et participent à la croissance de la tumeur (Boukhatmi et al., 2020). Une autre étude montre que les zones d'interactions entre plusieurs types cellulaires forment ce que l'on appelle des « points chauds » (« hotspots »), plus sensibles au développement de tumeurs. Ainsi l'utilisation d'une forme mutée de Notch dans la glande salivaire peut n'avoir qu'un faible effet dans certaines cellules mais induire la formation d'une tumeur dans les cellules voisines dont l'environnement est distinct (Yang et al., 2019).

De façon générale, les interactions entre cellules tumorales et autres types cellulaires modifient fortement la croissance tumorale, notamment *via* l'induction de certaines

voies de signalisation au sein des cellules tumorales. La voie c-Jun N-terminal kinase (JNK) permet chez la drosophile d'assurer un développement correct en induisant par exemple l'apoptose des cellules anormales. Néanmoins, si en induisant l'apoptose, la voie JNK a longtemps été considérée comme une voie antitumorale, de plus en plus d'études montrent que bien souvent, son rôle est détourné au sein des cellules tumorales et que son activation favorise la croissance tumorale (Diwanji and Bergmann, 2020; Fogarty et al., 2016; Pinal et al., 2018). Elle a également été montrée comme induisant l'activation d'une autre voie de signalisation, la voie JAK/STAT. Normalement impliquée dans la prolifération, cette voie de signalisation est souvent suractivée dans les cellules tumorales, induisant une forte croissance de la tumeur (González et al., 2009; Harrison et al., 1995; Yang et al., 2019).

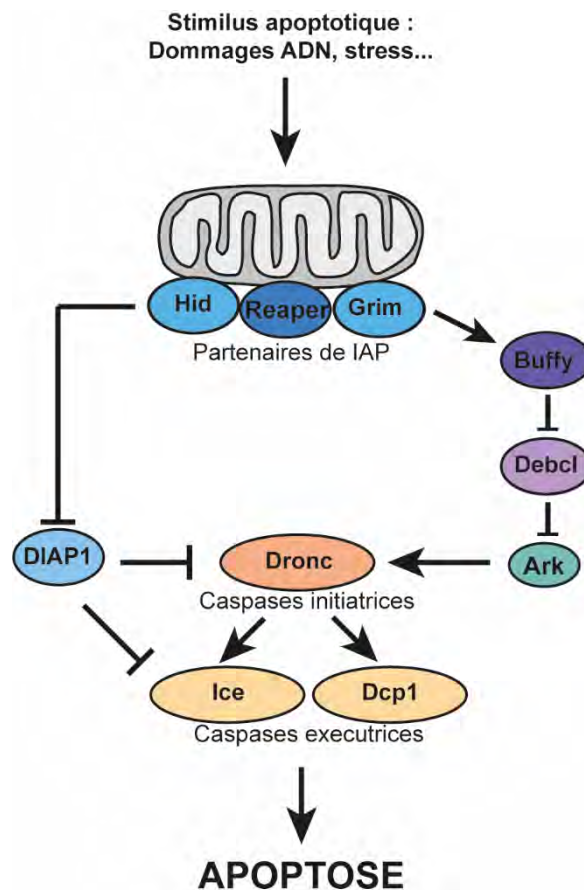
Enfin, des études montrent que certains composants du cytosquelette d'actine pourraient également être impliqués dans la tumorigénèse. Par exemple *Cheerio*, un membre de la famille des filamines, impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine a été montré comme essentiel dans la prolifération des tumeurs Ras<sup>V12</sup>/*scrib*<sup>-/-</sup> dans lesquelles son inhibition ralentit très fortement la prolifération des cellules tumorales (Külshammer and Uhlirva, 2013; Külshammer et al., 2022). Également, une autre étude a démontré que la coopération entre RhoGEF2, un régulateur de la Myosine-II, et une forme activée de Ras conduit à l'activation de la voie JNK, ce qui favorise la prolifération des cellules tumorales et la croissance de la tumeur (Khoo et al., 2013).

Ainsi, de nombreuses mutations ont été identifiées comme étant responsables de l'apparition de tumeurs hyperplasiques. Ces études mettent aussi en avant l'importance de la communication entre différents types cellulaires et les composants du cytosquelette.



#### 4.1.2 La résistance accrue à l'apoptose

Si l'hyperplasie est le résultat d'une surprolifération, elle peut aussi être due à une diminution de l'apoptose qui peut amplifier ce phénomène et prévenir l'élimination des cellules. Chez la drosophile, la cascade apoptotique est assez similaire à celle des mammifères, bien que légèrement plus simple. Plusieurs voies de signalisation peuvent conduire à l'apoptose en activant notamment les gènes pro-apoptotiques *hid*, *reaper* et *grim*. Une fois activés, Hid, Reaper et Grim peuvent, en se fixant à Diap1 (Drosophila IAP) l'inhiber comme chez les mammifères. Cette inhibition permet ainsi l'activation des caspases parmi lesquelles on trouve par exemple Dronc, une caspase activatrice qui va, à son tour, activer les caspases effectrices comme Dcp1 et Ice qui vont ensuite, en agissant sur différentes cibles induire l'apoptose (Figure 26) (Fuchs and Steller, 2015).

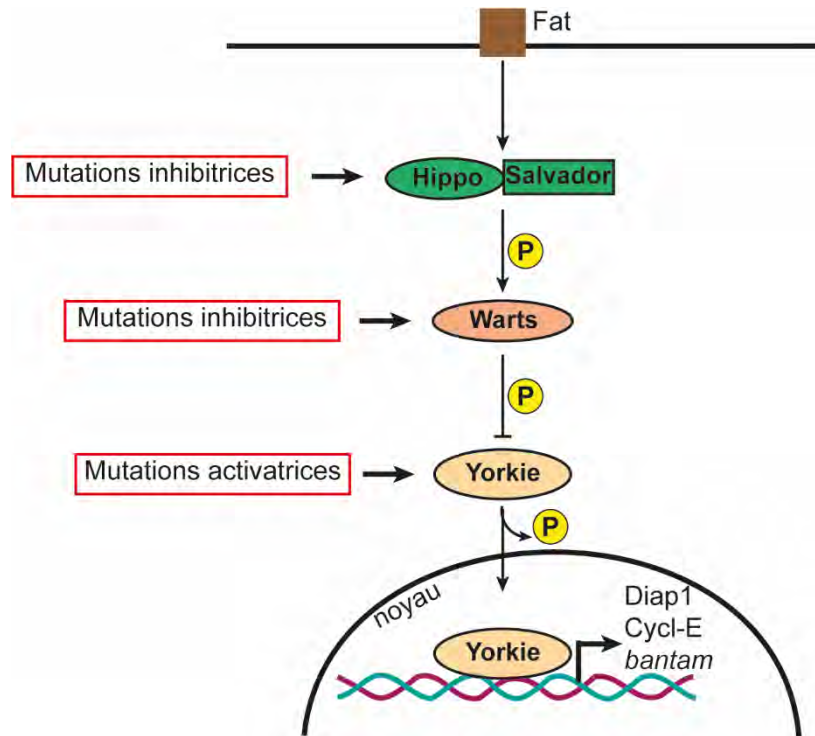


**Figure 26 : La cascade apoptotique chez la drosophile**

La cascade apoptotique chez la drosophile est très similaire à celle des mammifères, bien que plus simple. A la suite d'un stimulus apoptotique, les gènes *hid*, *reaper* et *grim* sont activés et peuvent inhiber Diap1 (Drosophila IAP). Cette inhibition permet d'activer les caspases activatrices, dont Dronc, qui peuvent ensuite activer les caspases exécutoires. En parallèle, l'activation des trois gènes pro-apoptotiques induit l'activation de Buffy qui peut inhiber Debcl (l'équivalent de Bcl2 chez les mammifères) et induire l'activation de Ark, un composant de l'apoptosome. Adapté de (Fuchs and Steller, 2015)

La drosophile permet également de reproduire le phénomène de résistance accrue à l'apoptose dans les cellules tumorales. Dans une étude réalisée sur le disque imaginal d'œil-antenne, l'induction de clones mutants pour *Igl<sup>-/-</sup>*, en plus d'induire la formation de tumeurs, perturbe le patron normal d'apoptose suggérant que la mutation *Igl<sup>-/-</sup>* inhiberait l'apoptose (Grzeschik et al., 2007). Si dans ce contexte, la diminution de l'apoptose induite par la mutation *Igl<sup>-/-</sup>* n'est pas spécialement étudiée, d'autres études ont toutefois identifié certains des mécanismes par lesquels les cellules tumorales développent une résistance accrue à l'apoptose, notamment *via* des études réalisées sur la voie Hippo.

La voie Hippo est une voie de signalisation particulièrement importante dans le contrôle de la taille des organes en régulant à la fois la prolifération et la mort cellulaire. Cette voie est normalement maintenue inactive *via* un jeu de phosphorylation entre les kinases Hippo et Warts. Néanmoins, lorsque la voie est activée, l'inhibition des trois kinases permet l'activation et la translocation du facteur de transcription Yorkie (Yki) (homologue de YAP chez les mammifères) dans le noyau qui induit l'expression de gènes cibles comme la Cycline E pour favoriser la prolifération cellulaire mais également Diap1 pour empêcher l'apoptose (Figure 27) (Davis and Tapon, 2019). Dans les cancers, les mutations au niveau de cette voie sont particulièrement nombreuses (Harvey et al., 2013), menant principalement à la suractivation de la voie. Chez la drosophile, de nombreuses études ont pu montrer que la suractivation de la voie Hippo, que ce soit par l'inactivation de Hippo, Warts ou Salvador ou par la suractivation de Yki, conduit à une surprolifération des tissus et donc à la formation de tumeurs ainsi qu'une forte résistance à l'apoptose, notamment *via* la surexpression de Diap1 (Huang et al., 2005b; Tapon et al., 2002; Wu et al., 2003). Deux autres études ont également mis en évidence que l'activation de la voie Hippo, en plus de prévenir l'apoptose *via* la surexpression de Diap1, le fait également *via* l'expression d'un micro-ARN appelé *bantam*. En effet, dans ces études, les auteurs montrent que la suractivation de la kinase Hippo induit une forte apoptose et que dans ce cas, la co-expression de *bantam* est suffisante pour bloquer cette apoptose (Nolo et al., 2006; Thompson and Cohen, 2006). Une étude un peu plus récente montre que l'inhibition de *bantam* réduit fortement la prolifération dans des tumeurs EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), suggérant que *bantam* jouerait à la fois sur la prolifération et sur l'apoptose (Herranz et al., 2012).



### Figure 27 : Voie de signalisation Hippo et dérégulation dans les cancers

La voie de signalisation Hippo repose sur une série de phosphorylation entre les différentes kinases de la voie. Lorsque la voie n'est pas activée, la kinase Hippo, associée à Salvador active Warts en la phosphorylant qui peut en conséquence inhiber Yorkie. Lorsque la voie est activée, les kinases Hippo, et Warts sont inactivées, permettant ainsi l'activation de Yorkie, sa translocation dans le noyau qui permet la transcription des gènes cibles parmi lesquels on retrouve la Cycline-E, induisant la prolifération, Diap1 et *bantam* conférant une activité anti-apoptotique. Cette voie de signalisation est très souvent mutée dans les cancers, à différents endroits de la voie (indiqué dans les cadres rouges), induisant une activation constitutive de la voie.

Enfin, des études, cette fois-ci réalisées en contexte développemental et non tumoral, ont montré que l'activation de la voie des MAPK et particulièrement l'activation de Ras prévient l'apoptose induite par le gène *hid* (Bergmann et al., 1998; Kurada and White, 1998). Également, une étude réalisée au cours du développement de la drosophile a montré que l'activation de la voie EGFR dans certaines cellules du thorax induit rapidement (dès 15 minutes) l'inhibition de l'apoptose dans les cellules voisines (Valon et al., 2021). Les mutations de Ras et de EGFR, notamment celles induisant leur activation étant particulièrement fréquentes dans les cancers, ces études ouvrent peut-être la voie vers l'identification de nouveaux mécanismes par lesquels les cellules tumorales acquerraient une résistance accrue à l'apoptose, *via* Ras qui préviendrait l'apoptose en réprimant le gène pro-apoptotique *hid* ou *via* EGFR par un mécanisme encore indéterminé. Ces différents exemples permettent de mettre en évidence que, tout comme chez les mammifères, les cellules tumorales sont capables de jouer à

différents niveaux, que ce soit au niveau transcriptionnel ou au niveau post-traductionnel pour induire une résistance accrue à l'apoptose, un phénomène favorisant la croissance tissulaire lors des hyperplasies.

## 4.2 La formation de tumeurs dysplasiques

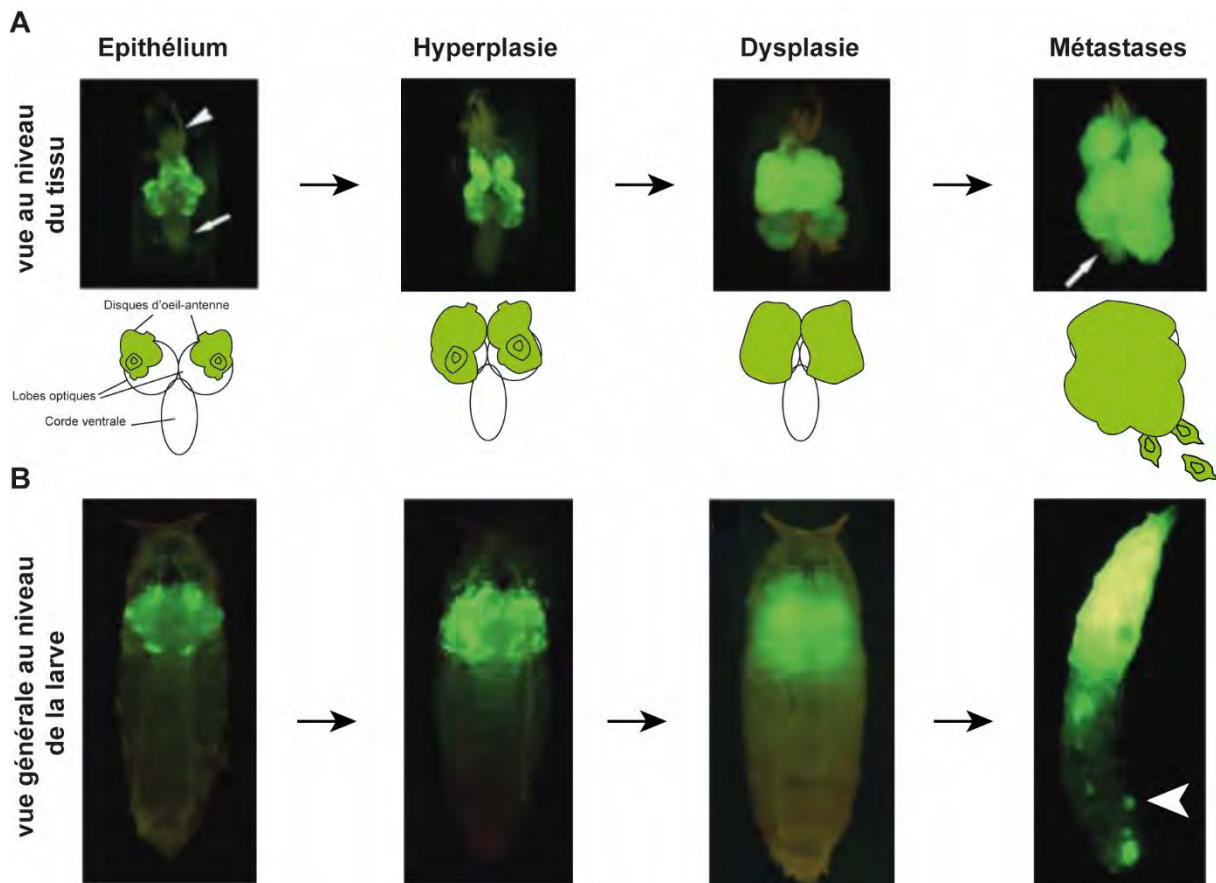
Si la prolifération incontrôlée est à l'origine des tumeurs hyperplasiques, c'est-à-dire des tumeurs au sein desquelles les cellules conservent leurs propriétés épithéliales, certaines tumeurs peuvent par la suite évoluer pour devenir plus agressives et devenir dysplasiques (Figure 28).

### 4.2.1 Perturbation de la polarité apico-basale

Des études ont permis des avancées significatives en montrant que la perturbation de la polarité apico-basale conduisait à la formation d'une tumeur dysplasique. En effet, les tumeurs dysplasiques sont constituées de cellules mésenchymateuses qui ont donc perdu au moins une partie de leurs caractéristiques épithéliales, dont la polarité apico-basale fait partie. Les mutations des composants responsables de la polarité apico-basale, comme *lgl*, *scribble*, *dlg*, *bazooka* ou encore *aPKC* ont donc été associées à la formation de tumeurs dysplasiques (Bilders, 2004; Dow et al., 2007; Leong et al., 2009; Ling et al., 2010). D'autres mutations de gènes suppresseurs de tumeurs, comme *Syntaxine 7* (*Syx7*), aussi appelé *Avalanche* ont également été montrées comme induisant la formation de tumeurs dysplasiques suite à une perturbation de l'endocytose qui induirait une expansion de la membrane apicale et perturberait ainsi la polarité apico-basale (Colombani et al., 2012; Lu and Bilder, 2005).

Par la suite, des études ont également montré que la combinaison de certaines mutations induisait la formation de tumeurs dysplasiques. Par exemple la combinaison de mutations impliquées dans la prolifération incontrôlée comme  $Ras^{V12}$  ou EGFR combinées à des mutations induisant une perte de polarité apico-basale conduit à la formation de tumeurs particulièrement agressives pouvant même évoluer jusqu'à la formation de métastases (Brumby and Richardson, 2003; Dow et al., 2008; Igaki et al., 2006; Pagliarini and Xu, 2003). Par ailleurs, on a longtemps cru qu'il fallait que les deux mutations soient présentes au sein de la même cellule tumorale pour que cela induise une tumeur agressive. Néanmoins, il existe une coopération entre cellules tumorales : induire côte à côte des cellules mutantes pour  $Ras^{V12}$  et pour *scrib*<sup>-/-</sup> suffit

à induire la formation de tumeurs particulièrement agressives. Les auteurs ont ainsi identifié que les cellules tumorales communiquent entre elles *via* différents ligands relargués qui, ensemble vont agir en synergie lors de la formation de dysplasies (Wu et al., 2010).



**Figure 28 : Les différentes étapes de la formation de tumeurs chez la drosophile**  
 (A-B) Exemples des différentes étapes de la progression tumorale de tumeurs induites dans les disques imaginaux d'œil-antenne et les lobes optiques, marquées à la GFP, au niveau du complexe céphalique (A) et à l'échelle de l'individu (B). Des tissus contrôle marqués à la GFP sont montrés à gauche. A la suite de certaines mutations (ici, la mutation Ras<sup>V12</sup>), les disques imaginaux prolifèrent et forment des tumeurs hyperplasiques. Les tumeurs peuvent ensuite évoluer en tumeurs dysplasiques, qui deviennent plus difformes (ici, combinaison de mutations dAkt/scrib<sup>-/-</sup>, lats<sup>-/-</sup>). Enfin, les tumeurs peuvent aussi envahir la corde ventrale (A, panel de droite, flèche blanche) et former des métastases que l'on peut observer au postérieur de la larve (ici, suite à la combinaison de mutations ras<sup>V12</sup>, scrib<sup>-/-</sup>) (B, panel de droite, tête de flèche). Adapté de (Pagliarini and Xu, 2003).

#### 4.2.2 Facteurs qui influencent les tumeurs dysplasiques

Enfin, si les mutations en elles-mêmes sont responsables de la formation de tumeurs dysplasiques, certains mécanismes additionnels comme des cellules du microenvironnement par exemple peuvent amplifier l'agressivité de la tumeur.

Par exemple, des études ont montré que suite à l'induction de tumeurs dysplasiques causées par la combinaison de mutations  $ras^{V12}/scrib^{-/}$ , des macrophages (appelés hémocytes chez la drosophile) sont recrutés et activés à proximité de la tumeur suite au relargage de ROS (« reactive oxygen species », Espèces Réactives à l'Oxygène) par les cellules tumorales. Ils montrent également que ce recrutement d'hémocytes favorise la prolifération des cellules tumorales, accroissant l'agressivité de la tumeur (Bergmann et al., 2017; Diwanji and Bergmann, 2020). Néanmoins, le rôle des hémocytes semble être plus compliqué que simplement pro-tumoral et peut-être dépendant des tumeurs. En effet, une autre étude montre que l'élimination des macrophages dans un même modèle de tumeur  $Ras^{V12}/scrib^{-/}$ , conduit à une augmentation de la taille de la tumeur, suggérant dans ce cas que les macrophages limiteraient la prolifération des cellules tumorales (Pastor-Pareja et al., 2008).

Ces rôles à la fois pro- et anti-tumoraux pourraient faire écho à ce qui a été observé chez les mammifères. En effet, chez les mammifères les macrophages peuvent être activés de différentes manières et devenir soit des « macrophages-M1 » impliqués dans une réponse inflammatoire, soit des « macrophages-M2 », impliqués dans la réparation des tissus. Ayant des fonctions différentes, au niveau d'une tumeur, les macrophages-M2 ont plutôt été associés à la croissance tumorale en relarguant certaines cytokines tandis qu'au contraire, les macrophages-M1 éliminent normalement les cellules tumorales (Yunna et al., 2020, 2). Dans les études présentées précédemment chez la drosophile, les hémocytes sont activés de manière différentielle. En effet, d'un côté, les hémocytes sont activés suite au relargage de ROS par les cellules tumorales (Bergmann et al., 2017; Fogarty et al., 2016) tandis que de l'autre, ils sont activés suite au relargage d'Unpaired (Upd), le ligand de la voie JAK/STAT par les cellules tumorales (Pastor-Pareja et al., 2008). Si la classification en macrophages-M1 et M2 n'a pas été démontrée chez la drosophile, il est tout à fait possible que la voie par laquelle les hémocytes sont activés conduise *in fine* à un rôle pro ou antitumoral selon les cas.

De façon générale, si dans ces études, les hémocytes agissent comme un accélérateur de croissance de la tumeur, ce sont d'abord des mutations spécifiques qui sont responsables de la formation de tumeurs dysplasiques chez la drosophile.

Chez l'homme, la perte de polarité apico-basale, à l'origine du phénotype mésenchymateux des cellules et de la formation de tumeurs dysplasiques, est une

conséquence d'une accumulation de mutations au fil des années qui perturbent le fonctionnement normal de la cellule. Au contraire, dans les études réalisées chez la drosophile, la plupart des mutations perturbent directement la polarité apico-basale et induisent la formation de tumeurs dysplasiques en quelques jours. Si ces études ont permis d'améliorer notre compréhension des tumeurs dysplasiques, elles ne permettent cependant pas d'étudier le caractère évolutif des tumeurs. En effet, un point crucial dans la compréhension de la tumorigénèse repose sur l'identification des mécanismes dérégulés dans les tumeurs hyperplasiques qui pourraient induire un phénotype mésenchymateux et donc la transition vers un état dysplasique. Peu d'études ont été réalisées dans cet objectif. Néanmoins, une étude de 2018 a permis de montrer qu'un changement métabolique, particulièrement l'expression d'une enzyme lactate déshydrogénase (LDH), dans les cellules tumorales pouvait induire la conversion d'une tumeur hyperplasique en tumeur dysplasique. Ils réalisent également l'expérience inverse et montrent que l'inhibition de cette enzyme dans un contexte normalement agressif empêche l'évolution de cette tumeur. Ces expériences démontrent ainsi le rôle particulièrement important de cette enzyme sur la progression des tumeurs dépendantes du récepteur EGFR (Eichenlaub et al., 2018).

Ainsi, dans cette partie nous avons vu que certaines mutations responsables de la perte de polarité apico-basale sont responsables de la formation de tumeurs dysplasiques et que ces tumeurs peuvent en plus, être influencées par des éléments extérieurs à la tumeur comme la présence d'hémocytes. Le métabolisme peut aussi favoriser la transition d'une tumeur hyperplasique vers une tumeur dysplasique.

### 4.3 Les étapes tardives de la progression tumorale

Si comme nous venons de le voir, la drosophile permet de reproduire des tumeurs dysplasiques, c'est un modèle qui permet également de reproduire des étapes beaucoup plus tardives associées au cancer, c'est-à-dire la formation de métastases ou encore la cachexie, un symptôme associé au cancer.

#### 4.3.1 *Invasion, formation de métastases*

Chez la drosophile, pour déterminer la capacité d'invasion et de formation des métastases, le plus courant consiste à induire des mutations au niveau du disque imaginal d'œil-antenne et d'observer si les cellules tumorales, marquées par une GFP



par exemple, envahissent la corde ventrale ou non (Figure 28A). Néanmoins, dans ce genre d'étude, il est difficile de conclure qu'il s'agisse bien d'une invasion et que la tumeur en question soit effectivement devenue plus agressive. En effet, en regardant simplement à l'échelle tissulaire, il est impossible de dire quel est le phénotype des cellules en question. De plus, même si des cellules se retrouvent au niveau de la corde ventrale, il est tout à fait envisageable qu'il s'agisse simplement du résultat d'une surprolifération particulièrement importante qui finit par atteindre la corde ventrale.

Les métastases, eux, sont le résultat de l'acquisition de propriétés migratoires par les cellules tumorales qui peuvent donc migrer hors de la tumeur primaire pour aller former ailleurs dans l'organisme des tumeurs secondaires. Bien que la drosophile possède un système circulatoire ouvert contrairement à l'homme qui possède un système de vaisseaux sanguins et lymphatiques, il est tout à fait possible d'y étudier la formation de métastases. Pour cela, la stratégie la plus souvent utilisée est l'induction d'une tumeur au niveau des disques d'œil-antenne et des lobes optiques du cerveau puis, en utilisant une GFP qui est spécifique des cellules tumorales (grâce au système UAS-Gal4), il est possible de suivre ces cellules et de déterminer si elles se détachent de la tumeur primaire. La réalisation d'un crible génétique a d'ailleurs permis de mettre en évidence des combinaisons de mutations qui généraient des métastases. En effet, dans cette étude, les auteurs ont réalisé des clones mutants pour différentes combinaisons de mutations au niveau des disques d'œil-antenne et ils ont observé quelques jours plus tard la présence de points marqués à la GFP dans la zone postérieure de la larve, montrant que les cellules induites dans le disque d'œil-antenne ont bien migré à travers l'organisme (Figure 28B) (Pagliarini and Xu, 2003).

Néanmoins, si les métastases sont à l'origine d'un grand nombre de décès dans les cas de cancer, la cachexie, un symptôme associé à des stades avancés peut également diminuer fortement le pronostic de survie.

#### *4.3.2 La cachexie, un symptôme associé au cancer*

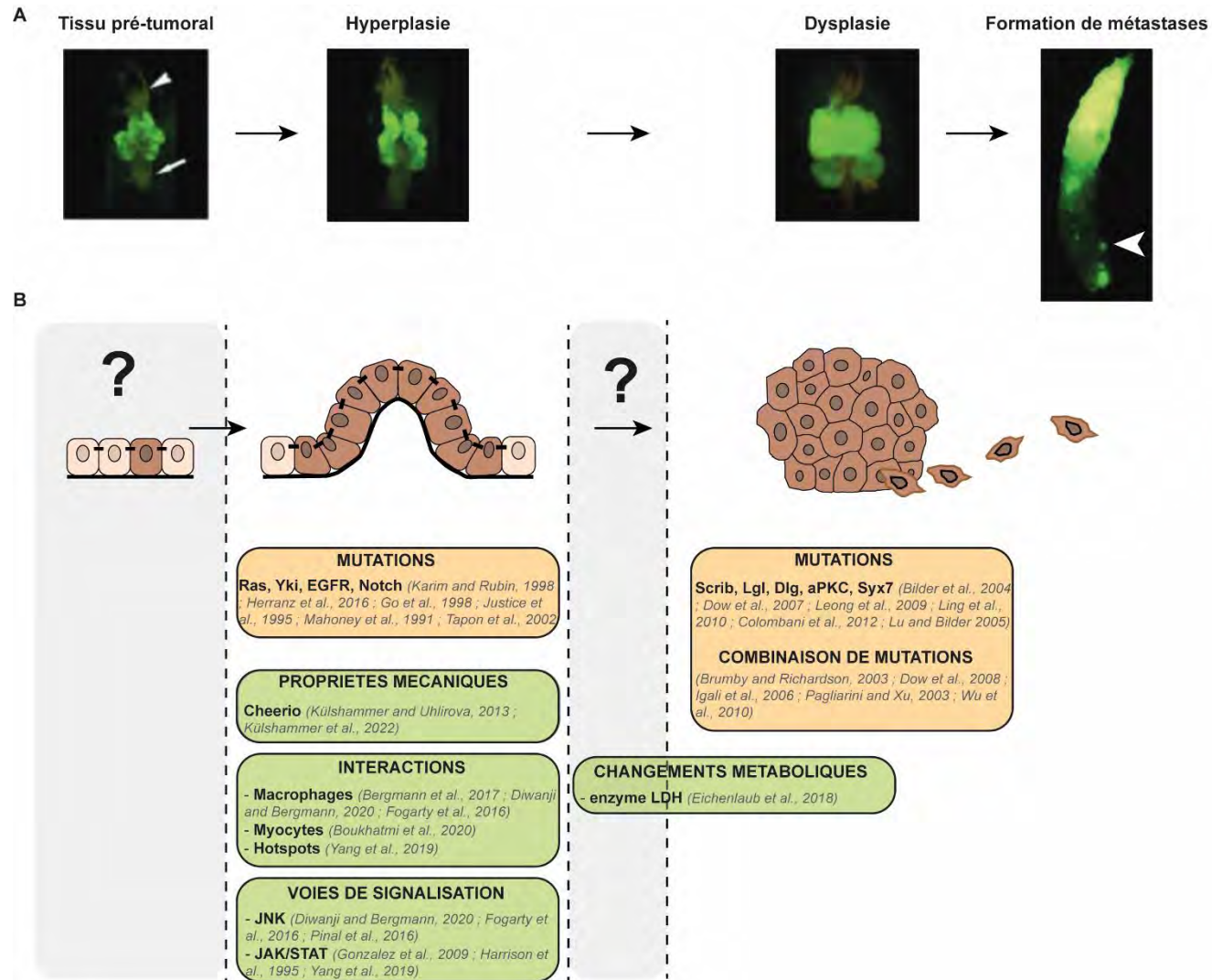
La cachexie est un symptôme particulièrement sévère associé à de nombreuses maladies dont le cancer fait partie. Il s'agit de la « fonte » des muscles et du tissu adipeux, causant ainsi une importante fatigue et un amaigrissement de l'individu, souvent associé à des stades avancés de cancers. Conséquence du développement



d'un cancer, la cachexie, en affaiblissant grandement l'individu, serait responsable de 20% des décès observés dans les cancers (Fearon et al., 2013).

Chez la drosophile, certains contextes génétiques permettent de reproduire ce phénomène de cachexie et plusieurs études ont d'ailleurs permis d'identifier des mécanismes qui en sont responsables. Par exemple, Figueroa-Clarevega et Bilder ont montré qu'une tumeur  $ras^{V12}/scrib^{-/-}$  transplantée dans l'abdomen d'une mouche sauvage induit la dégénérescence des ovaires et des muscles, et donc de la cachexie. Ils ont pu mettre en évidence que la tumeur transplantée induit la production de ImpL2 (homologue de IGFBP pour Insulin Growth Factor Binding Protein) qui modifie le programme métabolique de l'hôte en inhibant l'activité de l'insuline et la glycolyse et que cela induit la cachexie (Figueroa-Clarevega and Bilder, 2015). Une autre étude, réalisée en utilisant une forme active de Yorkie dans les cellules souches intestinales de la drosophile, a également mis en évidence le rôle de ImpL2 dans l'induction de la cachexie. Ils montrent qu'une déplétion de ImpL2 permet de sauver le phénotype associé à la cachexie (Kwon et al., 2015). Enfin, une étude plus récente a permis de montrer que des tumeurs  $Ras^{V12}/dlg^{RNAi}$  induites dans le disque imaginal d'aile induisent de la cachexie en libérant MMP1 qui induit la dégradation de la matrice extracellulaire du corps gras et des muscles (Lodge et al., 2021).

Ainsi nous avons vu dans cette partie que la drosophile est un excellent modèle permettant de reproduire de nombreux aspects de la tumorigénèse afin de les étudier dans un modèle plus simple que chez les mammifères. En Figure 29, je propose un bilan des données connues sur la tumorigénèse chez la drosophile. Un certain nombre de choses sont connues, même si la plupart du temps, ces études font référence à une augmentation de la prolifération des cellules tumorales. Si de nombreuses mutations ou combinaisons de mutations ont été identifiées comme responsables de la formation d'une tumeur dysplasique ou encore la formation de métastases, la plupart ciblent directement la machinerie de polarité apico-basale. En revanche, très peu de choses sont connues en ce qui concerne les mécanismes responsables de l'évolution progressive d'une tumeur hyperplasique en tumeur dysplasique, qui est pourtant une des étapes clés du développement tumoral.



**Figure 29 : Bilan des données connues sur la tumorigénèse chez la drosophile**

(A-B) Exemples (A) et représentation schématique de la progression tumorale chez la drosophile (B, haut). (B) Associés aux principales étapes sont mentionnées dans les cadres orange et verts respectivement les études en rapport avec le contexte génétique et celles reliées à l'impact de paramètres additionnels dans la tumorigénèse. Les points d'interrogation pointent les étapes peu voire non étudiées chez cet organisme modèle.

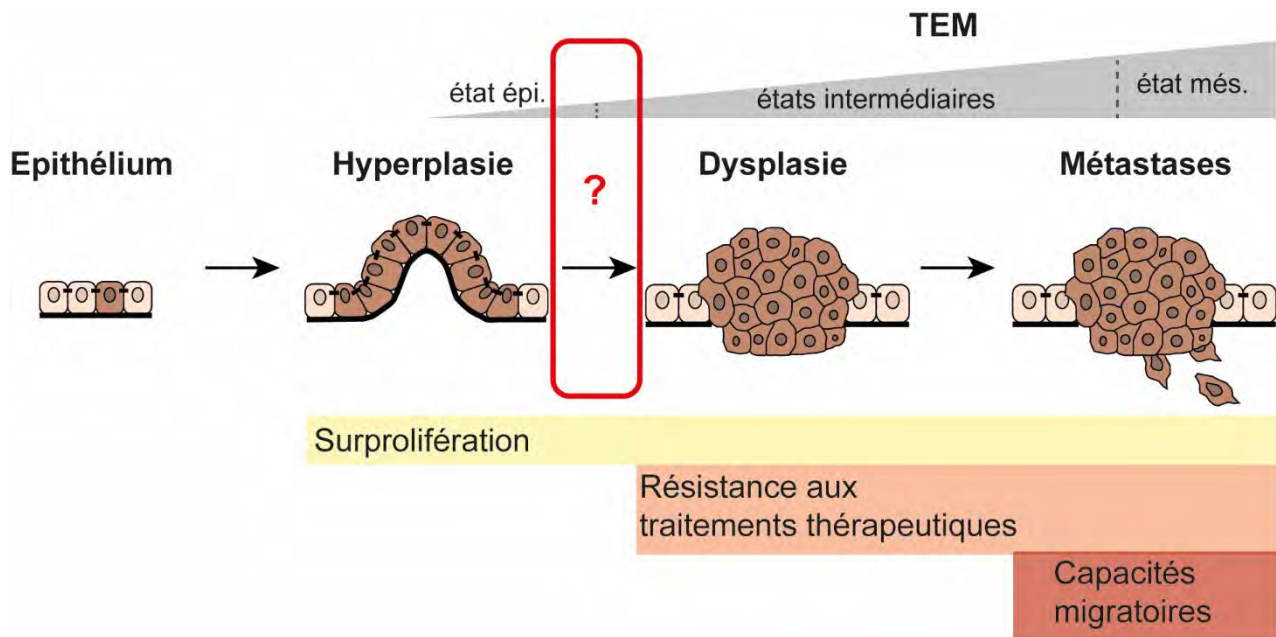
# Objectifs de la thèse

Le cancer est une pathologie qui représente la première cause de mortalité prématurée en France. Se développant souvent à partir de cellules épithéliales, les cancers, appelés carcinomes dans ce cas-là, se développent au travers de trois grandes étapes successives, de plus en plus agressives : l'hyperplasie, la dysplasie et la formation de métastases, chacune de ces étapes arborant des caractéristiques de plus en plus agressives (Figure 30). L'hyperplasie est le résultat d'une prolifération incontrôlée sans modification des propriétés épithéliales des cellules, tandis que la dysplasie et la formation de métastases sont des étapes dépendantes d'un processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Si la TEM a beaucoup été étudiée tardivement dans la progression tumorale, c'est-à-dire au moment de la formation des métastases, c'est en réalité un processus qui commence dès la formation de tumeurs dysplasiques lorsque les cellules commencent à perdre leurs caractéristiques épithéliales. Comprendre comment est régulée la TEM dans un contexte tumoral représente un enjeu crucial dans la lutte contre cette pathologie.

Si de nombreux facteurs biochimiques ont été identifiés comme responsables de la TEM dans un contexte tumoral, de plus en plus d'études montrent que l'environnement mécanique des tumeurs influence également grandement la progression tumorale. Néanmoins, le peu d'études réalisées *in vivo* et la contradiction de certains résultats obtenus montrent que ce domaine, bien que particulièrement prometteur, est difficile à étudier sur certains modèles.

La drosophile est aujourd'hui devenue l'un des modèles incontournables pour étudier la tumorigénèse et les différents facteurs qui l'influencent. Permettant de reproduire facilement des tumeurs hyperplasiques, dysplasiques ou encore des métastases, elle offre un large éventail d'outils permettant de moduler différents paramètres et de suivre l'évolution des tumeurs. Néanmoins, les études réalisées chez la drosophile, si elles sont fréquemment focalisées sur l'identification de mutations génétiques responsables de l'apparition de tumeurs, portent rarement sur la compréhension de l'évolution tumorale.

C'est pourquoi, au cours de ma thèse, en utilisant le modèle de la drosophile, j'ai étudié les mécanismes responsables de la transition entre une tumeur hyperplasique et une tumeur dysplasique. Pour cela, je me suis focalisée principalement sur les étapes précoces de la TEM, que j'ai caractérisée en rapport avec deux aspects encore peu étudiés sur le développement des tumeurs chez la drosophile : l'impact des propriétés mécaniques et l'importance de la mort cellulaire.



### Figure 30 : Objectifs de la thèse

Au cours de ma thèse je me suis focalisée sur la transition d'une tumeur hyperplasique vers une tumeur dysplasique, plus agressive, une transition dépendante du processus de TEM. Mon but a été d'étudier l'impact des propriétés mécaniques et de la mort cellulaire sur cette transition. épi : épithélial ; més : mésenchymateux



# RESULTATS



Le cancer est caractérisé par une prolifération incontrôlée de cellules anormales qui peuvent à terme coloniser d'autres organes. Si pour beaucoup, la progression tumorale est associée à la prolifération ou à la formation de métastases, une étape intermédiaire reste cruciale dans son développement : la transition hyperplasie/dysplasie. En effet, c'est au cours de cette phase que des cellules épithéliales vont changer d'état pour devenir plus mésenchymateuses *via* un processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Cette étape est cruciale puisque les cellules mésenchymateuses sont connues pour être plus résistantes aux traitements tels que la chimiothérapie par exemple et ce sont ces cellules qui permettent la formation de métastases (Shibue and Weinberg, 2017). Comprendre comment est régulée cette transition est donc un enjeu crucial dans le traitement des cancers.

Si le contrôle de la TEM par le microenvironnement commence à être caractérisé (libération de facteurs tels que TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ ), il émerge de plus en plus que l'environnement mécanique a également son importance dans le contrôle de la progression tumorale (Dongre and Weinberg, 2019). En effet, plusieurs études ont montré qu'une rigidité plus importante de la Matrice Extracellulaire (MEC) conduit à l'induction de la TEM sur des cellules en culture (Mekhdjian et al., 2017; Wei et al., 2015). Toutefois, il semblerait que les propriétés intrinsèques des cellules soient également importantes dans le contrôle de la TEM. En effet, des études ont montré l'importance du métabolisme dans le contrôle de la progression tumorale : Eichenlaub et al. ont montré qu'exprimer une enzyme métabolique, LDH, était suffisante pour induire la transition d'une tumeur hyperplasique en tumeur dysplasique et donc favoriser la progression tumorale (Eichenlaub et al., 2018).

Néanmoins, les propriétés intrinsèques des cellules tumorales permettant la TEM sont encore mal connues. Etant donné l'importance de ce mécanisme dans la progression tumorale, notre but a été d'identifier des facteurs intrinsèques, responsables de la TEM dans un contexte tumoral.

Pour cela, nous avons utilisé le modèle de la drosophile et particulièrement la zone précurseur du disque imaginal d'aile. Il s'agit d'un large épithélium monocouche, qu'il est facile de manipuler et d'imager.



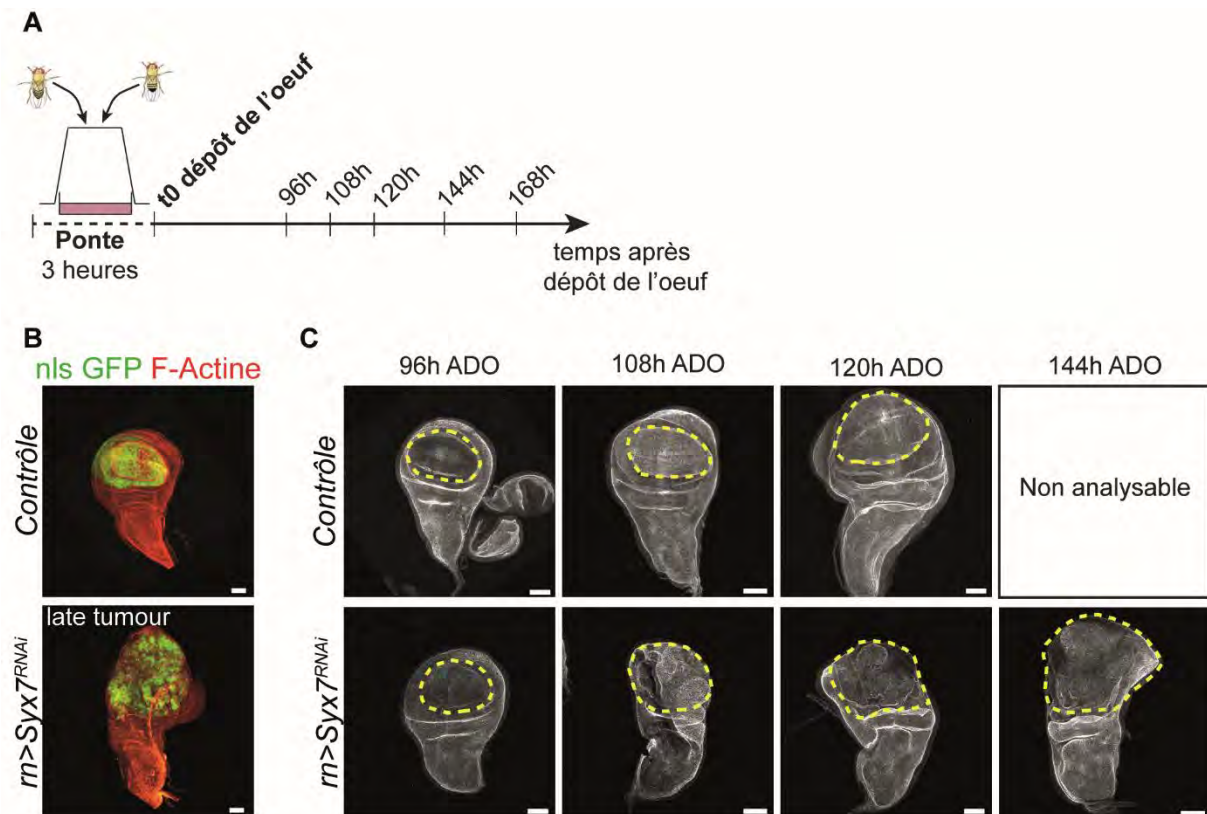
Je vais commencer par décrire dans une première partie les résultats qui ont permis l'identification de deux nouveaux facteurs intrinsèques contrôlant la TEM dans un contexte tumoral. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de soumission dont le manuscrit est en annexe. Dans une seconde partie, je vous présenterai des résultats complémentaires, issus d'une étude réalisée avec Maëva Sautron, étudiante en Master 1 que j'ai encadrée avec Bruno Monier et qui portait sur le rôle des Métalloprotéinases de la Matrice dans les tumeurs chez la drosophile.

# 1 Identification de deux nouveaux facteurs intrinsèques inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse chez la drosophile

## 1.1 Un modèle pour étudier l'évolution tumorale

Pour induire la formation de tumeurs, j'ai utilisé un contexte de diminution de la Syntaxine 7 ( $Syx7^{RNAi}$ ), aussi appelé Avalanche, connu comme perturbant la polarité apico-basale dans les cellules folliculaires (Lu and Bilder, 2005) et induisant la formation d'une tumeur dans la zone précurseur de l'aile (Andersen et al., 2015; Colombani et al., 2012). Une analyse détaillée de la progression des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , au niveau cellulaire et tissulaire étant manquante dans la littérature, j'ai commencé par caractériser l'évolution de ces tumeurs avec une résolution de 12/24 heures. Pour cela, ma méthodologie consiste à faire pondre les mouches pendant trois heures, puis transférer les embryons (sans les parents) dans un tube contenant du milieu nutritif. Je laisse alors se développer les individus à température contrôlée (ici 25°C) le temps indiqué « après dépôt de l'œuf » (ADO) (Figure 31A). Ce protocole me permet ainsi d'obtenir une résolution temporelle très précise et stéréotypée puisque toutes les tumeurs ont le même âge à 3 heures près pour un temps donné (Figure 31A). Au niveau tissulaire, les disques  $Syx7^{RNAi}$  sont similaires aux disques contrôle à 96h ADO (Figure 31B). Puis, ils grossissent rapidement pour être plus gros que les disques contrôle à 108h ADO avant d'adopter une morphologie plus ronde à 120h ADO (Figure 31C). A 120h ADO, les larves contrôle rentrent en métamorphose, arrêtant ainsi la prolifération. Toutefois, dans le contexte  $Syx7^{RNAi}$ , la métamorphose est bloquée (Colombani et al., 2012) permettant aux disques de continuer de croître jusqu'à former une grosse masse à 144h ADO (Figure 31C).

Pour caractériser de façon détaillée au niveau cellulaire la progression des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , j'ai utilisé une combinaison de différents marqueurs de l'organisation épithéliale : la présence de jonctions adhérentes (Ecad), de jonctions septées (Dlg), de jonctions cellule/matrice extracellulaire (MEC) (Taline, Rhea chez la drosophile et  $\beta$ -intégrine), des marqueurs de polarité apico-basale (Bazooka) ainsi qu'un marquage de la F-actine pour visualiser le cortex de la cellule.



### Figure 31 : Caractérisation au niveau tissulaire des tumeurs $Syx7^{RNAi}$ au cours du temps

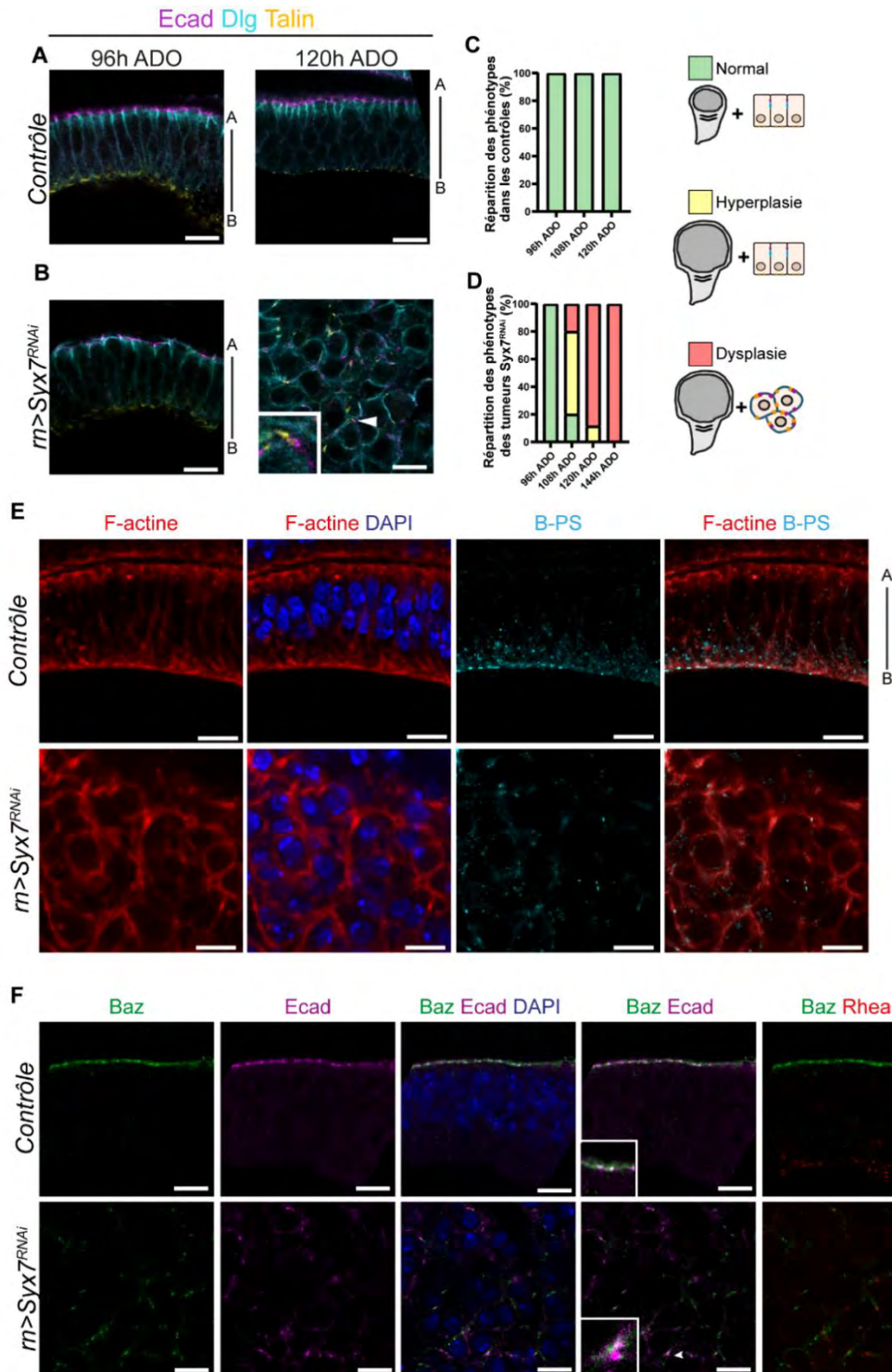
(A) Méthodologie de réalisation des pontes pour obtenir des tumeurs stadées. Les mouches sont mises dans un pondeur pendant 3 heures, puis les adultes sont enlevés et les embryons sont ensuite transférés dans un tube contenant du milieu nutritif puis mis à 25°C, ce qui correspond à t0. Les individus sont ensuite disséqués à différents temps après dépôt de l'œuf. (B) Vues générales de disques contrôle (haut) et de tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  (bas). La zone tumorale dans laquelle s'exprime le  $Syx7^{RNAi}$  exprime également un nls-GFP. (C) Vues générales de disques contrôle (haut) et de tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  (bas) pour différents temps après dépôt de l'œuf (ADO). A 120h ADO, la métamorphose est initiée dans le contrôle, ce qui entraîne un arrêt de la prolifération et induit des changements morphologiques drastiques du disque, empêchant la comparaison avec les disques tumoraux à partir de ce stade puisque chez eux la prolifération continue et les changements de morphologie tissulaire n'ont pas lieu. La zone entourée correspond à la zone précurseur de l'aile dans laquelle la tumeur est induite. Le nombre de disques analysés pour chaque contexte est le même qu'en figure 2. Barre d'échelle 50µm.

De façon intéressante, si toutes les cellules sont strictement épithéliales à 96h ADO dans le contexte  $Syx7^{RNAi}$  (Figure 32A, B), j'ai observé l'apparition de quelques tumeurs dysplasiques, contenant de petites zones de cellules quasi-mésenchymateuses à 108h ADO. A partir de 120h ADO, la plupart des tumeurs sont devenues dysplasiques et les zones mésenchymateuses sont nettement plus étendues (Figure 32A, B). Cette transition d'un état épithélial à un état quasi-mésenchymateux (que je nommerai mésenchymateux par la suite), qui est donc initiée à 108h ADO, se traduit par une perte de la forme colonnaire des cellules au profit d'une forme plus ronde qui s'accompagne d'une relocalisation de la F-actine autour du

cortex de la cellule (Figure 32E). J'ai également observé de petites accumulations voisines de Ecad et de Taline (Figure 32B, tête de flèche). Ces structures, normalement strictement apicales (Ecad) et basales (Taline) se trouvant à proximité (Figure 32A), cela témoigne d'une perturbation de la polarité apico-basale. En regardant la protéine Bazooka (Baz), j'ai constaté qu'il y avait effectivement une perte totale de la polarité apico-basale. Normalement localisée au niveau des jonctions adhérentes (Figure 32F), j'ai constaté que Baz, présente sous forme de petites accumulations tout autour du cortex des cellules, n'était plus parfaitement colocalisée avec Ecad (Figure 32F). Cela suggère donc que les petites accumulations de Ecad restant ne seraient plus complètement fonctionnelles.

*Ainsi, cette caractérisation détaillée m'a permis de voir que les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> sont d'abord épithéliales, puis que certaines deviennent partiellement mésenchymateuses à partir de 108h ADO (Figure 32C, D).*

Cette caractérisation temporelle détaillée est le point d'entrée pour l'identification de facteurs permettant la transition d'une tumeur hyperplasique vers une tumeur dysplasique, plus agressive. En effet, dans le cas des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, les premières tumeurs dysplasiques sont observées à 108h ADO. Des facteurs responsables de cette transition pourraient donc être présents ou modifiés avant cette transition et donc avant 108h ADO.



**Figure 32 : Caractérisation cellulaire des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>**

(A, B) zooms montrant l'organisation des tissus contrôle (A) et des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (B) à 96h après dépôt de l'œuf (ADO), avant la TEM et à 120h ADO après la TEM. Après la TEM, les cellules deviennent mésenchymateuses avec (1) une perte de la polarité apico-basale (révélé par Bazooka en F,  $\beta$ -PS en E), (2) une relocation de la F-actine autour du cortex des cellules après la TEM (E). J'ai également noté la présence de dots voisins de Ecad et de Taline, ce qui révèle une perte de polarité apico-basale (B, tête de flèche), (C, D) Histogrammes montrant la répartition des phénotypes au cours du temps pour des disques contrôle (C) et des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (D). La répartition a été faite en se basant sur la taille globale du tissu ainsi qu'en utilisant les différents marqueurs cellulaires présentés précédemment. (E, F) zooms montrant l'organisation des tissus contrôle (haut) et des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> avec différents marqueurs de l'organisation épithéliale. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m. Le nombre de disques analysés respectivement pour 96h, 108h, 120h, 140h est de 77, 22, 17 pour le contrôle (C) et de 46, 15, 26, 31 pour le contexte Syx7<sup>RNAi</sup> (D).

## 1.2 Des éléments du microenvironnement ou du métabolisme comme inducteurs de la TEM ?

Dans un premier temps, j'ai commencé par caractériser les éléments les plus décrits dans la littérature comme inducteurs de la TEM dans les tumeurs, c'est-à-dire les éléments du microenvironnement (Dongre and Weinberg, 2019). Tout d'abord, puisque nous avons utilisé le modèle de la zone précurseur de l'aile du disque imaginal d'aile, cela exclut toute interaction avec d'autres cellules. En effet, contrairement à la région du notum où (1) les trachées (le réseau de tubes qui délivrent directement l'oxygène aux tissus chez les insectes) contactent le disque d'aile (Tripathi and Irvine, 2022) et (2) les cellules adépithéliales, précurseurs des muscles, sont connues comme étant nécessaire au développement tumoral dans cette zone (Boukhatmi et al., 2020), la zone précurseur de l'aile ne présente pas d'interactions avec d'autres types cellulaires (Figure 33A). De plus, cette zone présente l'avantage d'être relativement homogène au niveau de l'expression du  $Syx7^{RNAi}$ . En effet, l'expression d'une GFP nucléaire concomitante à l'expression du  $Syx7^{RNAi}$  montre que toutes les cellules du domaine manipulé expriment les transgènes, ce qui permet donc d'éviter toute compétition cellulaire (Levayer and Moreno, 2013; Nagata and Igaki, 2018) (Figure 33B).

Je me suis ensuite intéressée aux cellules du système immunitaire qui jouent un rôle majeur dans les tumeurs mammifères (Dongre and Weinberg, 2019). Chez la drosophile, il est décrit que dans un modèle de tumeur induite dans le disque imaginal d'œil-antenne, les macrophages présents naturellement dans le disque, peuvent favoriser la prolifération cellulaire (Bergmann et al., 2017; Fogarty et al., 2016). J'ai donc regardé ce qu'il en était dans le contexte  $Syx7^{RNAi}$  induit dans le disque imaginal d'aile. S'il y a effectivement un recrutement de macrophages au niveau de la zone tumorale (Figure 33D), celui-ci ne se produit qu'une fois la TEM effectuée, lorsque les tumeurs sont déjà dysplasiques à 120h ADO (Figure 33D'), suggérant que les macrophages ne seraient pas à l'origine de cette transition.

Si le microenvironnement comprend des cellules comme les macrophages, il comprend également la matrice extracellulaire (MEC). En effet, le remodelage de la MEC a été associé à la TEM dans des contextes de cellules en culture (Mekhdjian et



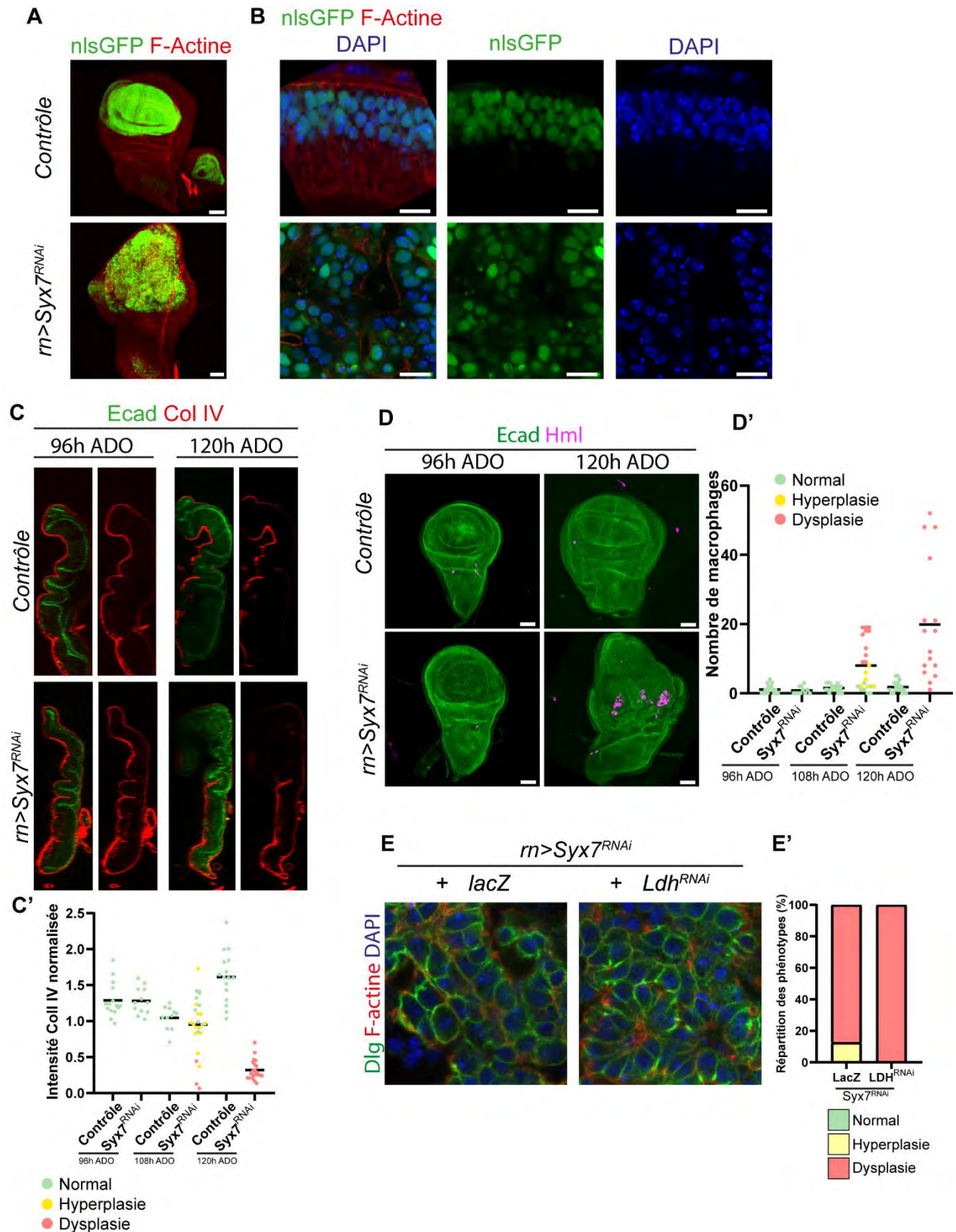
al., 2017; Wei et al., 2015). J'ai donc caractérisé la MEC dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> au cours du temps.

J'ai d'abord constaté qu'à 96h ADO la MEC est toujours présente mais qu'elle est dégradée à 120h ADO, après la TEM (Figure 33C). Néanmoins, pour vérifier que la MEC n'est pas modifiée à 96h ADO, j'ai mesuré l'intensité de fluorescence d'un des composants de la MEC, le collagène-IV (viking, vkg chez la drosophile) en utilisant une lignée knock-in RFP au cours du temps et en fonction du type de tumeur. Cela m'a permis de confirmer que la MEC n'est pas modifiée par rapport à un disque contrôle lorsque les cellules sont toujours épithéliales (Figure 33C', 96h ADO) mais qu'elle est dégradée lorsque la TEM a eu lieu et que les tumeurs sont devenues dysplasiques (Figure 33C'). Ainsi, il semblerait que la dégradation de la MEC soit plutôt une conséquence qu'une cause de la TEM.

Dans un second temps, je me suis également intéressée au rôle potentiel du métabolisme. En effet, Eichenlaub et al ont montré que surexprimer l'enzyme LDH (lactate deshydrogénase) dans des tumeurs EGFR chez la drosophile, normalement épithéliales, permet d'induire la TEM. De plus, ils ont également montré que dans des tumeurs EGFR + psqk<sup>RNAi</sup>, normalement dysplasiques, l'inhibition de LDH est suffisante pour bloquer la TEM (Eichenlaub et al., 2018). Néanmoins, dans notre contexte, l'inhibition de LDH, en utilisant le même outil qu'Eichenlaub et al., n'influence pas l'évolution des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (Figure 33E, E'). En effet, toutes les tumeurs Syx7 analysées en absence de LDH présentent des zones désorganisées avec des cellules de type mésenchymateux, similaires aux zones mésenchymateuses observées dans les tumeurs Syx7 non manipulées.

**Figure 33 : Le microenvironnement et le métabolisme n'ont pas d'effet sur l'induction de la TEM associée à la progression des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>**

(A) Vues générales d'un disque contrôle (haut) et Syx7<sup>RNAi</sup> (bas) qui exprime un nls-GFP (B) Zooms de la zone précurseur de l'aile des images prises en (A). On observe que toutes les cellules sont bien nls-GFP, montrant qu'il n'y a pas d'hétérogénéité. (C) Coupes sagittales de disques contrôle et Syx7<sup>RNAi</sup> avec Ecad (anticorps) et Collagène IV (lignée knock-in RFP). (C') Quantification de l'intensité de fluorescence de la MEC dans des disques contrôle et Syx7<sup>RNAi</sup> au cours du temps en fonction du phénotype de la tumeur. Comme observé sur les coupes sagittales, la matrice n'est pas modifiée à 96h ADO, avant la TEM mais elle est dégradée après la TEM. Le nombre de disques analysés pour la condition contrôle et Syx7<sup>RNAi</sup> respectivement : 15 et 12 à 96h ADO, 11 et 25 à 108h ADO, 16 et 22 à 120h ADO. (D-D') Caractérisation du recrutement des macrophages. (D) Vues générales de disques contrôle et de tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> à 96h ADO, avant la TEM et à 120h ADO, après la TEM. (D') Quantification du nombre de macrophages recrutés au cours du temps en fonction du type de la tumeur. On observe que les macrophages sont recrutés une fois que la TEM a eu lieu. Le nombre de disques analysés dans la condition contrôle et Syx7<sup>RNAi</sup> respectivement est de 20 et 11 à 96h ADO, 19 et 23 à 108h ADO et 18 et 16 à 120h ADO (E) Zoom d'une tumeur Syx7<sup>RNAi</sup> sans (+LacZ) et avec modification



du métabolisme via l'inactivation de l'enzyme LDH (+*Ldh<sup>RNAi</sup>*). Le marquage des jonctions septées (Dlg) et de la F-actine nous permettent de classer les phénotypes observés et d'obtenir l'histogramme en (E'). (E') Histogramme de répartition des phénotypes avec et sans modification du métabolisme. On observe que dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* l'inactivation de LDH n'a pas d'effet sur la TEM. Nombre de disques analysés : LacZ, n=8 et *Ldh<sup>RNAi</sup>*, n=9. Barre d'échelle (A), (D) 50µm et (B) 10µm.

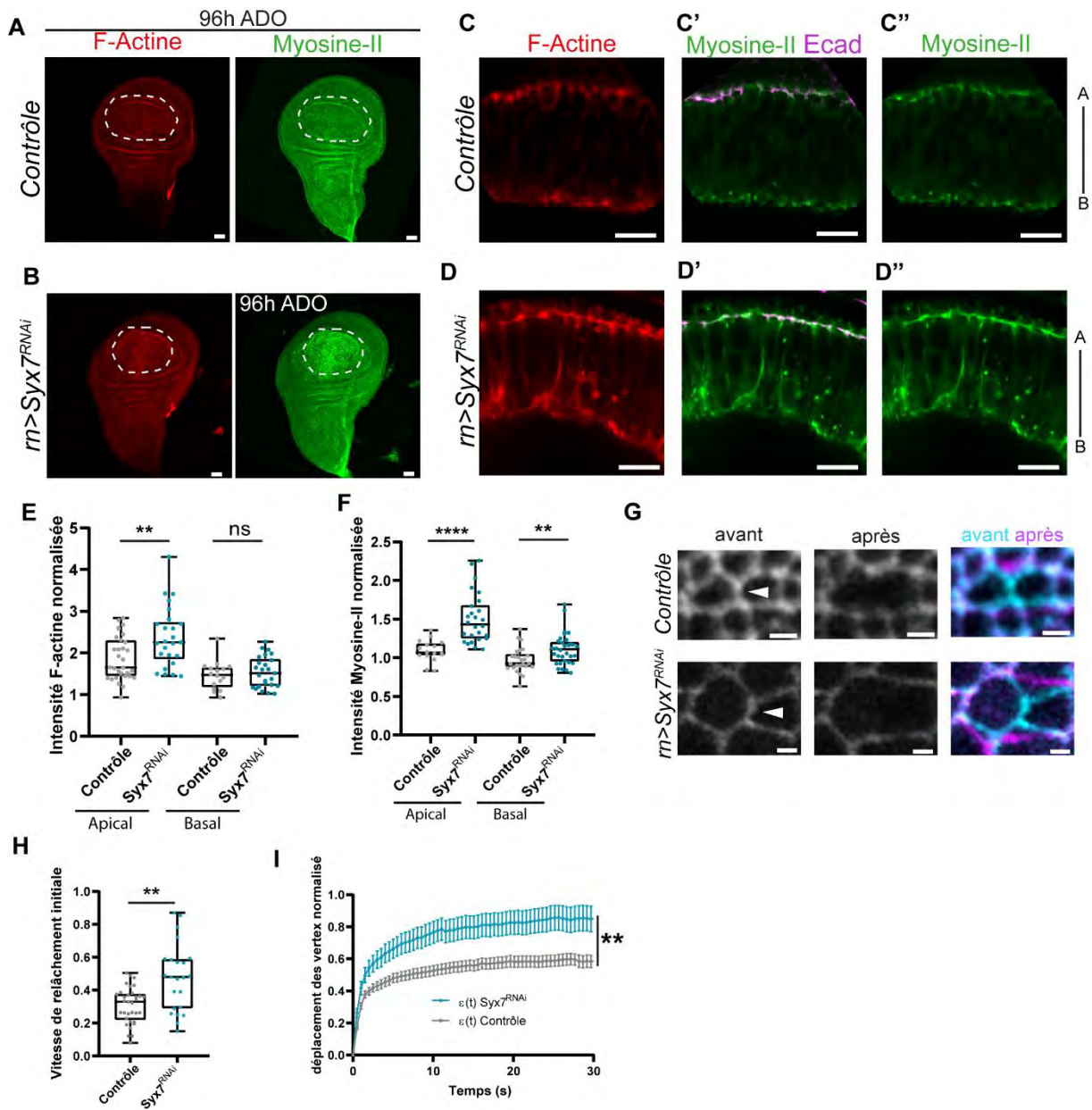


*Ainsi, ni les éléments du microenvironnement, comme les macrophages et la MEC, ni le métabolisme ne semblent jouer un rôle majeur dans l'induction de la TEM associée à la progression des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>.*

### 1.3 Vers une modification des propriétés mécaniques du tissu

Puisque les facteurs connus comme induisant la TEM dans un contexte tumoral ne semblent pas impliqués, je me suis intéressée à la caractérisation des propriétés intrinsèques des cellules tumorales et notamment aux propriétés mécaniques de ces cellules. En effet, j'ai remarqué la présence inattendue d'une forte accumulation de F-actine dans toute la zone précurseur de l'aile du contexte Syx7<sup>RNAi</sup> par rapport à un disque contrôle à 96h ADO (Figure 34A), suggérant ainsi une modification des propriétés mécaniques du tissu. Aussi, pour tester cela, j'ai regardé la répartition de Myosine-II dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et, comme pour la F-actine, j'ai observé une forte accumulation dans la zone précurseur de l'aile (Figure 34A). Par la suite, en analysant la répartition de la F-actine et de la Myosine-II au niveau subcellulaire, j'ai constaté que la F-actine et la Myosine-II était principalement accumulées au niveau des jonctions adhérentes (Figure 34C-F). Si j'ai également constaté une légère accumulation de Myosine-II au niveau basal de l'épithélium d'environ 15% (Figure 34F), je me suis néanmoins concentrée sur l'accumulation au niveau des jonctions adhérentes, nettement plus importante (environ 45%) (Figure 34F).

Pour tester si cette augmentation d'actomyosine modifie les propriétés mécaniques au niveau des jonctions adhérentes, j'ai réalisé de l'ablation laser sur la lignée Knock-in Ecad-GFP dans des disques contrôles et dans des disques Syx7<sup>RNAi</sup> à 96h ADO (Figure 34G-I). De façon intéressante, la vitesse initiale ainsi que l'amplitude du relâchement des vertex après ablation étaient nettement plus importantes dans les disques Syx7<sup>RNAi</sup> par rapport aux disques contrôles (Figure 34H-I), témoignant d'une modification des propriétés physiques des jonctions adhérentes dans les disques Syx7<sup>RNAi</sup>.



### Figure 34 : Une augmentation de la tension jonctionnelle précède la TEM dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>*

(A) Vues générales de disques contrôle (A) et *Syx7<sup>RNAi</sup>* (B) marqués pour la F-actine (phalloïdine) et exprimant Myosine-II-GFP endogène à 96h ADO. (C-C'', D-D'') zooms des images prises en (A) qui permettent de visualiser l'accumulation de F-actine (D) et de Myosine-II au niveau des jonctions adhérentes (D', D'') dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* par rapport aux disques contrôle (C-C''). (E-F) Quantifications de la F-actine et de la Myosine-II au niveau apical et basal dans des disques contrôle (gris) et des disques *Syx7<sup>RNAi</sup>* (bleu). Le nombre de disques analysés pour la condition contrôle et *Syx7<sup>RNAi</sup>* est respectivement de 31 et 25 en apical et 16 et 25 en basal pour la F-actine (E), 40 et 32 en apical et 25 et 32 en basal pour la Myosine-II (F), (G-I) Analyses par ablation laser des propriétés mécaniques des tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>*. (G) Exemples d'images obtenues avant et après ablation laser sur les jonctions adhérentes. (H) Quantification de la vitesse initiale après ablation laser dans des disques contrôle (gris) et *Syx7<sup>RNAi</sup>* (bleu). (I) Courbes de relâchement des vertex après ablation dans les mêmes contextes génétiques. Le nombre de disques analysés pour la condition contrôle et *Syx7<sup>RNAi</sup>* respectivement 33 et 23 pour la vitesse initiale (H) et 33 et 29 pour l'amplitude de relâchement des vertex (I). Barre d'échelle A 50µm, C-D'' 10µm, G 2µm. Test statistique E, F basal, I T-test ; F apical, H Mann-Whitney, \*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001, ns non significatif.

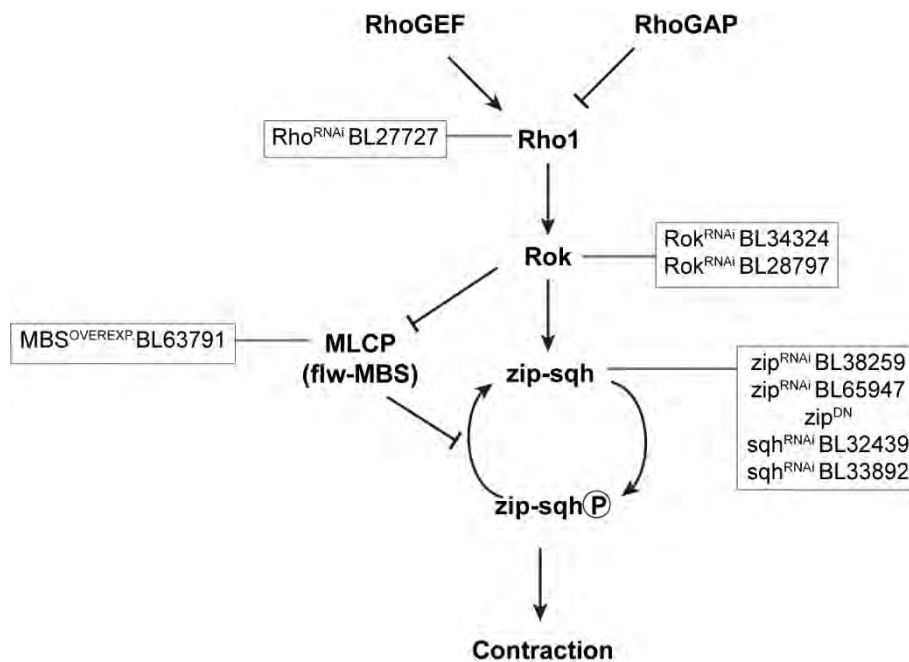
*Ainsi, j'ai pu montrer que les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> présentaient une augmentation d'actomyosine associée à une augmentation de tension spécifiquement au niveau des jonctions adhérentes, par rapport à un disque contrôle et que cette augmentation précédait le changement d'état épithélial vers un état mésenchymateux.*

#### 1.4 Est-ce que cette augmentation de tension jonctionnelle joue un rôle sur la progression tumorale ?

Par la suite, j'ai voulu tester le rôle de cette augmentation de tension jonctionnelle sur l'évolution des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>. Pour cela, j'ai cherché à diminuer cette tension jonctionnelle et voir si cela affectait la TEM observée dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>.

##### 1.4.1 Stratégies pour diminuer la tension jonctionnelle

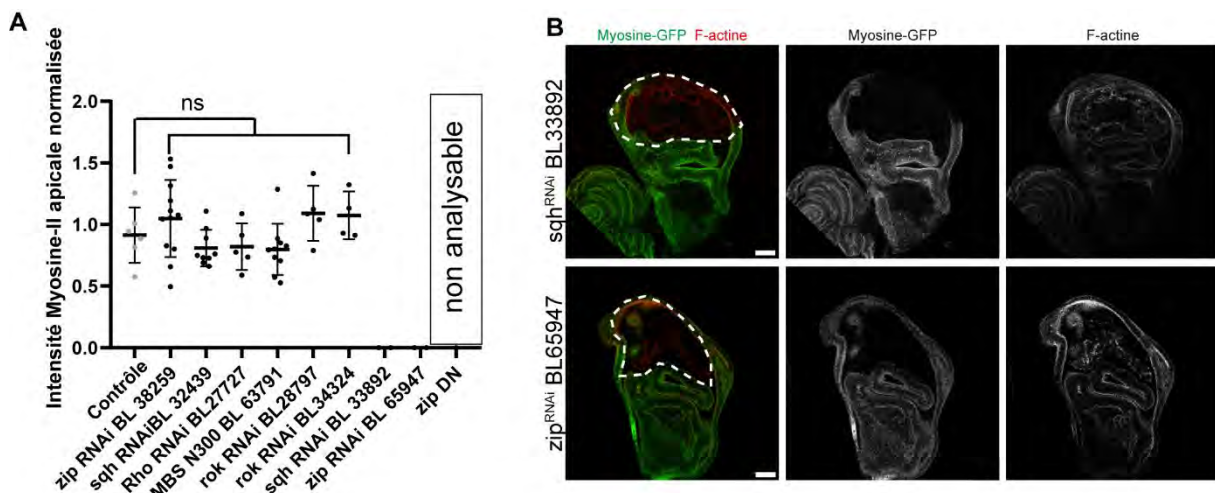
Pour diminuer la tension jonctionnelle, j'ai d'abord testé un certain nombre d'outils dans un disque développemental contrôle pour voir leur efficacité. Ces outils ont pour but d'affecter différents composants de la cascade de régulation de la Myosine-II : Rho<sup>RNAi</sup>, ROK<sup>RNAi</sup>, zip<sup>RNAi</sup>, sqh<sup>RNAi</sup>, MBS-N300<sup>surexpression</sup>, zip<sup>DN</sup> (Figure 35).



**Figure 35 : Cascade de régulation de la Myosine-II**  
Sont indiqués sur la cascade les différents outils testés pour inhiber la Myosine-II.

Le but ici était d'identifier un outil permettant une déplétion partielle de la Myosine-II, sans pour autant que cela affecte la division cellulaire ou l'intégrité du tissu. Parmi les différents outils testés, j'ai constaté qu'il y avait deux catégories : les outils qui ne donnaient pas de diminution significative de la Myosine-II (Figure 36A) et ceux qui au contraire montraient une très forte déplétion de la Myosine-II dans la zone précurseur de l'aile (Figure 36A, B). Je n'ai pas pu quantifier la Myosine-II dans le cas de l'outil zip<sup>DN</sup> car étant fusionné à la GFP qui forme des agrégats, je n'ai pas pu visualiser la myosine-GFP endogène (Figure 36A, « non analysable »).

Parmi les outils testés, je n'ai donc pas réussi à identifier celui permettant une déplétion partielle de la Myosine-II : soit il n'y avait pas d'effet, soit la déplétion était complète.



**Figure 36 : Stratégies pour diminuer la tension jonctionnelle**

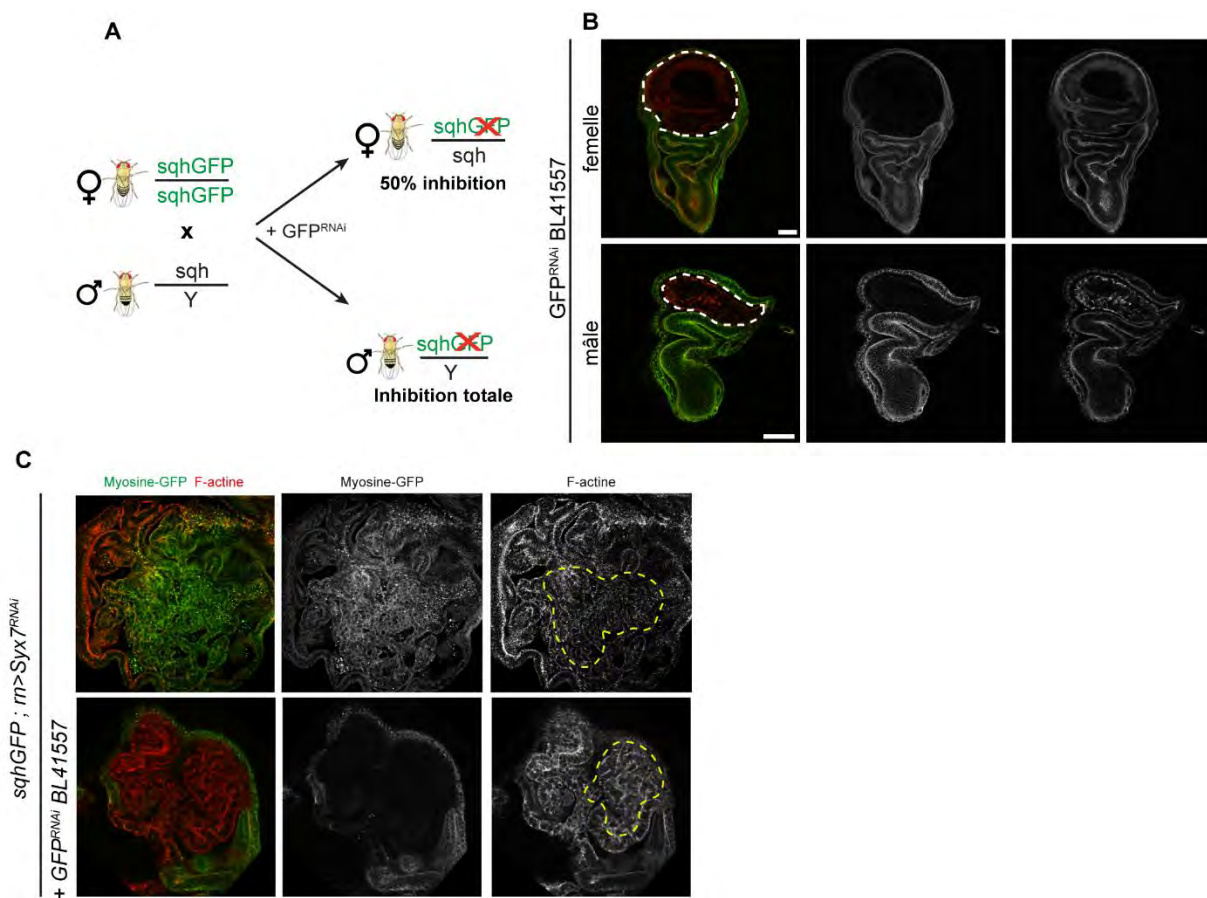
(A) Quantification (n>4 pour chaque condition) des niveaux de Myosine-II apicale pour les différents outils testés pour diminuer la tension jonctionnelle. On distingue deux catégories : les RNAi qui n'ont pas d'effet sur la Myosine-II apicale et deux RNAi sqh<sup>RNAi33892</sup> et zip<sup>RNAi65947</sup> qui sont très efficaces et permettent une déplétion totale. Ces contextes sont montrés en (B). (B) Coupe de disques d'aile qui expriment le sqh<sup>RNAi33892</sup> (haut) ou le zip<sup>RNAi65947</sup>. La zone entourée délimite la zone dans laquelle les RNAi sont exprimés. On observe une très forte déplétion de la Myosine-II. Barre d'échelle 50µm.

#### 1.4.2 Une stratégie alternative : induire la dégradation de la Myosine-II

Les RNAi dirigés contre les différents composants de la cascade de régulation de la Myosine-II testés n'ayant pas permis d'induire une diminution contrôlée et raisonnable de la tension jonctionnelle, j'ai donc par la suite adopté une stratégie différente : l'utilisation d'un GFP<sup>RNAi</sup> dans un contexte endogène Myosine-II-GFP. Ce RNAi permet une dégradation de la GFP et en l'utilisant dans un contexte Myosine-II-GFP, il permet une dégradation de la Myosine-II associée à la GFP. Chez la drosophile, le gène codant pour la chaîne régulatrice de la Myosine (*spaghetti squash*, *sqh*) est localisé



sur le chromosome X. Les femelles ont donc deux copies de ce gène tandis que les mâles n'en ont qu'une. Avec la stratégie utilisée, détaillée en Figure 37A, les femelles n'ont qu'une copie de sqh-GFP dégradée, ce qui n'altère pas l'intégrité du tissu tandis que chez les mâles, la totalité de sqh-GFP est dégradée, conduisant ainsi à une perte d'intégrité du tissu (Figure 37B). Sur cette expérience, en utilisant uniquement les individus femelles, on obtient donc en théorie une diminution de 50% de la Myosine-II et ce, sans affecter l'intégrité du tissu, c'est pourquoi je me suis focalisée uniquement sur les femelles dans les expériences suivantes.



**Figure 37 : Le GFP<sup>RNAi</sup> permet d'induire la dégradation de 50% de la Myosine-II**  
 (A) Stratégie utilisée pour l'utilisation du GFP<sup>RNAi</sup>. (B) Coupe sur des disques issus des croisements présentés en (A). Dans ces expériences, on ne gardera que les individus femelles qui montrent une dégradation de 50% de Myosine-II. (C) Zooms de tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> contrôle (haut) et avec un GFP<sup>RNAi</sup> (bas). La zone délimitée montre des zones néoplasiques dans les deux contextes. Barre d'échelle B, 50µm et C, 10µm.

En utilisant ce GFP<sup>RNAi</sup> dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, j'ai pu constater que, comme dans un disque développemental, la déplétion de la Myosine-II-GFP était particulièrement efficace (Figure 37C). De plus, j'ai également constaté la présence de cellules mésenchymateuses, comme dans un disque Syx7<sup>RNAi</sup> contrôle (Figure 37C), semblant

indiquer que la déplétion de Myosine-II-GFP n'a pas d'impact sur la TEM associée à la progression tumorale. Néanmoins, il est difficile de conclure sur cette expérience. En effet, en ne regardant le phénotype tumoral qu'à un moment donné et de façon non stadée, je n'ai pas réellement pu observer si cela affectait la progression tumorale. Il est tout à fait possible qu'en déplaçant 50% de la Myosine-II-GFP, la TEM permettant la progression tumorale soit plus tardive. Il serait donc intéressant de refaire cette expérience en réalisant une cinétique de développement complète afin de voir si la TEM est retardée ou non.

## 1.5 Augmenter la tension jonctionnelle

Diminuer la tension jonctionnelle dans un contexte *Syx7<sup>RNAi</sup>* s'est révélé particulièrement difficile et malgré les différentes stratégies testées, aucune n'a permis d'obtenir des résultats concluants. C'est pourquoi, j'ai ensuite essayé de réaliser l'expérience inverse, c'est-à-dire d'augmenter la contractilité au niveau des jonctions adhérentes dans un contexte de prolifération cellulaire et de voir si cela est suffisant pour induire la TEM.

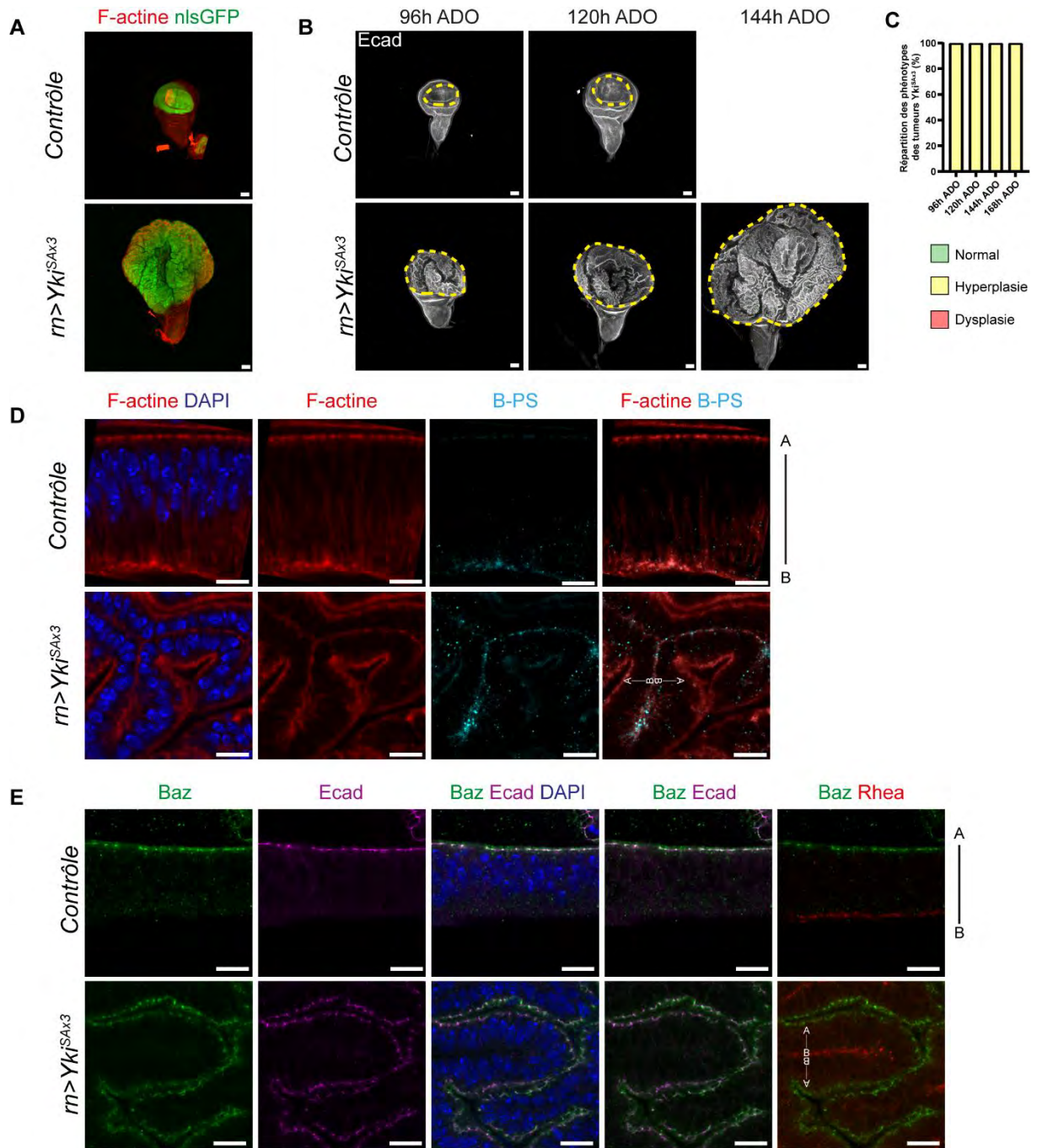
### 1.5.1 *Yorkie, un contexte tumoral strictement épithélial chez la drosophile*

Pour cela, l'idée a d'abord été de caractériser un contexte tumoral dont les cellules sont strictement épithéliales et n'évoluent pas en cellules mésenchymateuses. Nous avons choisi le contexte Yorkie (Yki). Yki est un facteur de transcription impliqué dans la voie Hippo et responsable de la prolifération cellulaire (Oh and Irvine, 2010). Si chez les mammifères, l'homologue de Yki, YAP, a été décrit comme associé à la formation de tumeurs dysplasiques (Dong et al., 2007), chez la drosophile, la surexpression de Yki est plutôt associée à la formation de tumeurs épithéliales (Herranz et al., 2016). Néanmoins, puisque mon objectif va être de voir s'il est possible d'induire la TEM en augmentant la contractilité jonctionnelle, j'ai d'abord caractérisé le contexte Yki en détails afin d'être sûre que les tumeurs induites sont strictement épithéliales. Pour cela, j'ai utilisé une forme mutée de Yki (*Yki<sup>Sax3</sup>*) (Oh and Irvine, 2009). Cette forme mutée présente trois substitutions de Sérine en Alanine, activant Yki de manière constitutive. En l'utilisant dans le disque d'aile, j'ai observé la formation de grosses tumeurs (Figure 38A). Par la suite, j'ai réalisé une cinétique de développement et j'ai constaté que les tumeurs se développent rapidement puisqu'à 96h ADO, les disques *Yki<sup>Sax3</sup>* sont déjà plus gros que les disques contrôle (Figure 38B). De plus, tout comme le contexte

Syx7<sup>RNAi</sup>, le contexte Yki<sup>SAX3</sup> bloque la métamorphose, offrant ainsi une extension de la période de croissance (Figure 38B).

En utilisant les marqueurs épithéliaux utilisés précédemment, j'ai pu constater que les localisations de la Ecadhérine, des Intégrines ( $\beta$ PS) et de la Taline (Rhea) n'étaient pas altérées suite à la surexpression de la forme mutée de Yki (Figure 38D). De plus, j'ai constaté que la protéine Bazooka était toujours parfaitement colocalisée avec Ecad, montrant que la polarité apico-basale n'est pas affectée (Figure 38E). Ainsi, si la surexpression de Yki<sup>SAX3</sup> induit une très forte prolifération cellulaire et la formation de circonvolutions, cela ne perturbe absolument pas l'état épithélial et les tumeurs restent strictement hyperplasiques au cours du temps (Figure 38C).

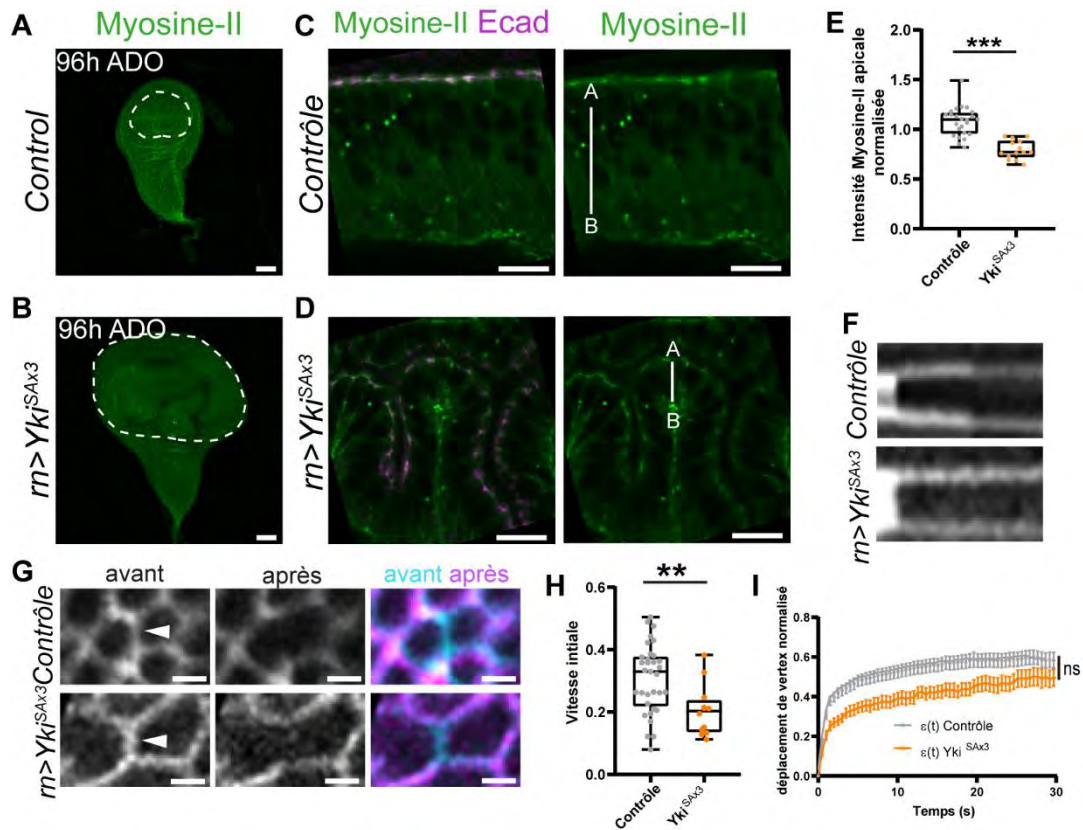
Néanmoins, si les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> restent strictement épithéliales au cours du temps, j'ai par la suite caractérisé l'état mécanique au niveau des jonctions adhérentes dans ce contexte. En regardant de façon générale et contrairement au contexte Syx7<sup>RNAi</sup>, je n'ai pas observé d'accumulation de Myosine-II dans la zone précurseur de l'aile (Figure 39A, B) et la quantification de la Myosine-II apicale a montré que les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> présentaient des niveaux inférieurs par rapport aux disques contrôle (Figure 39C-E). Au niveau mécanique, cela se traduit par une diminution de la vitesse de relâchement initial après ablation (Figure 39H) et une absence de différence au niveau du déplacement de vertex après ablation (Figure 39I). Ainsi, de façon cohérente avec la légère diminution de Myosine-II aux jonctions adhérentes, celles-ci sont un peu moins sous tension que dans un disque contrôle (Figure 39F-I). Yki<sup>SAX3</sup> est donc le contexte parfait pour tester si l'augmentation de tension jonctionnelle a un impact sur la progression tumorale.



### Figure 38 : Caractérisation cellulaire et tissulaire des tumeurs $Yki^{SAX3}$

(A) Vues générales de disques contrôle et  $Yki^{SAX3}$  exprimant un nlsGFP permettant de visualiser la taille de la tumeur. (B) Vues générales de disques contrôle et  $Yki^{SAX3}$  au cours du temps en heures après dépôt de l'œuf (ADO). La zone précurseur de l'aile dans laquelle la tumeur se forme est délimitée en jaune. (C) Répartition des phénotypes des tumeurs  $Yki^{SAX3}$  au cours du temps. La répartition a été faite en se basant sur la taille globale de la tumeur ainsi que sur la caractérisation cellulaire faite grâce aux marqueurs en (D, E). (D-E) Caractérisation cellulaire des disques  $Yki^{SAX3}$ . L'ensemble de ces marqueurs permet de voir que malgré une prolifération importante et la formation de circonvolutions, les tumeurs restent strictement hyperplasiques. Le nombre de disques analysés à 96h, 108h, 120h, 144h, 168h est respectivement de 47, 43, 18, 12. Barre d'échelle A, B : 50 $\mu$ m ; D, E : 10 $\mu$ m





**Figure 39 : Les tumeurs  $Yki^{SAX3}$  ne présentent pas de modifications des propriétés mécaniques aux jonctions adhérentes**

(A, B) Vues générales d'un disque contrôle (A) et d'un disque  $Yki^{SAX3}$  (B) exprimant la Myosine-II-GFP endogène à 96h ADO. La zone précurseur de l'aile est entourée. (C, D) Zooms des images prises respectivement en (A, B). Ces images permettent de voir qu'il n'y a pas d'accumulation de Myosine-II au niveau jonctionnel. (E) Quantification de la Myosine-II apicale dans une condition contrôle (gris,  $n=24$ ) et  $Yki^{SAX3}$  (orange,  $n=14$ ). (F-I) Caractérisation par ablation laser des propriétés mécaniques des tumeurs  $Yki^{SAX3}$ . (F) Kymographes obtenus après ablation laser pour la condition contrôle et  $Yki^{SAX3}$ . (G) Exemples d'images obtenues avant (cyan) et après (magenta) ablation laser pour un disque contrôle (haut) et  $Yki^{SAX3}$  (bas) (H) Boxplots représentant la vitesse initiale après ablation pour des disques contrôle (gris,  $n=33$ ) et  $Yki^{SAX3}$  (orange,  $n=12$ ). (I) Relâchement des vertex après ablation pour les mêmes contextes génétiques. Barre d'échelle : (A, B)  $50\mu m$  ; (C, D)  $10\mu m$  ; F  $2\mu m$ . Test statistique (E) T-test, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns non significatif.

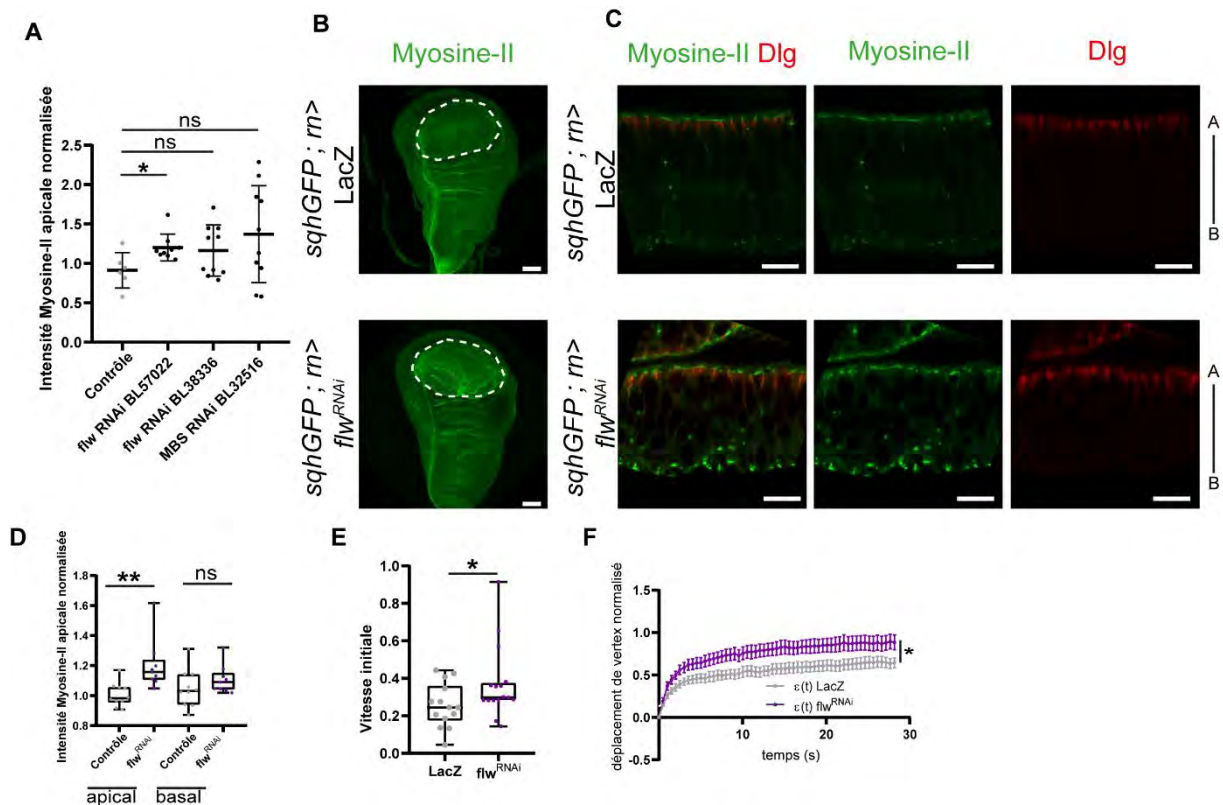
### 1.5.2 Stratégies pour augmenter la tension jonctionnelle

Pour augmenter la tension jonctionnelle, j'ai opté pour deux stratégies différentes, que j'ai d'abord testées dans des disques développementaux contrôle afin de vérifier que l'intégrité du tissu n'était pas perturbée.

#### 1.5.2.1 Perturbation de la régulation de la Myosine-II

Dans un premier temps, je me suis particulièrement intéressée aux phosphatases qui permettent normalement de limiter l'activation de la Myosine-II, en déphosphorylant la chaîne régulatrice (spaghetti squash (sqh) chez la drosophile) (Figure 35) et j'ai testé différents RNAi dirigés contre ces phosphatases (Figure 40A, B). Le seul RNAi qui s'est révélé efficace est le  $flw^{RNAiBL57022}$ , c'est donc sur ce RNAi que je me suis

concentrée par la suite. J'ai caractérisé au niveau subcellulaire l'effet du RNAi  $flw^{RNAiBL57022}$  sur la distribution de la Myosine-II. J'ai observé une accumulation apicale au niveau des jonctions adhérentes (Figure 40C), qui se traduit environ par 20% d'augmentation (Figure 40D). Si au niveau basal, l'intensité de Myosine-II peut paraître augmentée dans certains cas (Figure 40C), les quantifications montrent que ce n'est pas significativement différent d'un contrôle (Figure 40D). Cela suggère que le  $flw^{RNAiBL57022}$  (par la suite appelé  $flw^{RNAi}$ ) augmente essentiellement le pool apical de Myosine-II.



### Figure 40 : Le $flw^{RNAi}$ permet d'augmenter la Myosine-II aux jonctions adhérentes et induire une augmentation de tension jonctionnelle

(A) Quantifications de la Myosine-II apicale suite à l'utilisation de différents outils testés pour augmenter la tension jonctionnelle. Le nombre de disques analysés, pour les différentes conditions de gauche à droite est de 6, 9, 10, 10 (B) Vues générales de disques contrôle (haut) et  $flw^{RNAiBL57022}$  (bas). La zone précurseur de l'aile en délimitée en pointillés (C) Zooms des images prises en (A). On peut voir l'augmentation apicale de Myosine-II dans le  $flw^{RNAi}$  par rapport au contrôle, sans perturbation de la polarité apico-basale, révélée par le marquage Dlg. (D) Quantifications au niveau apical et basal de la Myosine-II en condition contrôle (gris, n=10) et  $flw^{RNAi}$  (violet, n=9). (E-F) Analyse par ablation laser des propriétés mécaniques des disques contrôle (gris) et  $flw^{RNAi}$  (violet). (E) Boxplot de la vitesse initiale des contextes cités précédemment. (F) Relâchement des vertex après ablation pour les mêmes contextes. Le nombre de disques analysés pour les conditions LacZ et  $flw^{RNAi}$  est 15 et 16 (E) et 14 et 16 (F) Barre d'échelle B 50 $\mu$ m, C 10 $\mu$ m. Test statistique (A, E) Mann-Whitney (D-F) t-test. \*<0.05, \*\*<0.01, ns non-significatif.

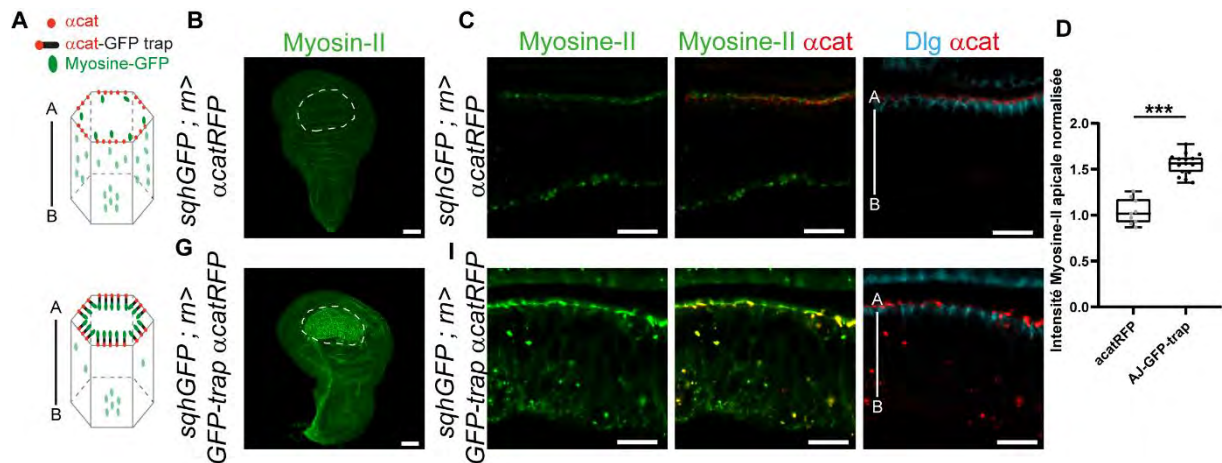
De façon intéressante, cette augmentation de Myosine-II ne perturbe pas la polarité apico-basale comme en témoigne le marquage des jonctions septées (Dlg) qui n'est pas altéré (Figure 40C). Par la suite, j'ai testé ce qu'il en était des propriétés mécaniques par ablation laser. Les résultats sont cohérents avec l'augmentation de Myosine-II observée puisque la vitesse initiale ainsi que l'amplitude du relâchement des vertex sont un peu plus élevées dans un contexte  $flw^{RNAi}$  par rapport à un disque contrôle (Figure 40E, F).

***Ainsi, cet outil permet d'augmenter modérément, mais spécifiquement, la Myosine-II et la tension associée aux jonctions adhérentes.***

#### *1.5.2.2 Relocalisation de la Myosine-II*

En parallèle, j'ai également utilisé une construction initialement développée par le laboratoire d'Emmanuel Caussinus et qui est basée sur l'utilisation d'un anticorps anti-GFP qui permet de « capturer » la GFP (Harmansa et al., 2017). Par la suite, Emmanuel Martin, ancien post-doctorant dans l'équipe, a modifié cette construction afin de la coupler à l' $\alpha$ -caténine permettant ainsi de recruter la GFP spécifiquement au niveau des jonctions adhérentes (ci-après appelée AJ-GFP-trap) (Figure 41A). Il l'a également couplée à une RFP afin de pouvoir marquer les jonctions adhérentes. Validé précédemment dans le disque de patte (Martin et al., 2021), je l'ai utilisé dans le disque d'aile. En l'exprimant dans l'aile, cet outil permet un fort recrutement de Myosine-II dans la zone précurseur de l'aile (Figure 41B). Cet effet est dû à une accumulation au niveau des jonctions adhérentes d'environ 50% (Figure 41C-D) et ce, sans affecter la polarité apico-basale.

Ainsi, ces deux outils permettent d'augmenter la Myosine-II aux jonctions adhérentes et ce, de manière différentielle. En effet, l'AJ-GFP-trap permet un fort recrutement de Myosine-II aux jonctions adhérentes, à des niveaux similaires à ce que l'on peut observer dans le contexte  $Syx7^{RNAi}$ , c'est-à-dire un recrutement d'environ 50%. Le  $flw^{RNAi}$  permet également un recrutement de Myosine-II aux jonctions adhérentes mais à des niveaux plus faibles, environ 20%. Grâce à ces deux outils, je vais donc pouvoir tester le rôle de l'augmentation de tension aux jonctions adhérentes à deux niveaux différents sur la progression tumorale.



**Figure 41 : L'AJ-GFP-Trap permet d'augmenter fortement la Myosine-II aux jonctions adhérentes**

(A) Schéma illustrant le principe de l'AJ-GFP-Trap. (B) Vue générale de disques contrôle (haut) et de disque exprimant l'AJ-GFP-Trap (bas). La zone précurseur de l'aile est délimitée en pointillés. (C) Zooms des images prises en (B). On note la forte accumulation de Myosine-II aux jonctions adhérentes sans perturber la polarité apico-basale, révélée par le marquage Dlg. (D) Quantifications de la Myosine-II apicale en condition contrôle ( $\alpha$ cat, gris, n=9), et AJ-GFP-Trap (noir, n=15). Barre d'échelle (B) 50 $\mu$ m, (C) 10 $\mu$ m. Test statistique (D) t-test \*\*\*<0.0001

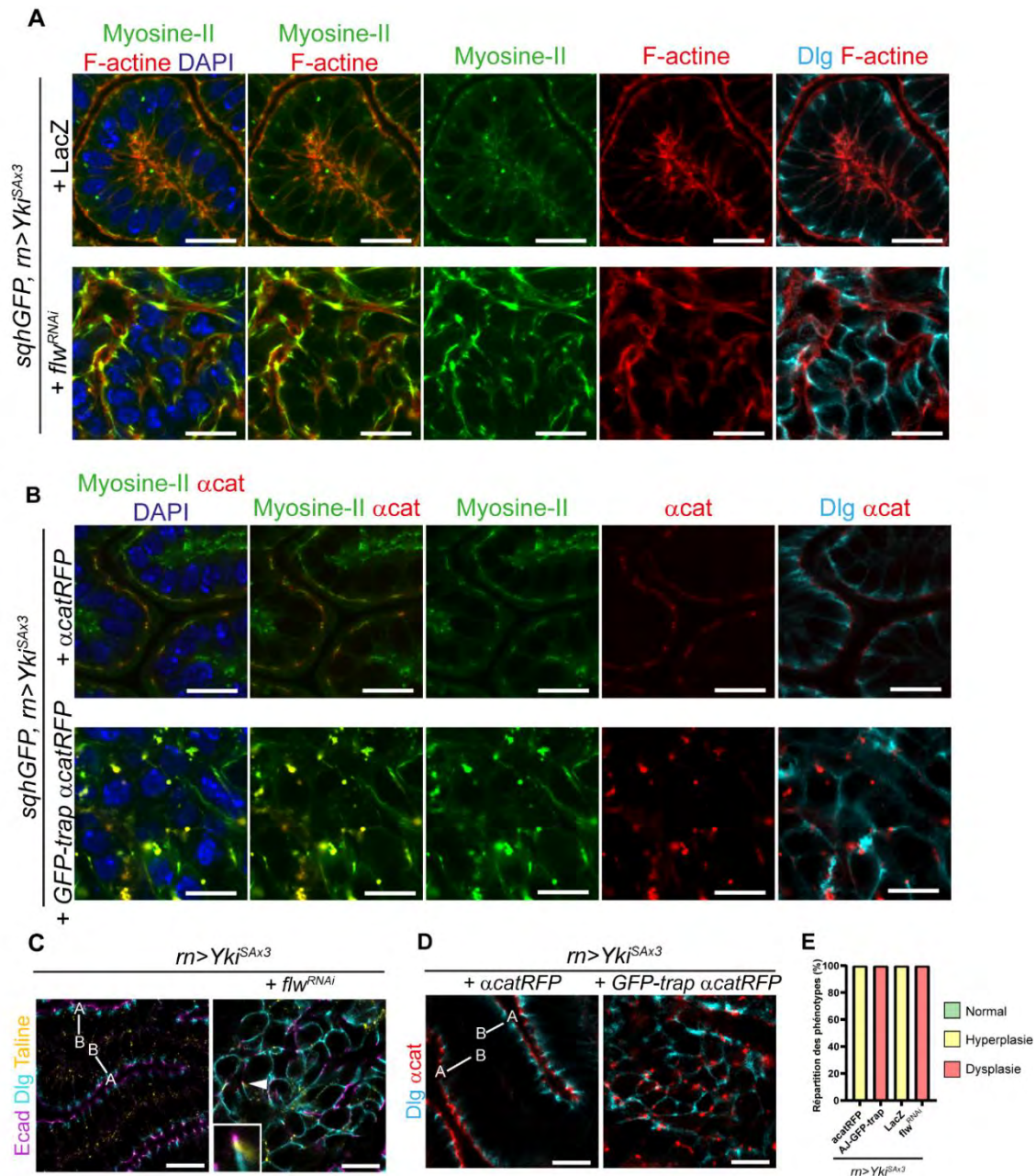
### 1.5.3 Effet de l'augmentation de tension jonctionnelle dans les tumeurs hyperplasiques

Ainsi, j'ai caractérisé deux outils me permettant d'augmenter la tension jonctionnelle sans que cela n'affecte l'intégrité du tissu. J'avais également caractérisé précédemment le contexte tumoral Yki<sup>Sax3</sup> qui s'est révélé être un contexte strictement hyperplasique et sans augmentation de tension jonctionnelle. J'ai donc ensuite utilisé ces deux stratégies dans le contexte tumoral Yki<sup>Sax3</sup> afin de tester le rôle de l'augmentation de tension jonctionnelle sur la progression tumorale.

De façon intéressante, que ce soit avec le flw<sup>RNAi</sup> ou avec le AJ-GFP-Trap j'ai observé l'apparition de cellules rondes avec la F-actine et la Myosine-II relocalisées autour du cortex de la cellule (Figure 42A, B). De plus, en regardant les marqueurs de l'organisation épithéliale, j'ai constaté que ces cellules présentaient une localisation de Ecad,  $\alpha$ -cat, Dlg et Taline perturbée (Figure 42C, D) avec notamment une proximité entre des marqueurs normalement spatialement séparés comme Ecad et Taline montrant que ces cellules ne sont plus épithéliales (Figure 42C, tête de flèche). De plus, en quantifiant la proportion de tumeurs hyperplasiques et dysplasiques dans chacune des conditions, j'ai observé qu'absolument toutes les tumeurs Yki<sup>Sax3</sup> dans lesquelles j'ai augmenté la Myosine-II jonctionnelle, *via* l'AJ-GFP-Trap ou le flw<sup>RNAi</sup> sont devenues dysplasiques (Figure 42E).



Ainsi, alors que dans un contexte développemental, une augmentation de Myosine-II apicale ne perturbe en rien l'organisation épithéliale (Figure 40, Figure 41), induire une augmentation de Myosine-II au niveau des jonctions adhérentes dans un contexte tumoral strictement épithélial est suffisant pour induire la TEM et permettre la progression de la tumeur (Figure 42).

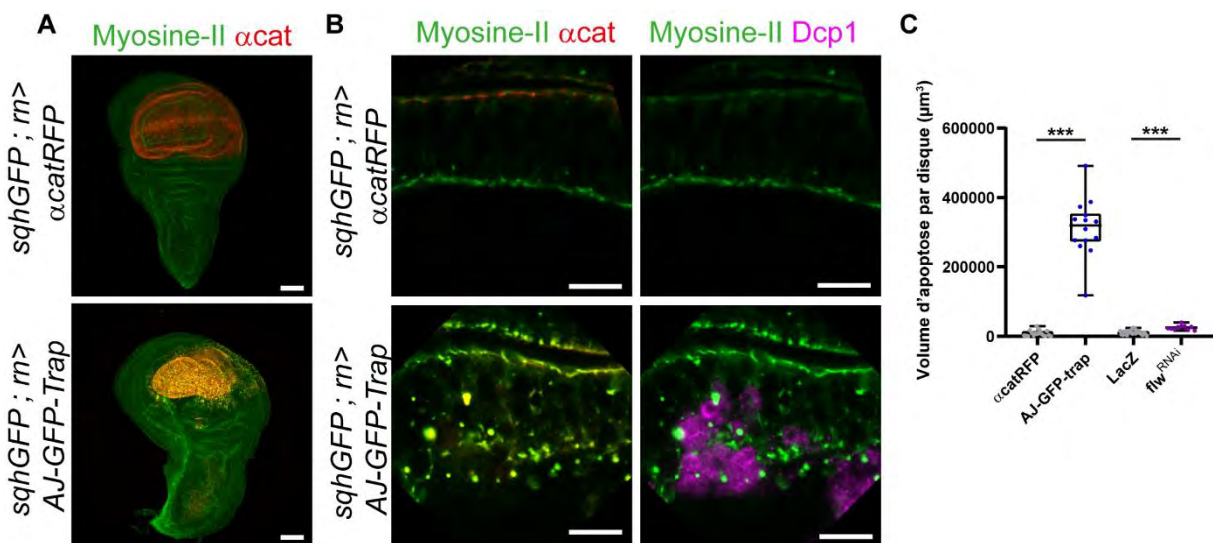


**Figure 42 : Une augmentation de tension jonctionnelle induit la TEM dans les tumeurs  $Yki^{SAx3}$**

(A-D) Zooms de tumeurs  $Yki^{SAx3}$  contrôle (haut) et de tumeurs  $Yki^{SAx3}$  avec augmentation de tension jonctionnelle via le  $flw^{RNAi}$  (A, C) ou via le AJ-GFP-Trap (B, D). On observe que le  $flw^{RNAi}$  et l'AJ-GFP-Trap induisent une relocalisation de la F-actine et de la Myosine-II autour du cortex des cellules (A, B) ainsi qu'une perturbation de la localisation de Ecad et Taline (C, tête de flèche) et de Dlg (C, D). (E) Graphique montrant la répartition des phénotypes pour les différentes conditions contrôle ( $\alpha catRFP$  et LacZ, n=30 et 14 respectivement) et avec augmentation de tension (AJ-GFP-Trap et  $flw^{RNAi}$ , n=17 et 16 respectivement). Barre d'échelle 10 μm.

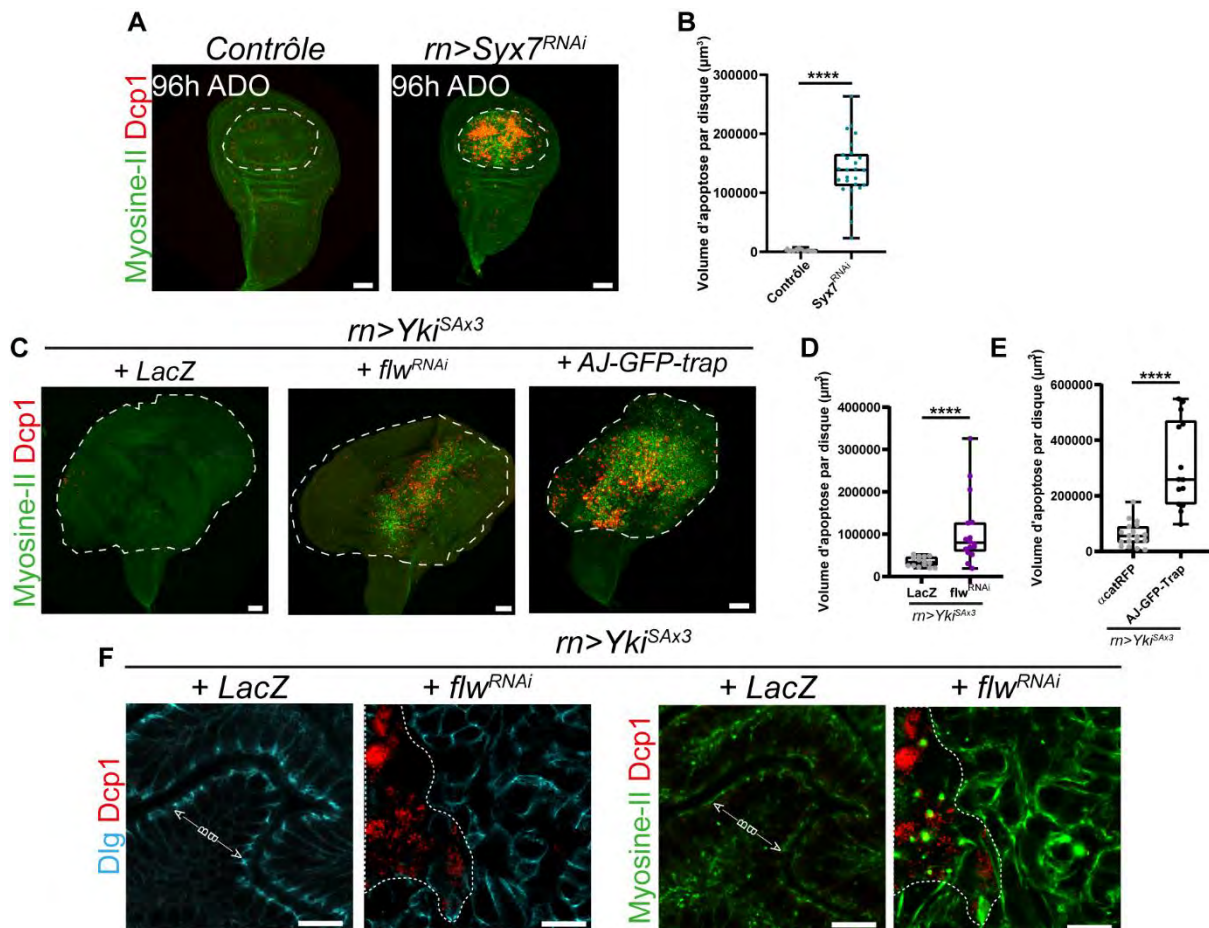
## 1.6 Une corrélation spatiale entre augmentation de tension jonctionnelle et apoptose

Par la suite, je me suis intéressée au(x) mécanisme(s) par lequel la tension jonctionnelle pouvait induire la TEM. En réalisant les essais d'augmentation de tension jonctionnelle dans un contexte développemental, que ce soit avec le *flw*<sup>RNAi</sup> ou avec l'AJ-GFP-Trap, j'ai constaté la présence de points d'accumulation localisés au niveau basolatéral de Myosine-II, nettement plus nombreux dans le cas du AJ-GFP-Trap (Figure 43B) et complètement absents de la condition contrôle. La présence de ces points corrèle également avec une diminution de la taille de la zone précurseur de l'aile dans laquelle la construction AJ-GFP-Trap est exprimée (Figure 43A). Ces points se sont révélés être des fragments apoptotiques, révélés par un anticorps dirigé contre la forme active de la caspase effectrice Dc1, qui révèle donc les cellules en train de mourir (Figure 43B, C), montrant donc qu'une augmentation de tension jonctionnelle induit de l'apoptose.



**Figure 43 : L'augmentation de tension jonctionnelle induit de l'apoptose dans un contexte développemental**

(A) Vues générales de disques contrôle ( $\alpha$ -catRFP) et dans lequel on augmente la tension jonctionnelle (AJ-GFP-Trap). On observe une réduction de la zone précurseur de l'aile (en rouge). (B) Zooms des images en (A). On observe la présence de points basolatéraux de Myosine-II qui correspondent à des fragments apoptotiques. (C) Quantifications des niveaux d'apoptose après augmentation de la tension jonctionnelle. Le nombre de disques analysés est de :  $\alpha$ catRFP n=17, AJ-GFP-Trap n=14, LacZ n= 23, *flw*<sup>RNAi</sup> n=10. Barre d'échelle A 50 $\mu$ m ; B 10 $\mu$ m. Tests statistiques (C) Mann-Whitney et t-test. \*\*\* p<0.001.



**Figure 44 : La présence d'apoptose corrèle avec une augmentation de tension jonctionnelle dans les tumeurs  $Yki^{SAX3}$  et  $Syx7^{RNAi}$**

(A) Vues générales d'un disque contrôle et  $Syx7^{RNAi}$  à 96h ADO. Dans ce contexte aussi, on observe une corrélation entre la présence d'apoptose et l'augmentation de Myosine-II. (B) Quantifications des niveaux d'apoptose dans les différents contextes cités en (A). Le nombre de disques analysés est de 26 pour chaque condition. (C) Vues générales des tumeurs  $Yki^{SAX3}$  sans (LacZ) et avec augmentation de tension jonctionnelle ( $flw^{RNAi}$ , AJ-GFP-Trap). On remarque la corrélation spatiale entre la présence d'apoptose et l'augmentation de Myosine-II. (D, E) Quantification des niveaux d'apoptose dans les contextes cités en (C). Le nombre de disques analysés est de : LacZ n=14,  $flw^{RNAi}$  n=16 (D), acatRFP n=18, AJ-GFP-Trap n=14 (E) (F) Zooms de tumeurs  $Yki^{SAX3}$  sans (LacZ) et avec augmentation de tension jonctionnelle ( $flw^{RNAi}$ ). On remarque une proximité entre les cellules mésenchymateuses et les cellules apoptotiques (zone entourée, révélées par Dcp1). La zone tumorale est délimitée par des pointillés. Barre d'échelle (A, D) 50 $\mu$ m ; (F) 10 $\mu$ m. Tests statistiques (B, E) Mann-Whitney, (C) t-test. \*\*\*\* p<0.0001.

Puisque dans un contexte développemental, de l'apoptose est induite suite à une augmentation de tension jonctionnelle, j'ai ensuite voulu vérifier ce qu'il en était dans les tumeurs. J'ai commencé par caractériser les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  qui, spontanément présentent une augmentation de tension jonctionnelle à 96h ADO, juste avant la TEM. En utilisant l'anticorps dirigé contre Dcp1, j'ai constaté qu'il y avait une apoptose massive dans la zone d'induction, suggérant une corrélation entre augmentation de tension jonctionnelle et apoptose (Figure 44A, B). J'ai ensuite caractérisé ce qu'il en



était dans les tumeurs  $Yki^{SAX3}$ . Si les tumeurs  $Yki^{SAX3}$  présentent des niveaux très faibles d'apoptose, la chose est bien différente lorsque l'on augmente la tension jonctionnelle. En effet, que ce soit dans le cas du  $flw^{RNAi}$  ou de l'AJ-GFP-trap, j'ai pu observer la présence de beaucoup de cellules apoptotiques (Figure 44C-E). De façon intéressante, si l'AJ-GFP-Trap induit de l'apoptose dans toute la zone tumorale (Figure 44C), le  $flw^{RNAi}$ , induit de l'apoptose très localisée qui colocalise parfaitement avec l'augmentation de tension jonctionnelle (Figure 44C). De plus, en regardant plus en détails la localisation de l'apoptose dans le contexte  $Yki^{SAX3}$  modifié, j'ai remarqué que les cellules apoptotiques étaient localisées à proximité des cellules mésenchymateuses, induites par l'augmentation de tension jonctionnelle (Figure 44F).

*Ainsi, j'ai pu observer que dans les tumeurs drosophiles, il y a une corrélation spatiale et temporelle entre l'apoptose et la tension jonctionnelle et que cela précède la TEM dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ .*

### 1.7 Un rôle de l'apoptose dans la progression tumorale ?

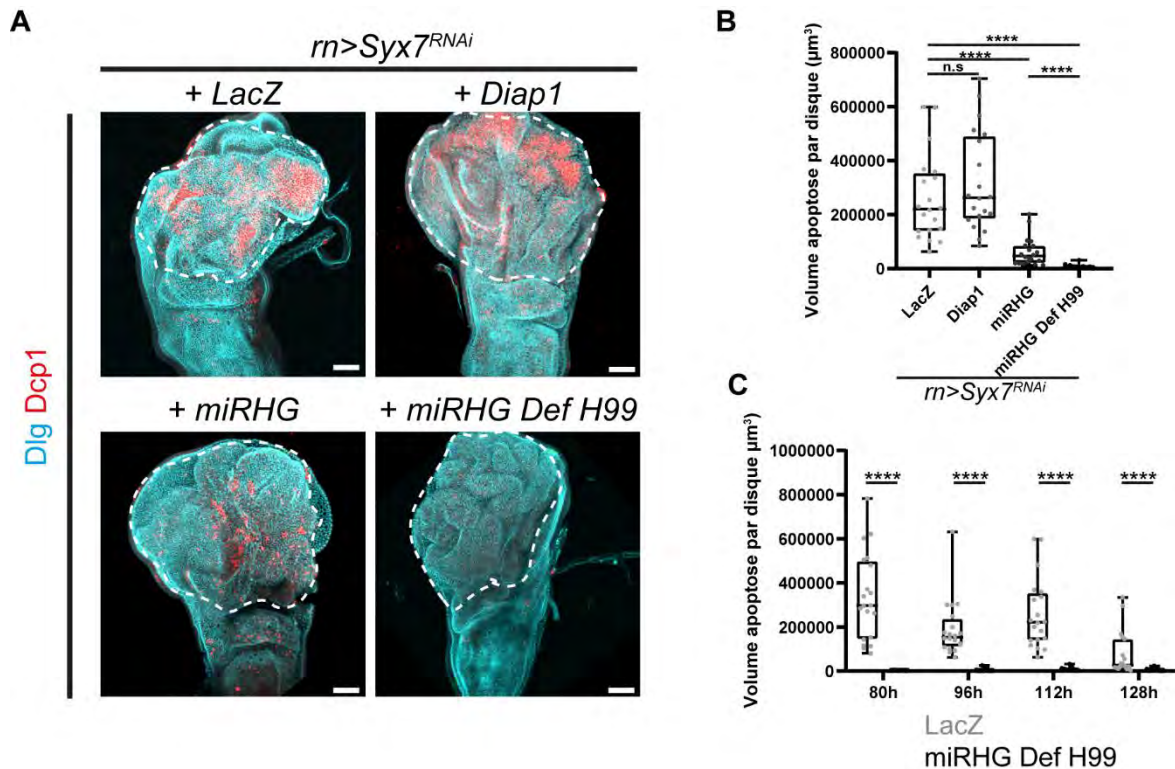
La corrélation spatiale observée entre les cellules apoptotiques et les cellules mésenchymateuses dans le contexte  $Yki^{SAX3}$  et le fait que cette apoptose précède la TEM dans le contexte  $Syx7^{RNAi}$  m'ont poussée à m'interroger sur un éventuel rôle des cellules apoptotiques sur la progression tumorale.

En effet, les cellules apoptotiques sont connues pour influencer leur environnement *via* différents signaux biochimiques ou mécaniques. Pendant le développement par exemple, les cellules apoptotiques ont été montrées comme modifiant les propriétés mécaniques des cellules voisines, conduisant *in fine* à un changement de forme du tissu et à la formation d'un pli (Ambrosini et al., 2019; Monier et al., 2015). Les cellules apoptotiques peuvent également relarguer des facteurs qui vont influencer les cellules voisines. Ainsi, chez l'hydre, si la tête est coupée, les cellules apoptotiques présentes au niveau du site de coupure vont libérer des facteurs diffusibles comme Wnt3 et favoriser la prolifération des cellules autour pour permettre la régénération de la tête (Chera et al., 2009; Pérez-Garijo and Steller, 2015). De plus, bien que l'apoptose soit considérée comme un mécanisme protecteur puisqu'il permet l'élimination de cellules dangereuses (Hanahan and Weinberg, 2011; Pfeffer and Singh, 2018), quelques

études ont rapporté un rôle pro-prolifératif de l'apoptose dans certains contextes tumoraux (Ford et al., 2015; Huang et al., 2011).

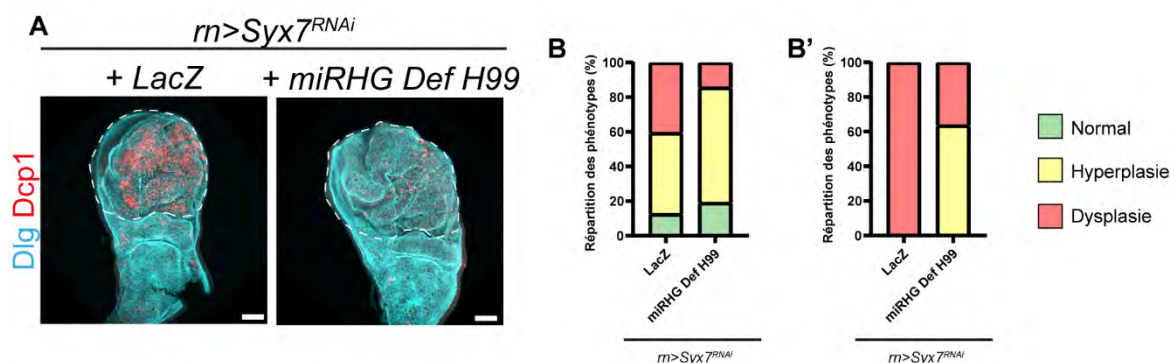
Aussi, pour tester un potentiel rôle de l'apoptose dans la progression tumorale, j'ai cherché à inhiber l'apoptose dans le contexte des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et observé si cela impactait la progression tumorale.

Chez la drosophile, l'inhibition d'apoptose se fait principalement *via* l'utilisation d'un outil appelé p35, une protéine de baculovirus, (Hay et al., 1994) qui permet une inhibition des caspases effectrices (Figure 26). L'utilisation de p35 a néanmoins été montrée comme favorisant la formation de cellules dites « non-mortes ». Ces cellules « non-mortes » commencent le processus apoptotique mais puisque les caspases effectrices sont inhibées, elles ne peuvent pas achever le processus et restent bloquées dans cet état. Des études ont ainsi montré que les cellules « non-mortes » relarguent un certain nombre de facteurs favorisant la prolifération cellulaire des cellules voisines (Fogarty et al., 2016). Aussi, afin d'éviter de reproduire ce phénomène de cellules « non-mortes », j'ai donc testé d'autres outils pour inhiber l'apoptose. Un autre outil très répandu chez la drosophile est la surexpression de Diap1 (Figure 26). Diap1 est en effet l'inhibiteur endogène des caspases activatrices et effectrices. Néanmoins, cet outil ne s'est pas révélé efficace pour inhiber l'apoptose dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (Figure 45A, B). Par la suite, j'ai donc testé un miRNA dirigé contre les trois gènes pro-apoptotiques *hid*, *reaper* et *grim* (miRHG) (Lee et al., 2013). Cet outil s'est révélé efficace puisqu'il permettait de réduire très fortement la quantité d'apoptose observée dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (Figure 45A, B). Toutefois, puisque le but était d'inhiber complètement l'apoptose, j'ai utilisé ce miRHG dans un contexte sensibilisé dans lequel une des deux copies du locus contenant les trois gènes pro-apoptotiques est absent grâce à l'utilisation d'une déficience nommée H99 (White et al., 1994). Dans ce cas, en utilisant la combinaison de ces deux outils (ci-après appelé miRHG ; DefH99), j'ai réussi à inhiber complètement l'apoptose dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et ce, quel que soit l'âge de la tumeur (Figure 45C).



**Figure 45 : Stratégies pour inhiber l'apoptose dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>***

(A) Vues générales de tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* qui expriment différents outils pour inhiber l'apoptose. Si de façon globale, les disques ont visuellement le même aspect, seuls les outils miRHG et miRHG Def H99 se sont révélés efficace pour inhiber l'apoptose. (B) Quantifications des niveaux d'apoptose des images en (A). 20 disques ont été analysés pour chaque condition. (C) Quantifications des niveaux d'apoptose dans des tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* avec (LacZ) et sans apoptose (miRHG Def H99) au cours du temps. On note que l'outil utilisé est très efficace pour inhiber l'apoptose et ce, à n'importe quel temps de développement de la tumeur. Sur cette figure, les expériences ont été faites à 29°C. Le nombre de disques analysés pour la condition contrôle et *Syx7<sup>RNAi</sup>* est respectivement de 20 et 14 à 80h, 20 et 20 à 96h et 112h et 19 et 22 à 128h ADO. Barre d'échelle 50µm. Tests statistiques (B, C) Mann-Whitney. \*\*\*\* p<0.0001, ns non significative.



**Figure 46 : L'apoptose favorise la TEM dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>***

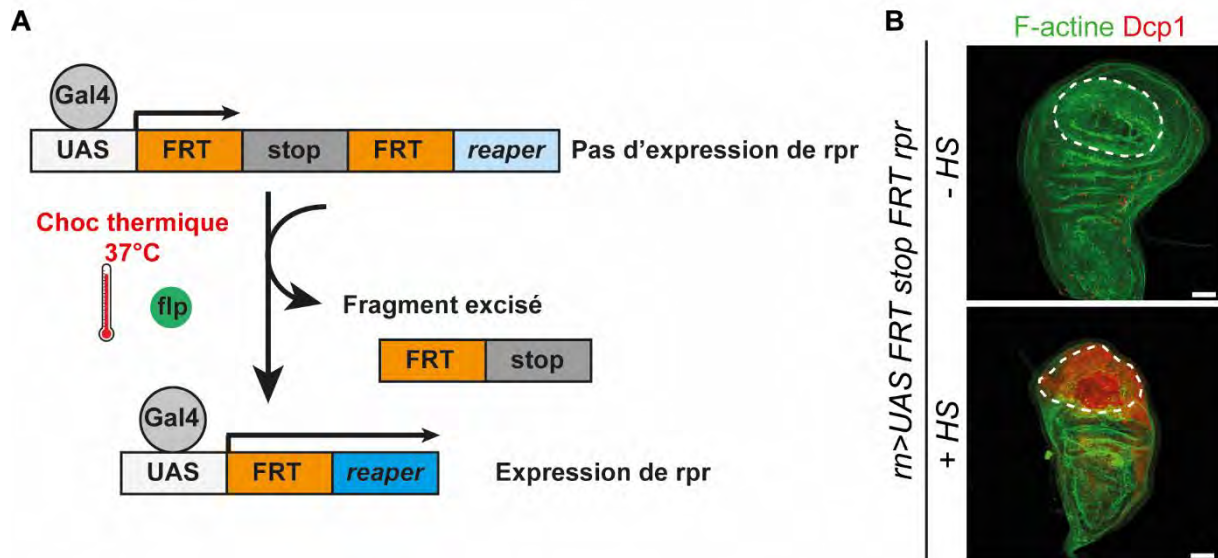
(A) Vues générales de tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* avec (LacZ) et sans apoptose (miRHG Def H99). Les deux tumeurs présentent un aspect et une taille similaire. (B-B') Quantification de la répartition des phénotypes de tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* avec (LacZ) et sans apoptose (miRHG Def H99) pour 96h ADO (B) et 128h ADO (B') à 30°C. L'inhibition d'apoptose induit un fort retard dans la progression tumorale. Le nombre de disques analysés pour la condition LacZ et miRHG Def H99 est de 32 et 21 (B) et 19 et 22 (B'). Barre d'échelle 50µm.

J'ai ensuite observé comment se développaient les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> avec (+ LacZ) et sans apoptose (+ miRHG ; DefH99). Pour cela, je me suis d'abord placée au moment où les tumeurs commencent à devenir mésenchymateuses en condition LacZ. Si au niveau macroscopique les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> + LacZ et Syx7<sup>RNAi</sup> + miRHG ; DefH99 sont similaires (Figure 46A), en me basant sur le marqueur épithélial Dlg ainsi que sur l'état du cytosquelette d'actine au niveau cellulaire, je me suis aperçue que seulement 15% des tumeurs étaient mésenchymateuses en condition miRHG ; DefH99 contre 40% en condition LacZ (Figure 46B). Cela suggère un retard dans la progression tumorale et ce retard est d'autant plus visible si l'on observe des tumeurs plus âgées. En effet, en me plaçant au moment où toutes les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> + LacZ ont subi une TEM et sont toutes devenues dysplasiques, j'ai constaté qu'en absence d'apoptose, 60% des tumeurs était toujours à un état hyperplasique (Figure 46B').

*Ainsi, si d'autres mécanismes additionnels doivent être mis en jeu puisque certaines tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> sans apoptose peuvent tout de même évoluer vers un état dysplasique, ces résultats montrent donc que l'apoptose favorise la transition épithélio-mésenchymateuse dans le contexte tumoral Syx7<sup>RNAi</sup>.*

## 1.8 L'apoptose fragilise les jonctions adhérentes et septées

Afin de compléter ces résultats, j'ai ensuite souhaité tester si l'apoptose seule était suffisante pour induire la TEM dans un contexte tumoral. Pour cela, j'ai induit de l'apoptose ectopique dans le contexte Yki<sup>Sax3</sup> et observé si cela avait un impact sur la progression tumorale. J'ai utilisé une construction génétique permettant d'induire spécifiquement dans la zone tumorale de l'apoptose de façon contrôlée. Cette construction repose sur le principe d'une recombinaison inducible par un choc thermique (37°C) qui excise une cassette stop et permet l'expression du gène pro-apoptotique *reaper* dans un sous-ensemble de cellules. Plus le temps du choc thermique sera long, plus le nombre de cellules dans lesquelles la recombinaison a lieu est important (Figure 47A).



### Figure 47 : Stratégie d'induction d'apoptose ectopique

(A) Construction permettant d'induire de l'apoptose : sans choc thermique (HS), il n'y a pas d'expression de *reaper* dû à la présence de la cassette stop. Suite à un HS, cela permet l'expression de la flippase (flp) qui excise la cassette stop et permet l'expression de *reaper* (B) Suite à un HS d'une heure, induction d'apoptose massive dans la zone précurseur de l'aile entourée par des pointillés blancs. F-actine en vert et Dcp1 en rouge. L'expression du transgène inductible est sous le contrôle du pilote rotund-Gal4 Barre d'échelle 50µm

Cette construction s'est révélée particulièrement efficace dans un disque contrôle puisqu'un choc thermique d'une heure a permis de détruire la totalité des cellules du primordium de l'aile dans laquelle la construction était exprimée (Figure 47B).

L'outil et la méthode étant fonctionnels, j'ai par la suite souhaité induire de l'apoptose dans le contexte  $Yki^{Sax3}$ . *Yki* est cependant connu pour inhiber fortement l'apoptose en induisant l'expression de *Diap1* (Huang et al., 2005a). Induire de l'apoptose semblait donc compliqué dans ce contexte. Néanmoins, puisque l'induction d'apoptose est une question de balance entre les signaux pro et anti-apoptotiques, j'ai testé d'induire de l'apoptose dans des tumeurs  $Yki^{Sax3}$  plutôt jeunes (entre 96h et 120h ADO), en espérant que les signaux anti-apoptotiques ne soient pas encore trop importants. Après avoir induit le choc thermique, j'ai laissé les tumeurs se développer 24h avant de les disséquer pour voir si l'apoptose avait eu un impact sur le développement tumoral. Si normalement, il n'y a que vraiment très peu d'apoptose dans ce contexte (Figure 48A, haut), la construction s'est toutefois révélée très efficace pour induire de l'apoptose massive dans les tumeurs  $Yki^{Sax3}$  (Figure 48A, bas). Alors que la quasi-totalité des cellules de la tumeur sont mortes par apoptose, certaines cellules au centre de la tumeur semblent avoir résisté à cette apoptose. De façon

surprenante, ces cellules ne présentent pas du tout la même morphologie que les cellules épithéliales que l'on observe normalement dans le contexte  $Yki^{Sax3}$ . En effet, ces cellules présentent une morphologie plus ronde, avec de la F-actine relocalisée autour du cortex, faisant clairement penser à des cellules mésenchymateuses (Figure 48B).

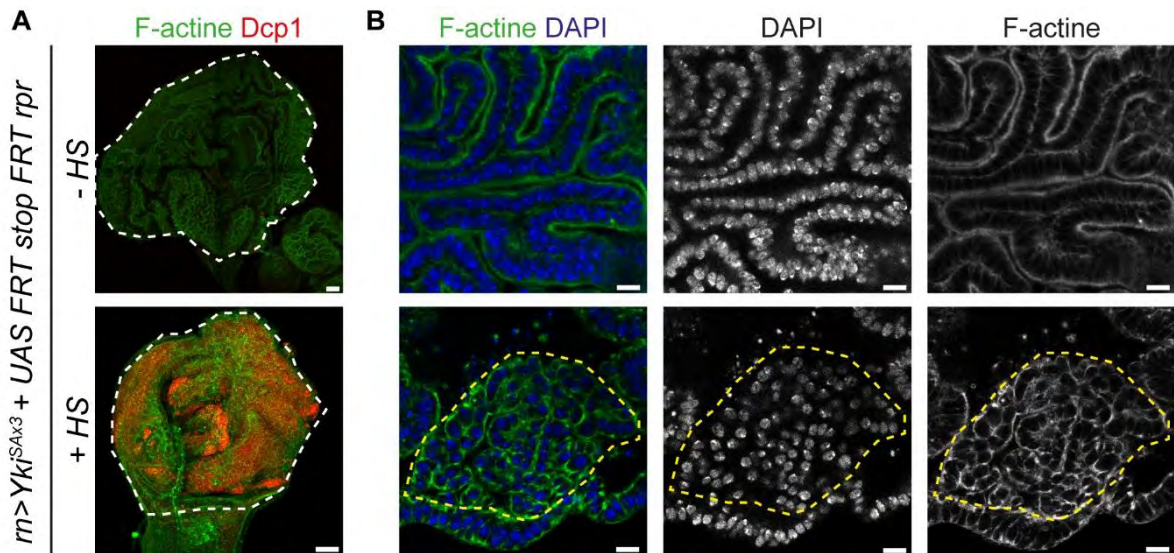
Toutefois, bien que ces résultats soient particulièrement prometteurs, je n'ai pas réussi à les reproduire. En effet, les autres essais réalisés ont effectivement induit de l'apoptose mais je n'ai observé aucune cellule mésenchymateuse. Le fait de ne pas avoir réussi à reproduire ces résultats suggèrent très fortement que la quantité d'apoptose ainsi que l'âge des tumeurs dans lesquelles l'apoptose est induite sont des facteurs particulièrement importants pour pouvoir observer une totale transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Néanmoins, je n'ai pas encore identifié les paramètres optimaux pour reproduire ces résultats.

Cependant, en renouvelant l'expérience, j'ai pu observer une diminution reproductible de l'intensité des jonctions cellulaires. En effet, en réalisant un marquage pour les jonctions adhérentes (Ecad) et les jonctions septées (Dlg) afin de visualiser l'état des cellules, j'ai constaté que les niveaux de Ecad et de Dlg étaient plus faibles (près de 50% plus faibles) dans les zones épithéliales à proximité de cellules apoptotiques par rapport aux zones épithéliales sans apoptose à proximité (Figure 49), témoignant d'une fragilité des jonctions adhérentes et septées.

De façon intéressante, ces résultats corrént avec ce que l'on peut observer dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ . En effet, à 96h ADO, moment où le tissu est toujours épithélial mais avec une apoptose massive (Figure 50A), j'ai observé des niveaux nettement plus faibles de Ecad dans la zone tumorale comparé au reste du disque (Figure 50B, C). Le trop petit nombre d'échantillons observés pour Dlg ne permet pas de montrer une différence significative. Néanmoins, les résultats semblent pointer vers une diminution de l'intensité dans la zone tumorale comparé au reste du disque (Figure 50B, D).

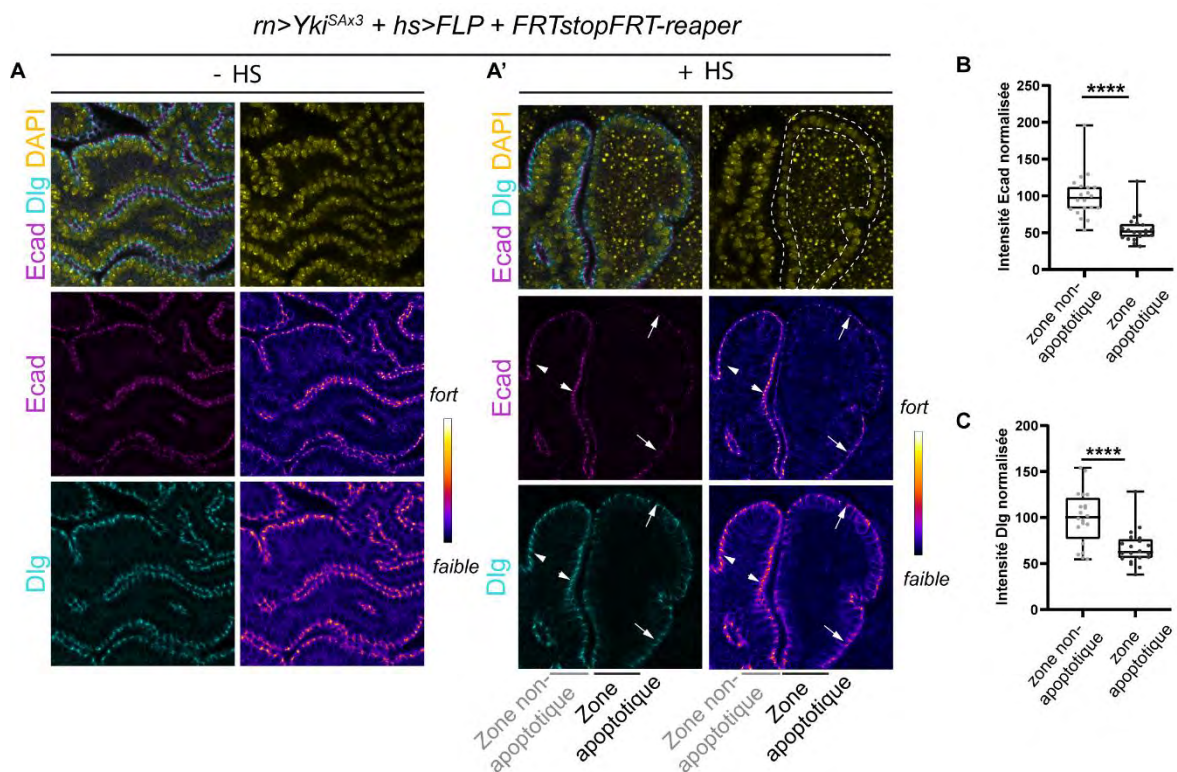
***Ainsi, l'apoptose pourrait faciliter la TEM en fragilisant notamment les jonctions adhérentes et les jonctions septées.***





**Figure 48 : L'apoptose induit la TEM dans une tumeur  $Yki^{SAX3}$**

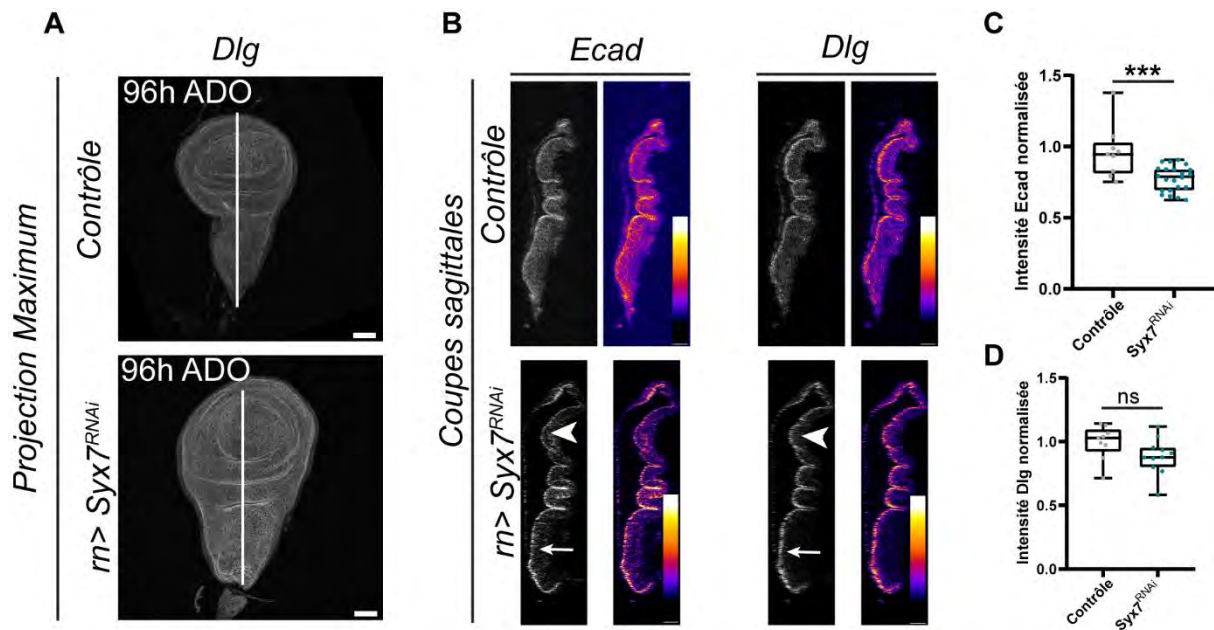
(A). Vues générales de tumeurs  $Yki^{SAX3}$  (délimitées par les pointillées blancs) sans (en haut) et avec (en bas) HS de 5min qui permet d'induire de l'apoptose massive. F-actine en vert et apoptose (Dcp1) en rouge. Barre d'échelle 50 $\mu$ m (B) Zooms des vues générales montrées en (A). Sans HS (en haut), on retrouve une organisation strictement épithéliale, visualisée *via* la F-actine. Suite au HS (en bas), on observe des cellules plus rondes (zone pointillés jaunes), avec de la F-actine relocalisée autour du cortex, faisant penser à des cellules mésenchymateuses. F-actine en vert et DAPI en bleu. Barre d'échelle 10 $\mu$ m.



**Figure 49 : L'apoptose fragilise les jonctions adhérentes et septées dans les tumeurs  $Yki^{SAX3}$**

(A, A') Zooms d'une tumeur  $Yki^{SAX3}$  sans (A) et avec induction d'apoptose (A'). Les marquages Ecad et Dlg ont été représentés avec une LUT d'intensité. On observe une nette diminution de l'intensité dans les cellules épithéliales à proximité des zones apoptotiques (flèches) comparé aux zones épithéliales sans apoptose (tête de flèche). (B, C) Quantifications des niveaux d'intensité de Ecad (B) et Dlg (C) dans les zones non apoptotiques (gris clair, n=20) et dans les zones apoptotiques (gris foncé, n=20). Tests statistiques (B) Wilcoxon, (C) t-test païré, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .





**Figure 50 : La présence d'apoptose corrèle avec une fragilisation des jonctions dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> à 96h ADO**

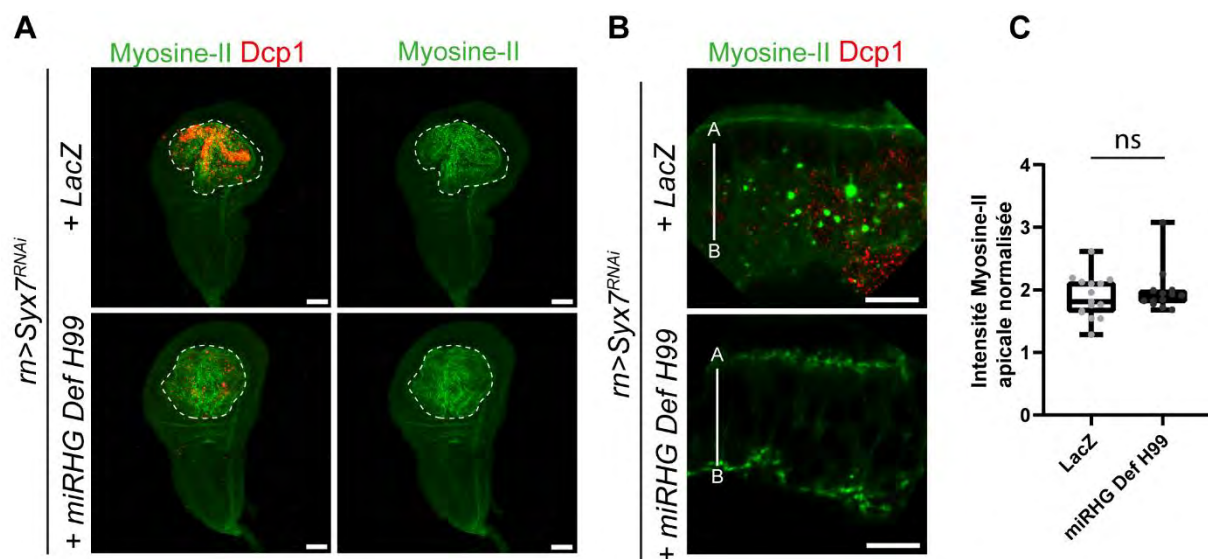
(A) Vues générales d'un disque contrôle (en haut) et Syx7<sup>RNAi</sup> (en bas) à 96h ADO. Barre d'échelle 50µm. (B) Coupes sagittales réalisées selon l'axe en (A) pour des marquages Ecad et Dlg. Pour chaque contexte il y a une coupe en niveau de gris (gauche) et une coupe avec une LUT d'intensité (droite). On peut voir une diminution de l'intensité de Ecad et de Dlg dans la zone tumorale (tête de flèche) comparé à la zone du notum qui sert de contrôle interne (flèche). (C-D) Quantifications des niveaux d'intensité de Ecad (contrôle, n=9 ; Syx7<sup>RNAi</sup>, n=22) et de Dlg (contrôle, n=9 ; Syx7<sup>RNAi</sup>, n=11) respectivement. Les valeurs ont été normalisées en les divisant par l'intensité au niveau du notum. Barres d'échelle 50µm. Tests statistiques (C) t-test, (D) Mann-Whitney. \*\*\* p<0.001, ns non significative.

### 1.9 Un lien entre apoptose et tension jonctionnelle ?

Jusqu'ici, j'ai donc identifié deux facteurs, l'apoptose et la tension jonctionnelle, comme responsables de la progression tumorale en permettant notamment la TEM. Si j'ai montré que l'augmentation de tension jonctionnelle induit de l'apoptose, je me suis ensuite demandé si la réciproque était également vraie, c'est-à-dire si l'apoptose pouvait augmenter la tension jonctionnelle et mettre ainsi en place une boucle d'amplification entre les deux protagonistes. Dans le développement, les cellules apoptotiques induisent une augmentation de Myosine-II au niveau des jonctions adhérentes dans les cellules voisines, conduisant *in fine* à un changement de morphologie de tissu (Ambrosini et al., 2019; Monier et al., 2015).

J'ai donc souhaité voir si les cellules apoptotiques observées à 96h ADO dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> pouvaient être à l'origine de la modification des propriétés mécaniques observée dans ces mêmes tumeurs. Pour tester cela, j'ai inhibé

l'apoptose dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  et observé l'effet sur l'augmentation de tension jonctionnelle à 96h ADO. Si l'inhibition d'apoptose induit une disparition des accumulations de Myosine-II au niveau basolatéral, dues initialement à la présence de cellules apoptotiques (Figure 51B), en quantifiant les niveaux de Myosine-II aux jonctions adhérentes, je n'ai observé aucune différence entre les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  et celles dans lesquelles l'apoptose était inhibée (Figure 51). Ces résultats montrent donc que les cellules apoptotiques ne sont pas responsables de cette modification des propriétés mécaniques précoces.



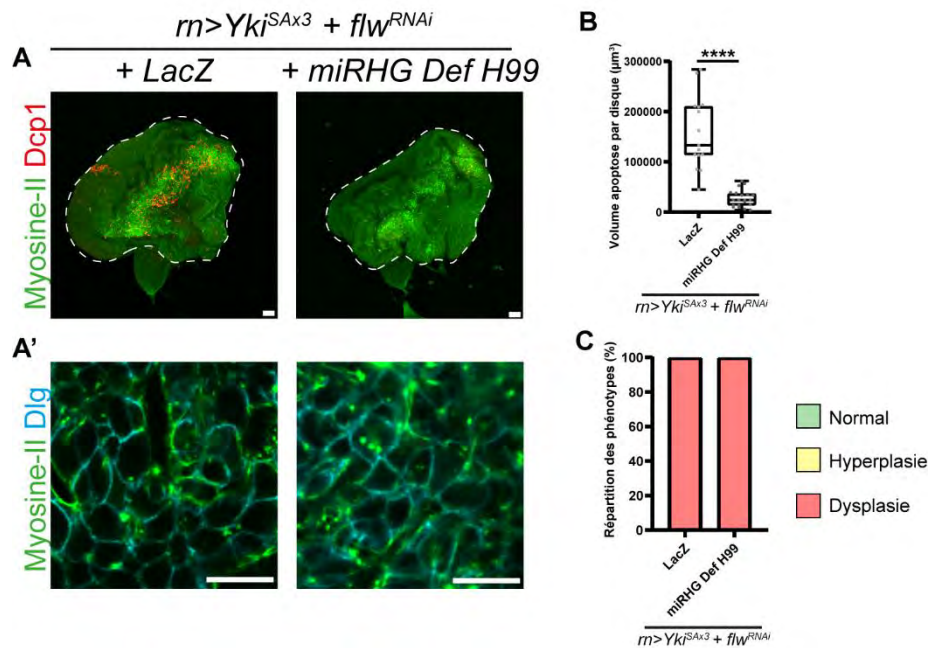
**Figure 51 : L'apoptose n'altère pas les niveaux de Myosine-II apicale dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$**

(A) Vues générales de tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  (zone en pointillés) avec (+ LacZ) et sans apoptose (+ miRHG Def H99) à 80h ADO à 30°C. Barre d'échelle 50µm. (B) zooms des vues générales en (A). Si on observe toujours cette accumulation de Myosine-II apicale, les agrégats baso-latéraux de Myosine-II disparaissent lorsque l'apoptose est inhibée. Myosine-II en vert et Apoptose (Dcp1) en rouge. A, Apical, B, Basal. Barre d'échelle 10µm. (C) Quantification de la Myosine-II apicale dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  avec (LacZ, n=15) et sans apoptose (miRHG Def H99, n=13). Barre d'échelle (A) 50µm, (B) 10µm. Test statistique (C) Mann-Whitney. ns non significative.

## 1.10 Un rôle direct de la tension jonctionnelle sur la TEM ?

Enfin, au cours des expériences d'inhibition d'apoptose dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  (voir partie 1.7), malgré un fort retard dans la TEM, j'avais observé que même sans apoptose, certaines tumeurs devenaient dysplasiques, suggérant donc un mécanisme additionnel responsable de la TEM (Figure 46B'). L'augmentation de tension jonctionnelle étant toujours présente malgré l'inhibition d'apoptose (Figure 51), je me suis donc demandé si elle seule pouvait induire la TEM. J'ai donc refait la même

expérience d'augmenter la tension jonctionnelle grâce au  $flw^{RNAi}$  dans le contexte  $Yki^{SAX3}$  mais cette fois-ci en inhibant l'apoptose en même temps. De façon intéressante, j'ai observé que l'augmentation de tension jonctionnelle seule était capable d'induire la TEM de façon complètement indépendante de l'apoptose. En effet, dans les deux cas, avec et sans apoptose, j'ai observé des cellules avec une forme plus ronde et une relocalisation de la Myosine-II et de Dlg autour du cortex (Figure 52).



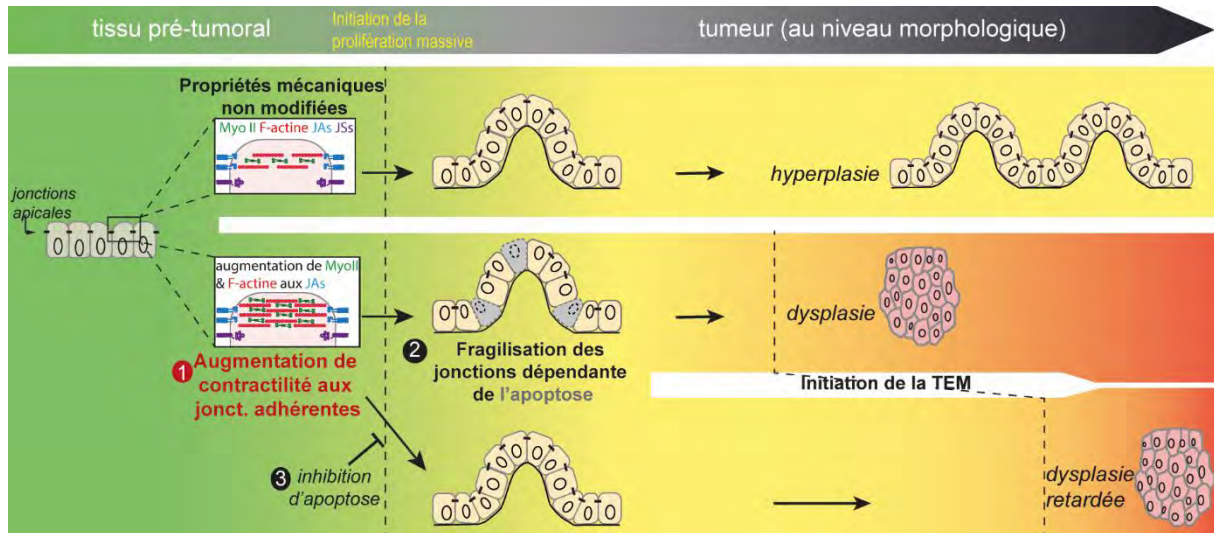
**Figure 52 : La tension jonctionnelle peut induire la TEM sans apoptose**

(A, A') Vues générales (A) et zooms (A') de tumeurs  $Yki^{SAX3} + flw^{RNAi}$  avec (LacZ) et sans (miRHG Def H99) apoptose. (B) Quantification de l'apoptose dans ces deux contextes (LacZ, n=15 ; miRHG Def H99, n=13). (C) Quantification de la répartition des phénotypes pour ces deux contextes (LacZ, n=17 ; miRHG Def H99, n=20). On observe que dans les deux cas, les tumeurs sont mésenchymateuses, montrant que l'inhibition d'apoptose n'empêche pas la TEM induite par l'augmentation de tension jonctionnelle. Barres d'échelle (A) 50µm, (A') 10µm. Test statistique (B) t-test. \*\*\*\* p<0.0001.

*Ainsi, la tension jonctionnelle et l'apoptose peuvent agir via deux voies différentes. Si l'augmentation de tension jonctionnelle induit de l'apoptose qui favorise la TEM, elle peut également induire la TEM dans une tumeur, indépendamment de l'apoptose, permettant la progression tumorale chez la drosophile.*

Ainsi, l'ensemble des résultats de cette partie ont permis l'identification d'un nouveau mécanisme responsable de la progression tumorale en favorisant la transition d'une tumeur hyperplasique vers une tumeur dysplasique. Après avoir caractérisé au niveau cellulaire spatialement et temporellement deux contextes génétiques, l'un hyperplasique et l'autre dysplasique, j'ai pu montrer qu'une augmentation de tension

jonctionnelle induit la transition hyperplasie-dysplasie. J'ai également pu montrer que cette transition peut être induite *via* l'induction d'apoptose mais également *via* une voie indépendante de l'apoptose. L'induction d'apoptose conduit à une fragilisation des jonctions adhérentes et septées, accélérant le processus de TEM et la progression tumorale. L'ensemble de ces résultats est représenté sur la Figure 53.



**Figure 53 : Schéma bilan : la tension jonctionnelle induit la progression tumorale via deux mécanismes distincts**

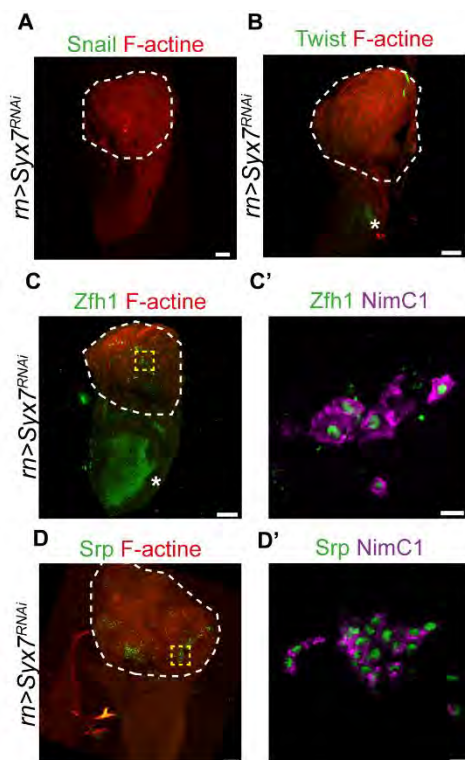
### 1.11 Vers l'identification d'une cible moléculaire responsable de la TEM dans un contexte tumoral

La TEM est un processus finement régulé et contrôlé par différents facteurs de transcription (FT). Parmi ces FT, on peut distinguer deux types : ceux dits pro-mésenchymateux et ceux dits pro-épithéliaux. Les FT pro-épithéliaux comme *Ovo* et *Grh* permettent de maintenir l'état épithélial de la cellule en favorisant l'expression de gènes spécifiques impliqués par exemple dans la formation des jonctions cellule-cellule et dans la mise en place et le maintien de la polarité apico-basale. A l'inverse, les FT dits pro-mésenchymateux comme *Snail*, *Twist* et *Zeb* (*zfh1* chez la drosophile) vont favoriser l'état mésenchymateux en (1) inhibant les gènes impliqués dans le maintien de l'état épithélial (jonctions adhérentes, polarité apico-basale...) et (2) en induisant l'expression de gènes impliqués dans l'état mésenchymateux (*N-cadhérine*, *Vimentine*...). La TEM est donc un processus finement régulé par une balance entre ces deux types de FT (Figure 17) (Nieto et al., 2016).



Je me suis donc demandé si l'augmentation de tension jonctionnelle ou l'apoptose, identifiés précédemment comme inducteurs de la TEM pouvaient le faire *via* l'activation ou l'inactivation d'un de ces FT. Pour tester cela, nous avons utilisé différentes lignées rapportrices pour ces FT (listés Figure 54E) et nous avons comparé leur niveau d'expression dans des cellules épithéliales et mésenchymateuses des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ . Ce travail a été réalisé avec Lara Fernandez Martinez, une étudiante en Master 1 que j'ai encadrée avec Bruno Monier.

Si les outils étaient bien fonctionnels (expression des FT dans les zones attendues, c'est-à-dire dans le notum pour Twist et Zfh1 et dans le disque d'œil-antenne pour Snail, Figure 54B, C astérisque) (Boukhatmi et al., 2020), de façon générale, nous n'avons détecté une expression dans la zone tumorale que pour les FT Zfh1 et Srp (Figure 54A-C, D). Néanmoins, les cellules marquées pour ces FT se sont par la suite révélés être des macrophages et non des cellules tumorales (Figure 54C', D') (Campbell et al., 2018; Melcarne et al., 2019).



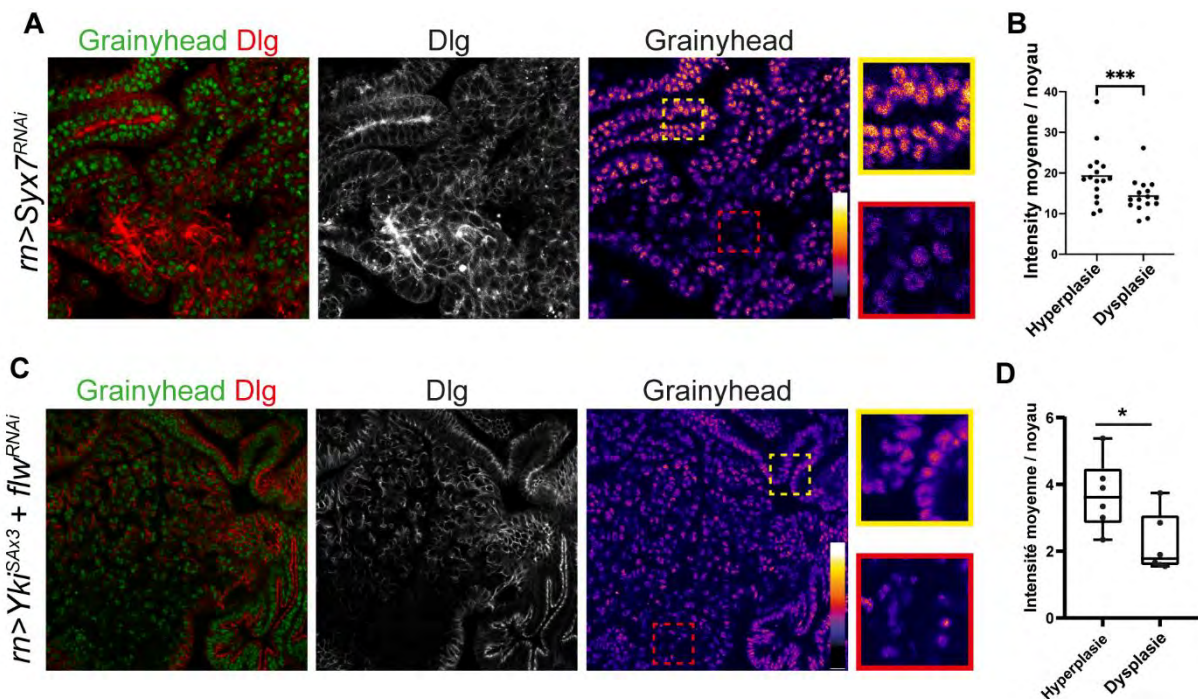
E

TF	Lignées testées	Origine	Bilan des résultats
Snail	318402	VDRC	pas d'expression observée
	93875	Bloomington	pas d'expression observée
	Snail <sup>KI</sup> -S10	InDroso	pas d'expression observée
Twist	79615	Bloomington	expression cellules précurseurs des muscles
Srp	318053	VDRC	expression macrophages
Zfh1	Zfh1-short-GFP	10.7554/eLife.35954	expression macrophages
	Zfh1-GFP	10.1242/dev.156315	expression macrophages + cellules précurseurs des muscles
Zfh2	38674	Bloomington	pas d'expression observée

**Figure 54 : Les FT pro-mésenchymateux ne sont pas exprimés dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$**

(A, B, C, D) Vues générales de tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  avec différents FT-GFP : Snail (A), Twist (B), Zfh1 (C), Srp (D). (C'-D') sont des zooms des zones en jaune en (C) et (D) respectivement avec un marquage NimC1 permettant de conclure que les cellules GFP sont en réalité des macrophages. (E) Tableau récapitulatif des lignées-GFP testées. La zone tumorale est entourée en pointillés blancs.

Puisque nous n'avons pas détecté les FT inducteurs de la TEM Snail, Twist Zfh1 et Srp dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , nous nous sommes par la suite intéressés aux FT responsables du maintien de l'état épithélial, comme *Grainyhead* (Grh) (Nieto et al., 2016). En utilisant une lignée Knock-in GFP pour Grh, nous avons constaté que ce FT était effectivement exprimé dans les cellules tumorales (Figure 55A). De manière intéressante, nous avons observé des niveaux d'expression différents entre les zones épithéliales et les zones mésenchymateuses (Figure 55A). En effet, les niveaux d'expression de Grh sont nettement diminués dans les zones mésenchymateuses par rapport aux zones épithéliales (Figure 55B) des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , ce qui est cohérent avec le rôle pro-épithélial de Grh.



**Figure 55 : Grh est réprimé dans les cellules mésenchymateuses des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  et  $Yki^{SAX3} + flw^{RNAi}$**

(A, C) Tumeur  $Syx7^{RNAi}$  et  $Yki^{SAX3} + flw^{RNAi}$  respectivement exprimant Grh-GFP. On trouve deux types de zones sur ces zooms : les zones en jaune sont des zones épithéliales, comme le montre le marquage Dlg tandis que les zones en rouge correspondent à des zones mésenchymateuses. (B, D) Quantifications de l'intensité de Grh-GFP par noyau pour des zones épithéliales (hyperplasie) et mésenchymateuses (dysplasie) pour les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  (B) et  $Yki^{SAX3} + flw^{RNAi}$  (D). Le nombre de disques analysés est de 16 (B) et de 6 (D). Tests statistiques (B-D) Mann Whitney. P-value : \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*  $p < 0.05$ .

Puisque Grh est réprimé dans les cellules mésenchymateuses des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , nous avons souhaité voir ce qu'il en était dans les cellules mésenchymateuses induites par l'augmentation de tension jonctionnelle dans le contexte  $Yki^{SAX3}$ . Les résultats ont

été similaires à ceux obtenus dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> : un niveau d'expression moins important dans les cellules mésenchymateuses induites par l'augmentation de tension jonctionnelle par rapport aux cellules épithéliales autour (Figure 55C, D). Ces résultats, bien que préliminaires et à confirmer, montrent donc que Grh est réprimé (1) dans les cellules mésenchymateuses qui surviennent naturellement dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et (2) dans celles induites par l'augmentation de tension jonctionnelle dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup>.

*Ces résultats suggèrent que Grh est un candidat particulièrement intéressant qui pourrait être un responsable moléculaire de la TEM induite par l'augmentation de tension jonctionnelle et l'apoptose dans un contexte tumoral chez la drosophile.*

## **2 Résultats complémentaires : caractérisation et étude fonctionnelle de MMP1 dans les tumeurs**

Dans la première partie, nous avons vu que l'apoptose favorisait la TEM dans un contexte tumoral chez la drosophile et que cela pouvait se faire *via* la fragilisation des jonctions adhérentes et septées.

Néanmoins, nous avons également considéré d'autres mécanismes d'action des cellules apoptotiques, notamment la sécrétion de Métalloprotéinases de la Matrice (MMP). En effet, des études ont montré que dans le développement, les cellules apoptotiques étaient capables de libérer des MMP, ce qui favorisait la digestion de la Matrice extracellulaire (MEC) et permettait la fusion des deux plaques formant ainsi le palais chez les mammifères (Cuervo and Covarrubias, 2004).

Ainsi, si nous n'avons pas observé d'altération de la MEC très tôt dans le développement tumoral des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (Figure 33), nous avons cependant constaté que celle-ci est dégradée à 120h ADO (Figure 33), pouvant ainsi suggérer la présence de MMP. Cette caractérisation a été réalisée avec Maëva Sautron, étudiante en Master 1 que j'ai encadrée avec Bruno Monier.

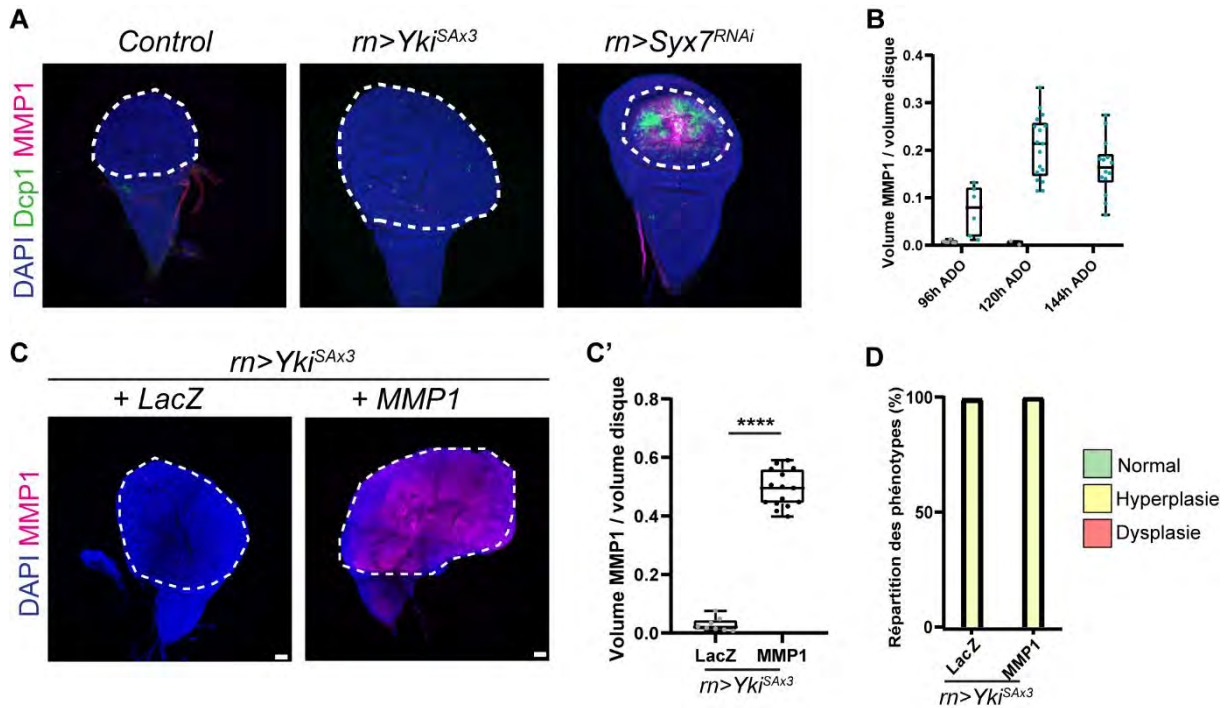


Si chez les mammifères, il existe plus d'une vingtaine de MMP, chez la drosophile, il n'en existe que deux : MMP1 qui est sécrétée et a été montrée comme impliquée dans la tumorigénèse (Lochter et al., 1997; Lodge et al., 2021) et MMP2 qui n'est pas sécrétée (Ramos-lewis and Page-mccaw, 2019). Nous nous sommes focalisées sur MMP1. A l'aide d'un anticorps dirigé contre MMP1, nous avons commencé par faire une cinétique des tumeurs et caractérisé la présence de MMP1 dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>. Nous avons constaté que, tout comme l'apoptose, MMP1 est présent de façon massive et ce, avant toute transformation du tissu à 96h ADO (Figure 56A, B). De plus, les niveaux de MMP1 augmentent pour atteindre un maximum à 120h ADO, moment où la MEC est dégradée (Figure 56B). A l'inverse, nous n'avons observé aucune MMP1 dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> (Figure 56A). Ici, nous avons donc une corrélation entre l'apoptose, la présence de MMP1 et l'évolution en tumeur dysplasique.

Nous avons par la suite souhaité tester le rôle de MMP1 dans le développement tumoral. En effet, si la présence de MMP a souvent été décrite comme associée à de mauvais pronostics ou permettant la formation de métastases (Egeblad and Werb, 2002), les MMP ont également été montrées comme pouvant induire la TEM (Sternlicht et al., 1999). Nous avons donc testé si la présence de MMP1 dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> était suffisante pour induire la TEM et permettre la progression tumorale. Si l'outil utilisé est particulièrement efficace puisqu'il permet d'induire de hauts niveaux de MMP1 dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> (Figure 56C, C'), cela n'a cependant eu aucun effet sur le développement tumoral puisque toutes les tumeurs observées étaient strictement épithéliales (Figure 56D). Néanmoins, il serait intéressant de tester l'expérience inverse dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>. En effet, puisque dans ce contexte, MMP1 est présente massivement et ce, juste avant la dégradation de la MEC et avant l'induction de la TEM, il serait intéressant de bloquer MMP1 et de voir si cela affecte la progression tumorale. Malheureusement faute de temps, cette expérience n'a pas pu être réalisée.

Cette étude, encore préliminaire a permis de faire une caractérisation détaillée de la présence de MMP1 dans les contextes tumoraux Syx7<sup>RNAi</sup> et Yki<sup>SAX3</sup>. Si MMP1 ne semble pas avoir d'effet sur la TEM dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup>, il est tout à fait possible que l'effet soit à distance. En effet, MMP1 a été montrée chez la drosophile comme impliquée dans un phénomène de cachexie. Ce phénomène, souvent associé à des

cancers avancés et à de mauvais pronostics chez l'homme, se traduit par une perte progressive des muscles squelettiques, du corps gras et une anorexie (Lodge et al., 2021). Il serait donc intéressant de regarder si dans les tumeurs  $Yki^{SAx3}$ , MMP1 ne serait pas également impliquée dans un phénomène de cachexie.



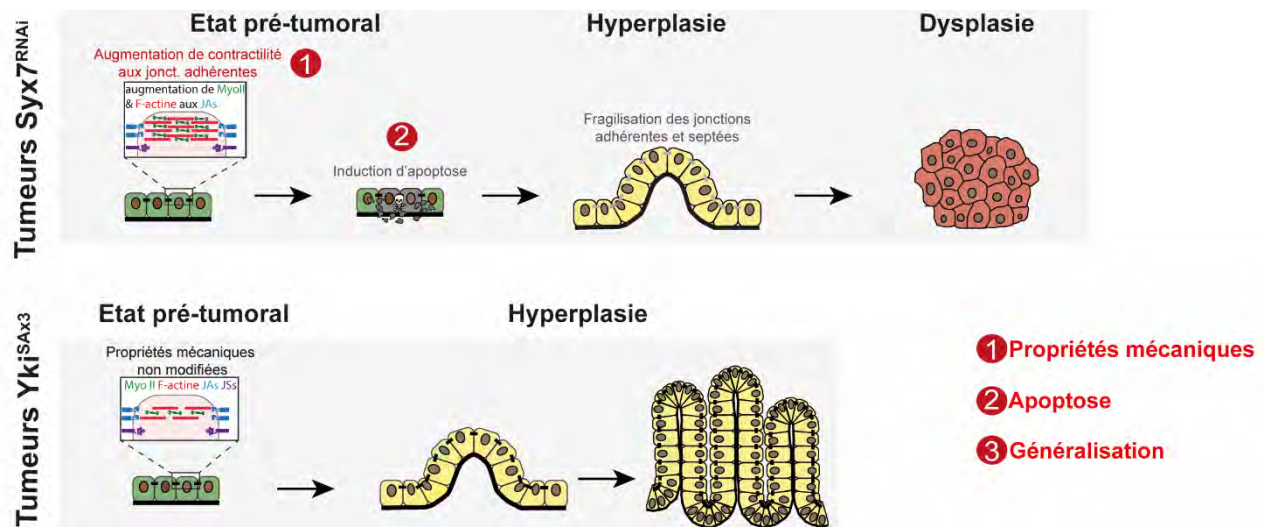
### Figure 56 : Expression et impact de MMP1 sur le développement des tumeurs

(A) Vues générales à 96h ADO d'un disque contrôle, d'une tumeur  $Yki^{SAx3}$  et d'une tumeur  $Syx7^{RNAi}$ . On observe une corrélation entre la présence de MMP1 et la présence d'apoptose uniquement dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  juste avant la TEM. (B) Quantification du volume de MMP1 par rapport au volume du disque dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  au cours du temps. Le nombre de disques analysés pour la condition contrôle (gris) et  $Syx7^{RNAi}$  (cyan) sont respectivement de 6 pour la 96h, 2 et 17 pour 120h et 14 pour 144h. (C) Vues générales de tumeurs  $Yki^{SAx3}$  contrôle (LacZ) et avec une surexpression de MMP1 (MMP1). La zone tumorale est délimitée par les pointillés. (C') Quantification du volume de MMP1 par rapport au volume du disque dans les tumeurs  $Yki^{SAx3}$  sans (LacZ, n=8) et après induction de MMP1 (MMP1, n=15). (D) Répartition des phénotypes observés sans (LacZ, n=8) et après induction de MMP1 (MMP1, n=15) dans des tumeurs  $Yki^{SAx3}$ . Barre d'échelle 50 $\mu$ m. Test statistique (C') t-test. \*\*\*\* p<0.0001.

# Discussion



Dans cette étude, j'ai ainsi pu mettre en évidence un rôle nouveau des propriétés mécaniques dans la tumorigénèse chez la drosophile. J'ai pu montrer qu'une modification des propriétés mécaniques, particulièrement une augmentation de tension au niveau des jonctions adhérentes, était suffisante pour induire le changement d'état de cellules épithéliales en cellules quasi-mésenchymateuses, permettant donc la conversion d'une tumeur hyperplasique en tumeur dysplasique. J'ai également pu mettre en évidence que cette transition se fait en grande partie grâce à l'induction d'apoptose. En effet, l'augmentation de tension jonctionnelle observée induit de l'apoptose qui, probablement en démantelant les jonctions adhérentes et septées, favorise le changement d'état des cellules. Ces résultats sont résumés en Figure 57.



**Figure 57 : Bilan de mes résultats de thèse**

Ce modèle ayant mis en évidence la tension jonctionnelle et l'apoptose comme des facteurs pro-tumoraux qui favorisent la transition hyperplasie-dysplasie, ce sont les deux aspects sur lesquels je vais me concentrer dans la discussion. Dans une troisième partie, je discuterai d'une éventuelle généralisation du processus identifié dans les contextes génétiques Syx7<sup>RNAi</sup> et Yki<sup>SAX3</sup>.

## 1 Propriétés mécaniques et tumorigénèse

Au cours de cette étude, j'ai pu observer que les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> présentent un phénotype bien particulier et ce, avant même que la tumeur ne se développe. En effet, j'ai observé la présence d'une accumulation de F-actine et de Myosine-II particulièrement importante et spécifiquement au niveau des jonctions adhérentes.

De nombreuses études ont cherché à déterminer le rôle des propriétés mécaniques des cellules tumorales sur la progression de la tumeur. Si les résultats sont parfois contradictoires, il en ressort néanmoins que les cellules, en devenant tumorales, semblent passer par un état transitoire de rigidité, associé à de la prolifération (Plodinec et al., 2012; Tavares et al., 2017; Wu et al., 2020; Zhang et al., 2002). Ces études, pour la plupart réalisées sur des cellules en culture, font référence à la « contractilité cellulaire », souvent associée à l'activation de Rho et ROCK. En effet, dans la plupart des études, les niveaux d'activation de Rho et ROCK constituent le principal facteur permettant de mesurer l'état mécanique des cellules : des hauts niveaux de Rho et ROCK sont associés à une forte contractilité cellulaire et donc une rigidité plus importante tandis qu'à l'inverse, de faibles niveaux sont associés à des cellules plutôt souples. La perturbation des propriétés mécaniques des cellules tumorales est d'ailleurs également faite de manière globale, *via* l'activation constitutive ou l'inhibition totale de Rho/ROCK dans la totalité des cellules, grâce à l'utilisation de mutants inductibles ou de drogues (Paszek et al., 2005; Rath et al., 2017; Samuel et al., 2011).

Contrairement à ce genre d'expériences, dans mes travaux, j'ai une résolution subcellulaire. Si à l'origine, j'ai commencé par observer les niveaux globaux de F-actine et Myosine-II dans la zone tumorale, par la suite je me suis focalisée sur les jonctions adhérentes où la Myosine-II s'accumule spécifiquement. J'ai d'abord montré que dans le contexte Syx7<sup>RNAi</sup>, avant la formation de la tumeur, la Myosine-II s'accumule aux jonctions adhérentes, induisant ainsi une augmentation de tension jonctionnelle, testée par ablation laser. De façon intéressante, cette augmentation de tension jonctionnelle n'était pas présente dans le deuxième contexte génétique que j'ai utilisé, Yki<sup>SAX3</sup>, suggérant que cette modification de propriétés mécaniques pourrait être spécifique d'un certain type de tumeurs, peut-être celles qui sont amenées à évoluer en dysplasie.



Si les propriétés mécaniques des cellules ont principalement été associées à une induction de prolifération dans la tumorigénèse, ici j'ai montré pour la première fois qu'elles pourraient également être responsables d'un changement d'état des cellules, passant d'un état épithélial à un état mésenchymateux, induisant par conséquent des tumeurs plus agressives. En effet, une augmentation de tension jonctionnelle, *via* l'utilisation de l'ARNi dirigé contre flapwing est suffisante pour induire la transition des tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> hyperplasiques, vers des tumeurs dysplasiques. Néanmoins, en utilisant cet outil, on peut se demander si, comme dans les études précédentes, on ne perturbe pas d'autres acteurs ou composants de la cellule. Il serait dans ce cas difficile de savoir si l'induction de la transition hyperplasie-dysplasie est effectivement due à l'augmentation de tension jonctionnelle ou la conséquence d'un autre mécanisme perturbé dans la cellule. C'est pourquoi, dans le contexte Yki<sup>SAX3</sup>, l'utilisation de l'AJ-GFP-Trap est particulièrement intéressante. En effet, en utilisant cet outil, la Myosine-II, déjà présente dans la cellule, est simplement relocalisée aux jonctions adhérentes. Ici, c'est donc la localisation de la Myosine-II dans la cellule que l'on modifie mais sans affecter d'autres cibles ou la quantité totale de Myosine-II dans la cellule. Aussi, dans mon cas, je suis confiante sur le fait que c'est bien la Myosine-II, localisée spécifiquement aux jonctions adhérentes qui induit la transition hyperplasie-dysplasie. Néanmoins, si dans cette étude, je me suis focalisée sur les propriétés mécaniques des jonctions adhérentes, j'ai également considéré l'impact des propriétés mécaniques de la Matrice extracellulaire (MEC) qui jouent un rôle clé dans la tumorigénèse chez les mammifères.

J'ai ainsi pu observer dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, qu'avant la formation de la tumeur, moment où la tension jonctionnelle est augmentée, que la MEC est toujours présente et ne semble pas modifiée par rapport à un disque contrôle, sur la base de l'intensité de fluorescence du Collagène IV et sur la répartition de la Taline, un composant mécanosensible qui réagit aux forces mécaniques (Klapholz and Brown, 2017). J'ai toutefois constaté que la MEC était dégradée lorsque les cellules tumorales étaient devenues mésenchymateuses. J'ai également observé la présence de Métalloprotéinases de la Matrice (MMP) dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et ce, très tôt dans le développement tumoral, avant la dégradation de la MEC.

Chez les mammifères, la MEC a été montrée comme jouant un rôle clé dans le développement tumoral en favorisant notamment la TEM et la migration de cellules en culture lorsqu'elle est rigide (Mekhdjian et al., 2017; Wei et al., 2015). Les MMP ont quant à elles été montrées dans des modèles de tumeurs drosophile montrées comme responsables du remodelage de la MEC, permettant ainsi la migration des cellules tumorales et la formation des métastases (Beaucher et al., 2007; Page-McCaw et al., 2003; Srivastava et al., 2007).

Dans mon cas, bien que je ne puisse pas exclure complètement le rôle de la MEC sur la transition hyperplasie-dysplasie, mes résultats montrent que (1) sa dégradation arrive après la TEM, (2) les modifications du cytosquelette d'actomyosine des cellules tumorales au niveau basal sont minimales par rapport à celles observées au niveau apical et (3) que la tension au niveau des jonctions adhérentes contrôle la TEM. Cela suggère fortement que si la MEC joue un rôle dans la progression tumorale, c'est probablement sur les étapes plus tardives comme lors de la formation des métastases par exemple, étape que je n'ai pas regardée au cours de ma thèse.

C'est donc au niveau des jonctions adhérentes spécifiquement que semblent jouer les propriétés mécaniques pour induire la transition hyperplasie-dysplasie.

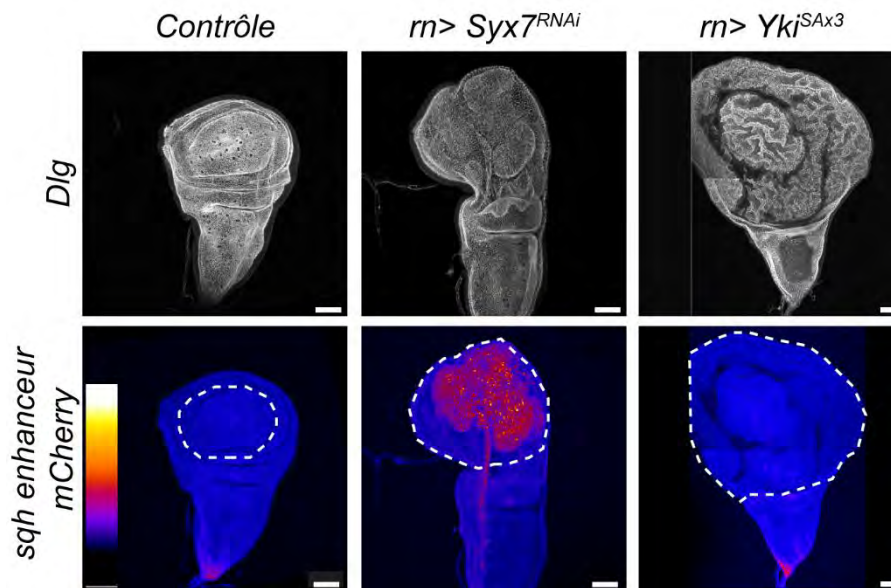
### 1.1 Quelle est l'origine de l'augmentation de tension jonctionnelle ?

Dans le cas des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , plus que spécifiquement au niveau des jonctions adhérentes, les propriétés mécaniques semblent être affectées de façon générale. En effet, j'ai observé une accumulation de Myosine-II au niveau des jonctions adhérentes mais également une légère augmentation au niveau basal, suggérant (1) un recrutement spécifique aux jonctions adhérentes, (2) une stabilisation de la protéine et/ou (3) une augmentation de la transcription.

En utilisant la lignée knock-in  $Sqh-GFP$  (qui permet de visualiser la chaîne régulatrice de la Myosine-II, Spaghetti Squash chez la drosophile), j'ai pu observer dans le cas des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  une accumulation de  $Sqh$ , spécifiquement au niveau des jonctions adhérentes, avant même que la tumeur ne se forme. A l'inverse dans le contexte  $Yki^{SAx3}$ , je n'ai pas observé d'accumulation de  $Sqh$  dans la zone tumorale, les niveaux protéiques étant même plus faibles que dans le cas d'un disque contrôle. Ces

résultats montrent qu'il y a effectivement un recrutement spécifique de Myosine-II aux jonctions adhérentes.

Néanmoins, pour compléter ces résultats, j'ai par la suite testé s'il y avait également une augmentation transcriptionnelle. Pour cela, j'ai utilisé une lignée dans laquelle une protéine fluorescente, mCherry, est sous contrôle d'un enhanceur de *spaghetti squash* (*sqh*), la chaîne régulatrice de la Myosine-II chez la drosophile. Cette lignée permet donc de rapporter, au moins en partie, l'expression du gène *sqh*. J'ai donc utilisé cette construction dans les deux contextes tumoraux utilisés : Syx7<sup>RNAi</sup> et Yki<sup>SAX3</sup>. De façon intéressante, les résultats obtenus semblent cohérents avec ce que nous avons observé au niveau protéique : dans le cas des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, on observe une forte augmentation de l'expression de mCherry dans la zone tumorale (Figure 58), suggérant une forte expression de *sqh* tandis que les niveaux ne semblent pas modifiés dans le contexte Yki<sup>SAX3</sup> (Figure 58). Ces résultats, bien que préliminaires suggèrent que l'accumulation de Myosine-II observée au sein de la tumeur Syx7<sup>RNAi</sup> pourrait être favorisée par une surexpression au niveau transcriptionnel. Néanmoins, pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de compléter ces résultats en vérifiant dans un premier temps l'expression de *sqh* en réalisant une hybridation *in situ*. En effet, si les résultats semblent cohérents avec ce que nous avons observé au niveau protéique, ici il faut garder en tête que dans la lignée utilisée, mCherry n'est sous le contrôle que d'un seul enhanceur de *sqh* et ne rapporte peut-être donc pas exactement l'expression de *sqh*. Par la suite, il serait intéressant de regarder plus tôt dans le développement des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>. En effet, ici, l'expression de *sqh* a été regardée dans des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> à un stade avancé, lorsque les tumeurs sont déjà devenues dysplasiques. Il serait maintenant intéressant de regarder à un stade beaucoup plus précoce, lorsque la tumeur n'est pas encore formée pour voir si l'augmentation de Myosine-II observée à 96h ADO serait effectivement due à une modification du programme transcriptionnel de *sqh*. Si c'est le cas, cela pourrait indiquer que la modification de l'expression de *sqh* pourrait peut-être être un marqueur très précoce des tumeurs agressives.



**Figure 58 : L'augmentation protéique de Sqh est due à une augmentation transcriptionnelle**

Projections maximums, de disques contrôle, de tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* et de tumeurs *Yki<sup>SAx3</sup>* dans lequel on peut visualiser l'expression du gène *sqh* codant pour la chaîne régulatrice de la Myosine-II. La zone précurseur de l'aile, zone d'induction de la tumeur, est délimitée par des pointillés. On note que dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>*, le gène *sqh* est largement surexprimé par rapport au reste du disque, tandis que les niveaux d'expression ne semblent pas modifiés dans les tumeurs *Yki<sup>SAx3</sup>*. Barre d'échelle 50µm

Ainsi, ces résultats montrent donc que l'accumulation jonctionnelle de Myosine-II observée dans les tumeurs *Syx7<sup>RNAi</sup>* est le résultat d'un recrutement spécifique de la Myosine-II aux jonctions adhérentes mais pourrait également être facilitée par une augmentation transcriptionnelle de *sqh*.

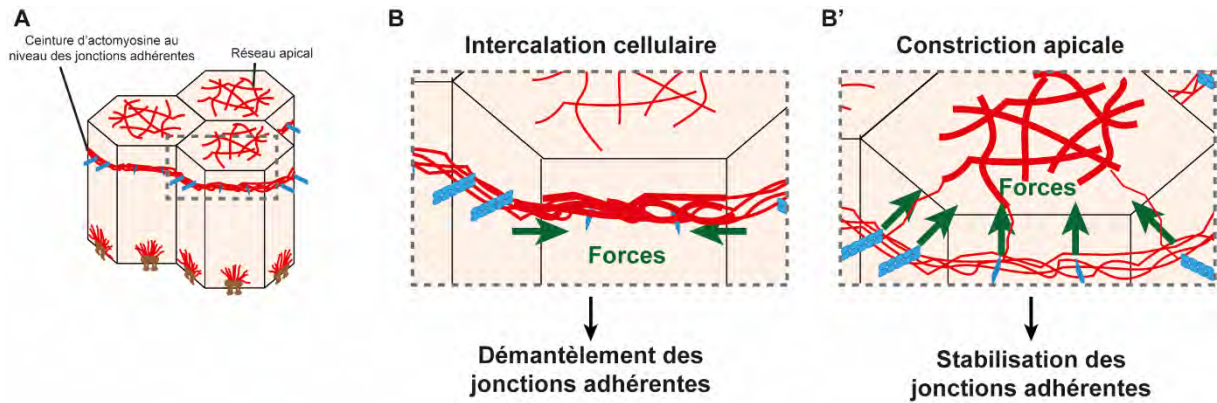
Toutefois, l'augmentation transcriptionnelle ne semble pas être un prérequis pour induire la transition hyperplasie-dysplasie puisque les expériences réalisées dans le contexte *Yki<sup>SAx3</sup>* avec l'AJ-GFP-Trap montrent que la relocalisation de la Myosine-II déjà présente dans la cellule est suffisante pour induire la transition hyperplasie-dysplasie, sans qu'il n'y ait eu d'augmentation transcriptionnelle.

Aussi, si dans le contexte *Syx7<sup>RNAi</sup>*, les résultats suggèrent qu'il y a une augmentation transcriptionnelle de *sqh*, c'est la relocalisation aux jonctions adhérentes qui joue un rôle clé dans la transition hyperplasie-dysplasie. Néanmoins, plusieurs questions restent toujours sans réponse : (1) quels sont les mécanismes qui permettent de localiser spécifiquement la Myosine-II aux jonctions adhérentes ? et (2) comment cette augmentation de tension jonctionnelle agit pour induire la transition hyperplasie-dysplasie ?

## 1.2 Comment l'augmentation de tension jonctionnelle agit pour induire la transition hyperplasie-dysplasie ?

### 1.2.1 Un effet mécanique direct sur la stabilité/intégrité des jonctions adhérentes ?

Au cours du développement, les forces induites par la Myosine-II peuvent avoir des effets très différents sur les jonctions adhérentes. Au cours de l'invagination du mésoderme par exemple, la contraction du réseau apical de Myosine-II conduit à une stabilisation des jonctions adhérentes, permettant ainsi de prévenir leur démantèlement (Figure 59B') (Weng and Wieschaus, 2016). A l'inverse, au cours de l'élongation de la bande germinale, les forces induites par la Myosine-II le long des jonctions adhérentes conduisent à un démantèlement des jonctions en induisant l'endocytose de la E-cadhérine (Figure 59B) (Levayer et al., 2011). Ainsi, en fonction du réseau de Myosine-II et de l'orientation des forces sur les jonctions adhérentes, les effets peuvent être opposés (Figure 59). Néanmoins, il est important de garder en tête que dans ces deux études, les tissus étudiés ne sont pas les mêmes puisque dans un cas il s'agit du mésoderme et dans l'autre de l'ectoderme. Pour éviter cette différence et étudier spécifiquement l'impact des différents réseaux de Myosine-II sur les jonctions adhérentes, Kale et al. se sont placés dans les cellules de l'ectoderme uniquement. Ils ont pu montrer qu'en augmentant spécifiquement les niveaux de la Myosine-II apicale dans ces cellules (grâce à la surexpression de *Concertina*, un régulateur de Rho1), cela induit un recrutement de Vinculine et donc une stabilisation des jonctions adhérentes. A l'inverse, une potentialisation des forces générées par la Myosine-II le long des jonctions adhérentes (que les auteurs décrivent comme une force de cisaillement), induite par l'ablation laser de jonctions voisines, conduit à une déstabilisation de la E-cadhérine. Ensemble, ces résultats montrent que, indépendamment du type de tissu, c'est effectivement l'orientation des forces appliquées par les différents réseaux de Myosine-II qui va jouer sur la stabilisation ou le démantèlement des jonctions adhérentes (Kale et al., 2018).



### Figure 59 : Impact de la Myosine-II sur les jonctions adhérentes

(A) Schématisation des différents réseaux d'actomyosine que l'on retrouve au sein de la cellule, notamment les réseaux apicaux et au niveau des jonctions adhérentes, sur lesquels je vais me concentrer. (B-B') Schématisation de l'impact des forces mécaniques sur les jonctions adhérentes au cours de l'intercalation cellulaire (B) et de la constriction apicale observée par exemple lors de l'invagination du mésoderme chez la drosophile (B'). Dans les deux cas, les forces ne sont pas induites par les mêmes réseaux d'actomyosine (au niveau des jonctions pour l'intercalation cellulaire et au niveau apical pour la constriction apicale) et l'orientation des forces est également différentes. Ces différences pourraient expliquer l'effet différentiel pour les jonctions adhérentes.

Si dans mon cas, je me suis focalisée sur les jonctions adhérentes, certainement au niveau de la ceinture de Myosine-II, je ne sais pas comment sont organisés les autres réseaux, et notamment le réseau apical. En effet, pour toutes nos analyses et observations, nous nous sommes basés sur des coupes sagittales, permettant d'observer la cellule le long de son axe apico-basal. Néanmoins, en réalisant les images de cette manière, il est impossible de visualiser nettement le cortex apical d'actomyosine. C'est pourquoi, il serait intéressant de réimager des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  en se focalisant sur la surface apicale. Cela permettrait de mieux comprendre quels sont les réseaux et forces appliqués sur les jonctions adhérentes et de comprendre leurs effets. Réaliser des expériences d'imagerie en temps réel, où l'on pourrait visualiser en même temps la Myosine-II et les jonctions adhérentes, nous permettrait d'avoir une vision de la dynamique existante entre ces deux acteurs. Ici, on pourrait par exemple imaginer que l'augmentation de tension jonctionnelle, causée par la ceinture aux jonctions adhérentes pourrait induire un démantèlement des jonctions adhérentes, de façon similaire à ce qui a été observé lors de l'élongation de la bande germinale. En effet, la contraction de la Myosine-II au niveau des jonctions adhérentes conduit à un raccourcissement de ces jonctions (Bertet et al., 2004; Kale et al., 2018; Rauzi et al., 2010) et à l'endocytose de la E-cadhérine (Levayer et al., 2011). Dans le cas des tumeurs, il est possible que l'accumulation de Myosine-II aux jonctions

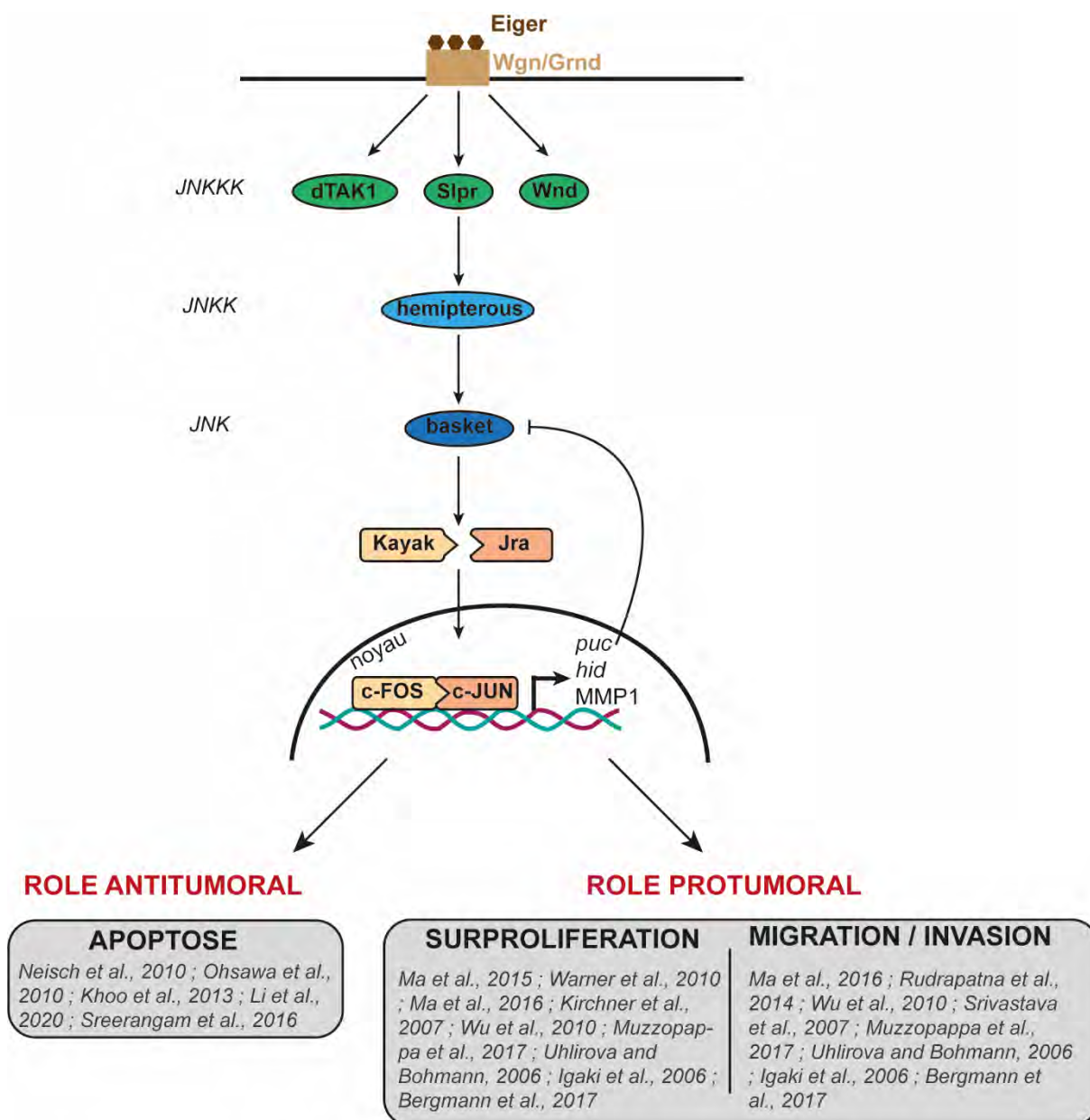


adhérentes conduise également à un raccourcissement des jonctions, induisant ainsi la déformation de la membrane plasmique qui formerait alors des petits bourgeonnements. Le système d'endocytose pouvant être activé par les forces mécaniques (Cavanaugh et al., 2020), il pourrait alors se mettre en place pour éliminer ce « surplus » de membrane, éliminant en même temps petit à petit la E-cadhérine, ce qui perturberait l'identité épithéliale de la cellule et induirait la transition vers un état mésenchymateux.

### *1.2.2 Un effet à plus long terme via l'activation de mécanismes de mécanotransduction ?*

Si l'effet de la Myosine-II pourrait être à court terme, en jouant directement sur les jonctions adhérentes, il est également possible qu'elle ait un effet sur du plus long terme *via* une cascade de mécanotransduction. En effet, il est connu que les jonctions adhérentes sont des sites importants pour la mécanotransduction. En réagissant aux forces qui s'y appliquent, le complexe des jonctions adhérentes réagit, change de conformation (l' $\alpha$ -caténine s'ouvre et permet le recrutement de la Vinculine) et transmet un signal à l'intérieur de la cellule (Yao et al., 2014; Yap et al., 2018). Dans notre cas, il n'est donc pas étonnant que l'augmentation de tension jonctionnelle puisse induire un changement à l'intérieur de la cellule.

On pourrait par exemple imaginer que l'augmentation de tension jonctionnelle induise l'activation de voies de signalisations, comme par exemple la voie JNK (pour c-Jun N-terminal Kinase), (Figure 60) une voie essentielle pour la formation de tumeurs (La Marca and Richardson, 2020). En effet, il a été montré qu'il existe un lien étroit entre les propriétés mécaniques d'un tissu et l'activation de la voie JNK. Généralement déclenchée par la fixation de son ligand TNF $\alpha$  (Eiger chez la drosophile) sur l'un de ses récepteurs membranaires, plusieurs études ont montré que des régulateurs du cytosquelette d'actomyosine peuvent aussi activer la voie JNK dans plusieurs contextes tumoraux (Ma et al., 2015; Rudrapatna et al., 2014; Warner et al., 2010) et non tumoraux (Kirchner et al., 2007; Neisch et al., 2010).



### Figure 60 : Voie de signalisation JNK chez la drosophile

La fixation du ligand Eiger sur ses récepteurs Wengen (Wgn) et Grindelwald (Grnd) induit l'activation des kinases dTAK, Slipper (slpr) et Wallenda (Wnd) qui vont à leur tour activer hemipterous qui va activer basket et induire la translocation des facteurs de transcription Kayak et Jun-related-antigen (Jra) qui vont pouvoir activer différents gènes cible. La voie JNK a été montrée comme ayant à la fois un rôle antitumoral et un rôle pro-tumoral, selon les contextes. En bas de la figure sont mentionnés quelques études (liste non exhaustive) qui ont montré ces différents rôles dans la tumorigénèse.

La voie JNK est une voie de signalisation impliquée notamment dans l'induction d'apoptose des cellules anormales (Dhanasekaran and Reddy, 2008). Néanmoins, des études ont également montré que si cette voie peut avoir un rôle protecteur, au sein des cellules tumorales elle participe activement au processus de tumorigénèse. Elle a par exemple été décrite dans plusieurs modèles de tumeurs comme favorisant

la prolifération des cellules tumorales (La Marca and Richardson, 2020). La voie JNK a également été associée à la formation de tumeurs dysplasiques, dans le cas d'une coopération avec une mutation de Raf (Khoo et al., 2013) ou encore dans le cas d'une coopération entre les mutations Ras<sup>V12</sup> et scrib<sup>-/-</sup>. Ainsi, une étude de Wu et al. a permis de montrer que la mutation scrib<sup>-/-</sup>, qu'elle soit au sein de la même cellule exprimant Ras<sup>V12</sup> ou dans la cellule voisine, induit l'activation de la voie JNK dans la cellule exprimant Ras<sup>V12</sup>, entraînant la formation d'une tumeur massive et invasive (Wu et al., 2010) (Figure 60). Dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et Yki<sup>SAX3</sup>, l'augmentation de la tension jonctionnelle induit à la fois le changement d'état de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses de façon concomitante avec l'induction d'apoptose. Au vu du lien existant entre cytosquelette d'actomyosine et activation de la voie JNK et du rôle de cette voie dans l'induction d'apoptose et dans la progression tumorale, il est tout à fait envisageable que la voie JNK soit, au moins en partie, le chaînon manquant entre les jonctions adhérentes et le changement d'état des cellules dans notre modèle.

Pour tester cela, il serait intéressant de caractériser la voie JNK dans les modèles de tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et Yki<sup>SAX3</sup>. Une précédente étude a montré, en étudiant l'expression d'une cible de la voie, *puc*, que la voie JNK est activée dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> et ce, avant même la formation de la tumeur (Colombani et al., 2012), ce qui semble cohérent avec la présence de MMP1 que nous avons observée. Puisque nous n'avons pas observé de MMP1 dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup>, cela suggère que la voie JNK n'y serait pas activée et qu'elle pourrait donc avoir un rôle important spécifiquement dans les tumeurs amenées à évoluer en dysplasie. Pour tester cela, il serait intéressant d'inhiber la voie JNK dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> (en utilisant un dominant-négatif contre *basket* par exemple) ou au contraire de l'activer dans les tumeurs Yki<sup>SAX3</sup> (en utilisant une forme constitutive active d'*hemipterous*) et d'observer si cela impacte à la fois la présence d'apoptose et la transition hyperplasie-dysplasie.

Dans un second temps, il serait intéressant de tester l'impact des forces mécaniques sur l'activation de cette voie. Dans la littérature, il est décrit que les régulateurs RhoGEF2, Rho1 et Rok ainsi que l'utilisation d'un mutant flw induisent l'activation de la voie JNK (Brumby et al., 2011; Khoo et al., 2013; Kirchner et al., 2007; Neisch et al., 2010; Warner et al., 2010). Dans notre modèle de tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, l'origine de l'augmentation de tension jonctionnelle est toujours inconnue et puisque nous n'avons pas identifié d'outils pour la réduire efficacement, il sera donc difficile à court terme de

tester la potentielle contribution des forces à l'activation de la voie JNK. En revanche, dans les tumeurs  $Yki^{SAx3} + flw^{RNAi}$ , il serait intéressant de tester si la voie JNK est activée, grâce aux rapporteurs de la voie MMP1 et *puc*. Si la voie JNK se trouve activée dans les tumeurs  $Yki^{SAx3}$  par l'augmentation des forces causées par la perte de *flapwing*, l'étape suivante serait de bloquer la voie JNK (par l'utilisation d'un dominant négatif contre *basket*) dans ces tumeurs modifiées afin de voir si cela bloque la transition hyperplasie-dysplasie.

Néanmoins, ce qui est particulièrement intéressant ici, c'est que ce signal semble être spécifique des cellules tumorales. En effet, en testant le  $flw^{RNAi}$  et l'AJ-GFP-Trap dans un contexte développemental, j'ai observé que si cela induisait effectivement une augmentation de tension jonctionnelle, cela ne perturbait absolument pas la cellule qui conservait sa polarité apico-basale et restait strictement épithéliale. Au contraire, dans les tumeurs  $Yki^{SAx3}$ , l'augmentation de tension jonctionnelle est suffisante pour induire la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Si dans les deux cas, la tension jonctionnelle est augmentée, l'effet dans la cellule est radicalement différent et il serait intéressant de comprendre pourquoi.

On peut imaginer que certaines mutations, sensibilisent les cellules tumorales, leur conférant des propriétés cellulaires particulières qui restent à déterminer et qui modifieraient la réponse de la cellule suite à un signal mécanique. Il serait donc intéressant de tester l'impact de l'augmentation de tension jonctionnelle dans d'autres contextes hyperplasiques pour voir s'il s'agit d'un mécanisme spécifique du contexte  $Yki^{SA3}$  ou au contraire d'un mécanisme général aux cellules ayant une prolifération incontrôlée.

Si la voie de mécanotransduction est probablement différente entre cellules normales et cellules tumorales, on peut aussi imaginer que les cibles finales de la voie le soient également. Dans les tumeurs, une des cibles de la mécanotransduction pourrait être le facteur de transcription Grainyhead (Grh). En effet, que ce soit dans le contexte  $Syx7^{RNAi}$ , où l'augmentation de tension jonctionnelle est présente spontanément, ou dans le contexte  $Yki^{SAx3}$  transformé en dysplasie, suite à l'augmentation de tension jonctionnelle, les niveaux d'expression de Grh sont plus faibles dans les cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales. Cela semble cohérent avec son rôle dans le maintien de l'état épithélial (Nieto et al., 2016). Néanmoins, pour aller plus loin, il serait intéressant de tester l'impact direct des forces sur l'expression de

Grh. En effet, si jusqu'à présent, les niveaux d'expression corrèlent avec l'état de la cellule (épithélial ou mésenchymateux), je ne sais pas si cette différence d'expression est due aux forces ou non. Pour cela, il serait intéressant de regarder les niveaux d'expression de Grh, très tôt dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, à 96h ADO. En effet, jusqu'à présent, j'ai regardé l'expression de Grh dans des tumeurs déjà devenues dysplasiques. En regardant à 96h ADO dans les tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup>, moment où les cellules tumorales sont toujours épithéliales, il serait intéressant de voir si, déjà à ce stade, les niveaux de Grh sont modifiés ou non. Si Grh est effectivement une cible de la mécanotransduction, il est possible qu'à 96h ADO, suite à l'augmentation de tension jonctionnelle, ses niveaux d'expression soient déjà modifiés et que cela participe par la suite à induire la transition hyperplasie-dysplasie. Si tel est le cas, Grh pourrait alors servir de marqueur pour un crible visant à identifier des gènes impliqués dans cette sensibilité aux signaux mécaniques spécifique des cellules tumorales.

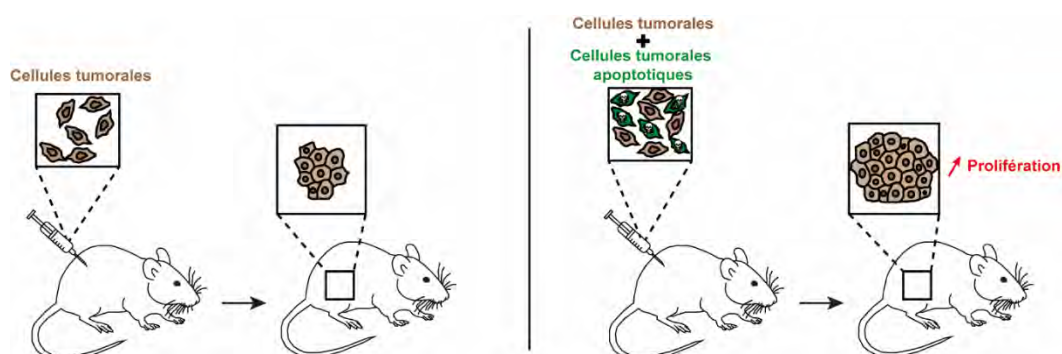
Toutefois, lorsque le processus de TEM commence, on peut observer un effet immédiat comme la dégradation des protéines des jonctions adhérentes par exemple. Pour compléter cet effet et maintenir les cellules dans un état mésenchymateux, on observe également une réaction à plus long terme qui permet notamment la répression des gènes impliqués dans le maintien de l'état épithélial, dont *grainyhead* fait partie. Il est donc tout à fait possible que la diminution des niveaux d'expression de Grh soit en réalité une conséquence de la TEM plus qu'une cause. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de tester le rôle direct de Grh sur la transition hyperplasie-dysplasie. Puisque Grh est réprimé dans les cellules mésenchymateuses, il pourrait être intéressant de maintenir son expression dans les cellules des tumeurs Syx7<sup>RNAi</sup> pour voir si cela bloquerait la transition vers un état mésenchymateux. En parallèle, il serait intéressant de tester si, en inhibant Grh dans les cellules strictement épithéliales qui constituent la tumeur Yki<sup>SAX3</sup>, cela permettrait d'induire leur transition vers un état mésenchymateux.

Ces expériences permettront à terme d'avoir une meilleure compréhension des acteurs mis en jeu lors de la transition hyperplasie-dysplasie.

## 2 Apoptose et tumorigénèse

Si l'augmentation de tension jonctionnelle peut agir *via* la mécanotransduction, j'ai également montré dans cette étude qu'une conséquence inattendue de la conversion de forces en signal biochimique était l'induction de l'apoptose.

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée est un processus permettant l'élimination de cellules au cours du développement et joue un rôle de contrôle qualité chez l'adulte. Elle permet par exemple de prévenir l'apparition de cancer en permettant l'élimination des cellules anormales et empêcher qu'elles ne surprolifèrent (Pérez-Garijo and Steller, 2015). Considérée donc comme un mécanisme antitumoral, la résistance accrue à l'apoptose est d'ailleurs une des principales caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2000). Néanmoins, quelques études montrent que si l'apoptose est là normalement pour nous protéger, dans le cas de la progression tumorale, son rôle peut être un peu plus compliqué. En effet, une étude a montré qu'il existait une corrélation entre la présence d'apoptose et l'augmentation du grade de lymphomes non-Hodgkiniens (Leoncini et al., 1993). Par la suite, d'autres études réalisées chez la souris ont mis en évidence que l'apoptose favorise la progression tumorale en promouvant notamment la prolifération des cellules tumorales. En effet, l'injection de cellules tumorales combinées à des cellules apoptotiques tumorales dans des souris induit une prolifération nettement plus importante des cellules tumorales que lorsqu'elles sont injectées seules (Figure 61) (Ford et al., 2015; Huang et al., 2011). L'apoptose a donc dans ce cas, un effet pro-tumoral en favorisant la prolifération des cellules tumorales.



**Figure 61 : Les cellules apoptotiques tumorales favorisent la prolifération des cellules tumorales autour**

Schématisation des expériences menées dans les études (Ford et al., 2015; Huang et al., 2011). L'injection des cellules tumorales, combinées à des cellules tumorales apoptotiques induit une prolifération plus importante des cellules tumorales autour.



Le fait que l'apoptose puisse induire la prolifération des cellules voisines a initialement été mis en évidence grâce à des études réalisées chez la drosophile. Une cellule apoptotique étant très rapidement éliminée, étudier son impact sur les cellules voisines peut donc s'avérer difficile. Aussi, chez la drosophile il est possible d'induire ce que l'on appelle des « cellules non-mortes » (« undead cells » en anglais). Dans ces cellules, l'apoptose est induite génétiquement grâce à l'expression d'un gène pro-apoptotique mais la fin de la cascade apoptotique est bloquée avec l'utilisation de p35 qui inhibe les caspases effectrices. Les cellules commencent donc le processus apoptotique sans pouvoir le terminer. Dans cet état « bloqué », il a été mis en évidence que les cellules non-mortes relarguent un certain nombre de signaux mitogéniques comme Dpp et Wg favorisant la prolifération des cellules voisines et pouvant même conduire à la formation de tumeurs (Pérez-Garijo et al., 2005; Perez-Garijo et al., 2009). Plus récemment, dans un modèle de cellules de mélanome et *in vivo* dans un modèle de poisson-zèbre, une étude a montré qu'un processus apoptotique ne se déroulant pas correctement augmente l'invasion de ces cellules. Dans cette étude, les auteurs développent un modèle « d'apoptose ratée » (« failed apoptosis ») dans lequel les cellules activent le processus apoptotique mais la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ne se faisant pas correctement, les cellules ne finissent pas le processus et ne sont donc pas éliminées. Ils montrent que dans ce cas, les cellules ayant initié mais pas terminé le processus arborent une signature transcriptomique bien particulière qui leur confère des capacités d'invasion et de migration (Berthenet et al., 2020), ainsi qu'une résistance aux traitements thérapeutiques (Kalkavan et al., 2022).

Si ces études pointent effectivement vers un rôle pro-tumoral de l'apoptose, il est important de garder en tête que dans ce cas, les cellules sont maintenues de façon artificielle dans un état non physiologique. Dans mon modèle, si la présence de cellules non-mortes ne peut pas être complètement exclue, j'ai cependant pu observer (1) un marquage de la forme activée de Dcp1, (2) la présence de fragments apoptotiques et (3) de l'ADN fragmenté (révélé par le DAPI) suggérant donc que les cellules apoptotiques finissent le processus et ne restent pas bloquées dans cet état artificiel. Ici, j'ai donc montré un rôle pro-tumoral des cellules apoptotiques qui surviennent spontanément dans les tumeurs et qui terminent le processus apoptotique.

De façon intéressante, les études présentées précédemment montrent un rôle pro-tumoral des cellules apoptotiques, principalement relié à la prolifération des cellules tumorales (Ford et al., 2015; Huang et al., 2011). Dans mon modèle en revanche, j'ai démontré un nouveau rôle des cellules apoptotiques dans la progression tumorale puisqu'elles induisent le changement d'état d'une cellule épithéliale vers une cellule mésenchymateuse permettant ainsi la progression d'une tumeur hyperplasique vers une tumeur dysplasique.

Dans mes travaux, j'ai montré que les cellules apoptotiques, présentes dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ , induisent le changement d'état de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. J'ai également montré que la présence d'apoptose corrèle avec une diminution de l'intensité des jonctions adhérentes et septées dans les deux contextes génétiques  $Syx7^{RNAi}$  et  $Yki^{SAx3}$ , suggérant que l'apoptose fragilise les jonctions intercellulaires. Si l'identité épithéliale est en partie définie par la polarité apico-basale, elle l'est également par la présence de jonctions intercellulaires (Buckley and St Johnston, 2022b). La dégradation des jonctions adhérentes fait d'ailleurs partie des étapes précoces de la TEM (Nieto et al., 2016). Aussi, il est fort probable que la fragilisation des jonctions observée dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  et  $Yki^{SAx3}$  soit responsable, ou tout du moins contribue grandement au changement d'état de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses.

Si les mécanismes impliqués dans ce changement d'état n'ont pas encore été identifiés, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La protéine  $\beta$ -caténine, associée aux jonctions adhérentes joue un rôle majeur dans la voie Wnt/ $\beta$ -cat. Souvent fortement affectée dans de nombreux cancers (Taciak et al., 2018), il est tout à fait envisageable qu'elle joue un rôle clé dans notre contexte. En effet, la fragilisation des jonctions adhérentes pourrait libérer  $\beta$ -caténine qui pourrait alors transloquer dans le noyau et, en s'associant à d'autres facteurs, induire la transcription de gènes cibles, responsables de la transition vers un état mésenchymateux.

Un autre mécanisme d'action pourrait être *via* le relargage de facteurs diffusibles. En effet, il est connu que les cellules apoptotiques relarguent un certain nombre de facteurs comme par exemple des signaux « trouve moi » (« find me ») et « mange-moi » (« eat me ») (Trahtemberg and Mevorach, 2017). Ces signaux permettent aux cellules du système immunitaire, et notamment aux macrophages, de localiser les cellules mortes pour ensuite les phagocyter et nettoyer le tissu. De plus, dans les cas

de cancers chez les mammifères, les macrophages sont connus pour libérer des cytokines favorisant la progression tumorale (Dongre and Weinberg, 2019). Je me suis donc demandée si les cellules apoptotiques pouvaient induire la transition hyperplasie-dysplasie en recrutant les macrophages qui pourraient, en relarguant des cytokines, induire la progression tumorale. Néanmoins, dans le modèle  $Syx7^{RNAi}$ , si l'apoptose est massive et ce, très tôt dans le développement tumoral, avant la transition hyperplasie-dysplasie, les macrophages (hémocytes chez la drosophile), n'arrivent au niveau de la tumeur que plus tardivement, bien après la transition hyperplasie-dysplasie, suggérant donc qu'ils ne sont pas responsables de la transition. Toutefois, il est possible que ces macrophages soient impliqués dans la progression plus tardive de la tumeur. En effet, si dans certaines tumeurs chez la drosophile, les macrophages ont été montrés comme induisant la prolifération des cellules tumorales (Bergmann et al., 2017; Diwanji and Bergmann, 2020; Fogarty et al., 2016), il est également possible qu'ils puissent favoriser la dissémination de métastases par exemple, chose que je n'ai pas regardée.

Néanmoins, les cellules apoptotiques sont également capables de relarguer d'autres facteurs que les signaux « trouve moi » et « mange-moi ». Une étude a montré chez l'hydre, que lorsque la tête est coupée, les cellules apoptotiques situées au niveau du site de coupure, libèrent des facteurs mitogéniques induisant la prolifération des cellules voisines ce qui permet la régénération de la tête (Chera et al., 2009). De plus, une autre étude a montré dans un modèle de cellules de glioblastomes que les cellules apoptotiques tumorales pouvaient, en se fragmentant, encapsuler dans des petites vésicules des composants de la machinerie d'épissage. Internalisées par les cellules tumorales survivantes autour, ces petites vésicules modifient l'épissage des ARNm de ces cellules tumorales, modifiant ainsi leur phénotype (Pavlyukov et al., 2018). Dans mon modèle, il est possible que les cellules apoptotiques, en se fragmentant relarguent également des facteurs, de nature diverse et que cela induise la transition d'un état épithélial à un état mésenchymateux des cellules autour. Pour tester cela, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de co-culture entre des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  où il y a beaucoup d'apoptose et des tumeurs  $Yki^{SAX3}$  sans apoptose. Si les cellules apoptotiques des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  relarguent effectivement des facteurs diffusibles, ils pourraient dans ce cas diffuser et agir sur les tumeurs  $Yki^{SAX3}$  en favorisant la transition hyperplasie-dysplasie.

De façon générale, le rôle pro-tumoral de l'apoptose commence à émerger dans certains contextes mais est encore mal compris. Les cellules apoptotiques pourraient donc agir à différents moments du processus apoptotique : en fragilisant les jonctions intercellulaires lorsque la cellule quitte l'épithélium mais également plus tard, lorsqu'elle est fragmentée en relarguant des facteurs pouvant influencer les cellules autour. Ainsi, si induire la mort par apoptose des cellules tumorales est le but principal des traitements actuels comme la chimiothérapie, ici il ressort que dans certains cas, la présence de cellules apoptotiques joue un rôle pro-tumoral et pourrait même favoriser la repopulation par les cellules cancéreuses après traitement. Une étude a d'ailleurs montré que les cellules tumorales apoptotiques qui surviennent après traitement par irradiation, favorisent la prolifération des cellules tumorales survivantes autour, promouvant ainsi le processus de repopulation (Huang et al., 2011). Ainsi, les cellules apoptotiques pourraient intervenir à deux niveaux en (1) induisant la prolifération des cellules tumorales et (2) favoriser leur changement d'état permettant à la tumeur de devenir plus agressive.

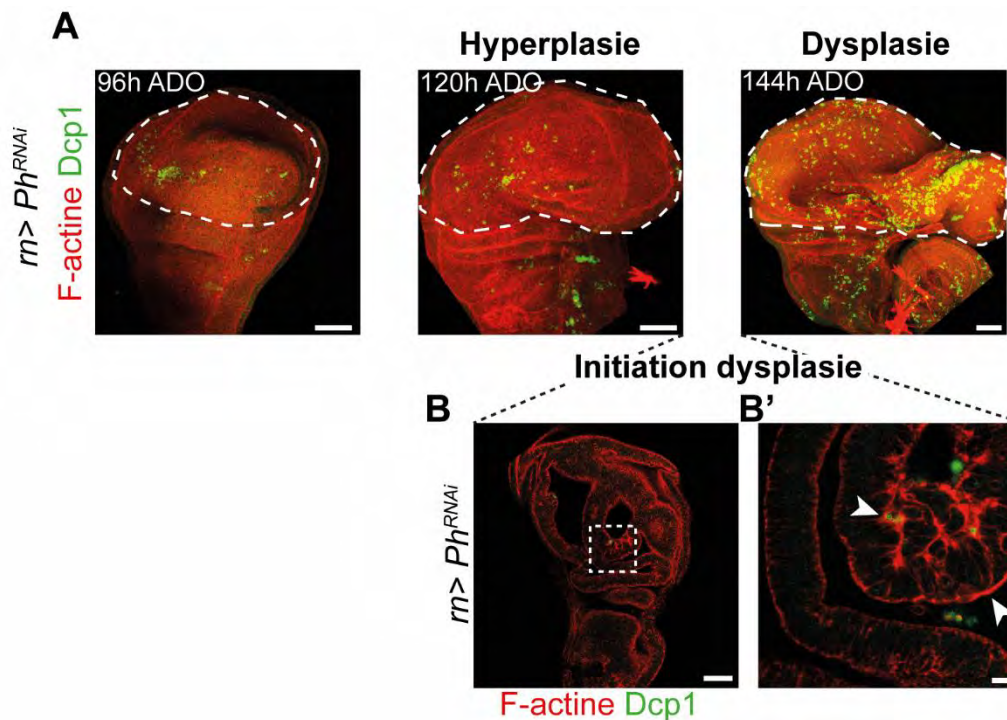
### **3 Vers une généralisation du rôle pro-tumoral de l'apoptose et des propriétés mécaniques des jonctions adhérentes ?**

Dans cette étude, je me suis focalisée sur deux contextes génétiques  $Syx7^{RNAi}$  et  $Yki^{SAx3}$  et j'ai montré que l'apoptose et l'augmentation de tension jonctionnelle jouent un rôle majeur dans la progression tumorale, en favorisant notamment la transition hyperplasie-dysplasie. Néanmoins, on peut se demander si ce que j'ai démontré dans ces deux contextes génétiques pourrait s'appliquer à d'autres et éventuellement se généraliser. Aussi, pour répondre à cette question, j'ai réalisé quelques expériences préliminaires sur d'autres contextes génétiques afin de caractériser dans un premier temps la présence ou l'absence d'apoptose et de modification de propriétés mécaniques.

Dans un premier temps, je me suis intéressée à un contexte génétique : l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur *polyhoméotique*. Polyhoméotique fait partie du complexe Polycomb, un complexe régulateur de la chromatine. Le locus de polyhoméotique est en réalité constitué de deux gènes : *polyhoméotique-p* (pour

proximal, *ph-p*) et *polyhoméotique-d* (pour distal, *ph-d*). Une mutation au niveau de l'un ou des deux gènes conduit à la formation de tumeurs (González et al., 2009; Martinez et al., 2009). Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé des tumeurs obtenues suite à l'utilisation d'un ARNi dirigé contre les deux gènes *ph* (*ph-d* et *ph-p*) qui présentaient un phénotype particulièrement intéressant. En effet, l'utilisation de cet ARNi conduisait dans un premier temps à la formation d'une tumeur d'abord hyperplasique (Figure 62A). Par la suite, j'ai observé qu'au centre la tumeur, une zone particulière se distinguait des autres puisqu'on pouvait y observer une accumulation d'actine, ainsi que quelques cellules apoptotiques (Figure 62B-B'). En laissant la tumeur se développer, j'ai ensuite constaté de façon très intéressante qu'une partie de la tumeur hyperplasique évoluait en tumeur dysplasique, précisément là où l'apoptose et l'accumulation d'actine apparaissaient (Figure 62). Contrairement au contexte *Syx7<sup>RNAi</sup>*, cette transition n'est pas globale dans toute la tumeur mais bien localisée et le reste, même sur des tumeurs plus âgées. Ce contexte génétique était particulièrement prometteur puisqu'il montrait une corrélation locale entre augmentation d'actine, présence d'apoptose et dysplasie. De plus, avec cette dysplasie locale, c'est un contexte qui présente l'avantage de pouvoir comparer les cellules ayant strictement le même patrimoine génétique et de comprendre pourquoi certaines cellules évoluent en cellules mésenchymateuses et d'autres non.

Néanmoins, l'utilisation de ce contexte génétique s'est révélée particulièrement compliquée. Si à l'origine, j'utilisais une lignée ARNi dirigé contre les deux gènes *ph*, il s'est avéré que cette lignée contenait également un autre élément, non identifié, qui interférait génétiquement avec l'ARNi. En effet, en voulant ajouter dans le système la lignée rapportrice pour la Myosine-II, je me suis rendue compte que changer le fond génétique de la lignée *ph<sup>RNAi</sup>* avait pour conséquence de ne plus induire la formation de tumeurs. J'ai donc laissé ce contexte de côté mais il pourrait être intéressant de se pencher dessus étant donné son caractère particulièrement prometteur. Puisque la lignée ARNi dirigée contre les deux gènes *ph* est inutilisable, il pourrait être intéressant de tester de combiner deux RNAi différents, chacun dirigé contre un gène *ph* ou éventuellement des mutants et de voir si l'on obtient le même phénotype tumoral, c'est-à-dire une évolution en dysplasie très locale.



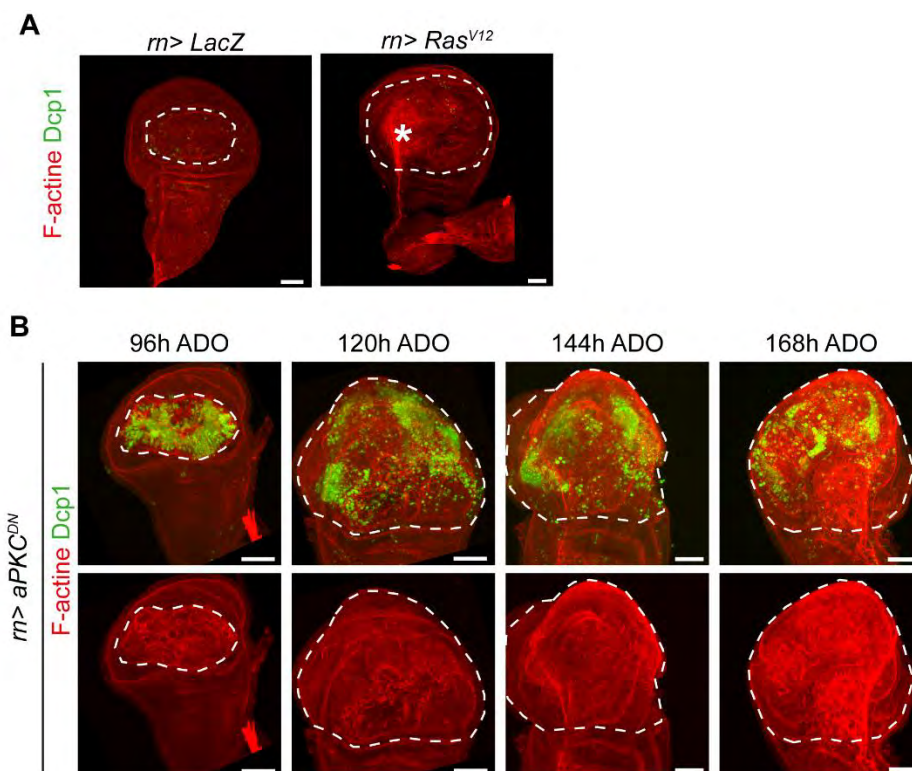
### Figure 62 : Caractérisation du contexte Polyhoméotique

(A) Cinétique au cours du temps du développement des tumeurs  $ph^{RNAi}$ . La zone précurseur de l'aile est délimitée par des pointillés. (B-B') Images tirées d'une autre expérience de cinétique réalisée à 30°C sur laquelle on voit l'initiation de la dysplasie. B' est un zoom de la zone entourée en B. On note la présence d'accumulation de F-actine et de quelques cellules apoptotiques précisément à l'endroit où démarre la dysplasie. Barre d'échelle 50µm.

Dans un second temps, je me suis intéressée au contexte  $Ras^{V12}$ , une mutation du composant Ras induisant une activation en permanence de la voie des MAPK et induisant une surprolifération (Karim and Rubin, 1998). L'induction de  $Ras^{V12}$  dans la zone précurseur de l'aile induit la formation d'une tumeur hyperplasique qui n'évolue pas au cours du temps. De façon intéressante, je n'ai observé dans ce contexte, ni apoptose, ni augmentation d'actine (Figure 63A), de manière similaire à ce que j'avais observé dans le contexte  $Yki^{SAx3}$ , suggérant donc que la présence d'apoptose et l'augmentation de tension jonctionnelle pourraient être spécifiques des tumeurs évoluant en dysplasie. Par la suite, j'ai également caractérisé un autre contexte génétique perturbant la polarité apico-basale et induisant la formation de tumeurs dysplasiques : l'utilisation d'un dominant-négatif pour aPKC ( $aPKC^{DN}$ ) (BDSC\_31673). En réalisant une cinétique de développement toutes les 24 heures, j'ai pu constater dans ce contexte la présence d'apoptose ainsi qu'une augmentation d'actine dans la zone d'induction de la tumeur, et ce, avant même que la tumeur ne se forme, exactement comme le contexte  $Syx7^{RNAi}$  (Figure 63B).



Ici, nous avons donc 4 contextes génétiques différents et indépendants, Ras<sup>V12</sup>, Yki<sup>Sax3</sup>, aPKC<sup>DN</sup> et Syx7<sup>RNAi</sup>, dans lesquels la présence d'apoptose et l'accumulation d'actine dans la zone d'induction de la tumeur corrélient strictement avec l'agressivité de la tumeur. En effet, apoptose et accumulation d'actine ne sont présentes que dans les tumeurs qui vont évoluer en dysplasie et pourraient donc être des marqueurs précoces de l'agressivité tumorale. Ces résultats étant particulièrement prometteurs, il conviendrait maintenant de tester le rôle de l'apoptose et de cette augmentation d'actine dans ces deux contextes en réalisant des expériences similaires à ce qui a été fait dans les contextes Syx7<sup>RNAi</sup> et Yki<sup>Sax3</sup>.



**Figure 63 : Caractérisation de deux autres contextes génétiques : Ras<sup>V12</sup> et aPKC<sup>DN</sup>**

(A-B) Disques imaginaux d'ailes obtenus suite à l'induction de la mutation Ras<sup>V12</sup> (A) et à l'utilisation du dominant négatif aPKC (B). La zone précurseur de l'aile, zone d'induction de la tumeur est délimitée par des pointillés. La F-actine est révélée par la Phalloïdine, en rouge et l'apoptose en vert. Le contexte Ras<sup>V12</sup> induit la formation de tumeurs strictement hyperplasiques, dans lesquelles il n'y pas d'apoptose ni d'augmentation de F-actine (l'accumulation observée marquée par un astérisque correspond en réalité à la membrane péripodiale, entourant le disque). Le contexte aPKC<sup>DN</sup> permet d'obtenir des tumeurs, d'abord hyperplasiques (à 120h ADO) qui évoluent ensuite en dysplasie. De façon intéressante, tout comme le contexte Syx7<sup>RNAi</sup>, une accumulation de F-actine et d'apoptose précède la formation de la tumeur (à 96h ADO). Barre d'échelle 50µm.

**En résumé, l'ensemble de mes travaux de thèse a permis de montrer chez la drosophile que les propriétés mécaniques au niveau des jonctions adhérentes jouent un rôle majeur dans la progression tumorale en favorisant la transition d'une tumeur hyperplasique en tumeur dysplasique, plus agressive. J'ai montré que cela pouvait se faire directement ou indirectement *via* l'induction d'apoptose. Ces travaux pointent également le fait que la modification des propriétés mécaniques et la présence d'apoptose pourraient être des marqueurs précoces de l'agressivité tumorale. A terme, ces travaux permettront d'avoir une meilleure compréhension des facteurs responsables de la progression tumorale et permettront peut-être d'adapter de nouvelles thérapies.**

# Matériels et Méthodes

## Lignées de drosophile

Les knock-in disponibles au Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) sont : ECad-GFP (BDSC\_60584); rhea[MI00296]-mCherry/TM6B (pour révéler la protéine Taline, BDSC\_39648), Baz[CC01941]-GFP (BDSC\_51572) et dlG1[MI06353-GFSTF.0] (BDSC\_59417). La lignée sqh-eGFP[29], utilisée pour voir la distribution de Myosine-II a été décrite précédemment (Ambrosini et al., 2019). Les lignées knock-in Viking-TagRFPT et Snail<sup>Kl</sup>-S10 ont été générées par InDroso functional genomics (Rennes, France).

Les pilotes utilisés dans cette étude et qui proviennent de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) sont : rn::Gal4 (BDSC\_7405); pdm2::Gal4[GMR11F02] (BDSC\_49828) and Hml::QF2.Delta (BDSC\_66468).

Les lignées UAS ou QUAS obtenues à BDSC sont : UAS::nls-GFP (BDSC\_4776); UAS::RNAi-flw[HMS04465] (BDSC\_57022); UAS::Yorkie[3SA] (BDSC\_28817); UAS::Diap1-H (BDSC\_6657); QUAS::6x-mCherry-HA (BDSC\_52270); UAS::RNAi-zip (BDSC\_38259); UAS::RNAi-zip (BDSC\_65947); UAS::RNAi-sqh (BDSC\_32439); UAS::RNAi-sqh (BDSC\_33892) UAS::RNAi-Rho (BDSC\_27727); UAS::MBS<sup>N300</sup> (BDSC\_63791); UAS::RNAi-rok (BDSC\_28797); UAS::RNAi-rok (BDSC\_34324); UAS::RNAi-GFP (BDSC\_41557); UAS-MMP1 (BDSC\_58701). La lignée UAS::lacZ[j] a été générée pour cette étude en croisant la lignée UAS::lacZ.Exel line (BDSC\_8529) avec des mouches *w<sup>1118</sup>*. La construction UAS::Vhh4-alpha-cat-TagRFPT (i.e. AJ-GFP trap) a été décrite précédemment (Martin et al., 2021) et la lignée HS::Flp sur le chromosome X (Monier et al., 2015). Les autres lignées provenant de BDSC sont : UAS::aPKC\_DN (BDSC\_51673); UAS::Ras<sup>V12</sup> (BDSC\_64196); enh\_sqh\_mCherry, sChFP (BDSC\_35524).

Les lignées rapportant l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la TEM provenant de BDSC sont : Snail-GFP (BDSC\_93875), Twist-GFP (BDSC\_79615), Zfh2-GFP (BDSC\_38674), Grh-GFP (BDSC\_42272) et celles provenant de Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) sont : Snail-GFP (VDRC\_318402), Srp-GFP (VDRC\_318053). Le stock ph<sup>RNAi</sup> provenait initialement de VDRC (VDRC\_50028) mais n'y est plus disponible.

Les stocks suivants ont été offerts par : UAS::alpha-cat-TagRFP stock par K. Sugimura (iCeMS, Japan), UAS::miRHG par JH. Park (University of Tennessee, USA)

et UAS::FRTstopFRTreaper[10.3] par D. Fox (Duke University, USA). La déficience Df(3L)H99 (BDSC\_1576) provient de H. Steller (Rockefeller University, USA). Les lignées zfh1-short-GFP et zfh1-GFP proviennent de H. Boukhatmi (Institut de Génétique & Développement, Université de Rennes). La lignée knock-in Grh-GFP provient de MM Harrison (University of Wisconsin-Madison, USA). Les stocks w; elav::Gal80; rn::Gal4/TM6B et w; elav::Gal80; rn::Gal4, UAS::RNAi-Syx7[GD2767]/TM6B, tub::Gal80 proviennent de P. Léopold (Institut Curie, France). La lignée initiale UAS::RNAi-Syx7[GD2767] provient du Vienna Drosophila Resource Center (VDRC). La lignée w; rn::Gal4, UAS::Yorkie[3SA]/TM6B, tub::Gal80 a été générée dans cette étude. Le maintien des transgènes sur le deuxième chromosome est fait grâce à un chromosome balancier, marqué avec un marqueur fluorescent rouge (BDSC\_35523). La lignée UAS::GFP-ZipDN est un don de D. Kiehart (Duke University, Durham, USA).

Les expériences ont été réalisées sans distinction des mâles et des femelles, mis à part dans les expériences réalisées avec l'AJ-GFP-Trap où seuls les mâles ont été utilisés. Les expériences ont été réalisées à 25°C, sauf dans les expériences d'inhibition d'apoptose dans le contexte Syx7 où, pour compenser la présence d'un deuxième UAS dans le système, l'expérience a été réalisée à 29°C et pour les expériences avec l'AJ-GFP-Trap qui ont été réalisées à 21°C.

### **Immunomarquages et acquisition**

Les disques d'aile ont été disséqués dans du PBS 1x. Les tissus sont ensuite fixés dans du paraformaldéhyde 4% dilué dans du PBS 1x pendant 20 minutes. Les échantillons sont ensuite lavés et saturés avec du PBS 1x, triton 0.3% et BSA 1x (BBT). Les échantillons sont ensuite incubés sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans du BBT. Le lendemain, les échantillons sont lavés pendant une heure dans du BBT avant une incubation de 2 heures à température ambiante avec les anticorps secondaires dilués dans du BBT. Enfin, les échantillons sont lavés dans du PBS 1x, triton 0.3% pendant une heure, avant d'être montés dans du Vectashield contenant du DAPI ou de la Phalloïdine-TRITC (Vector Laboratories). Pour le montage, on utilise des espaceurs (« spaceurs ») de 120 mm de profondeur (Secure-Seal™ from Sigma-Aldrich) entre la lame et la lamelle pour conserver la morphologie du tissu.

Le cytosquelette d'actine est marqué en utilisant de la Phalloïdine-Rhodamine de chez Fischer (1/500, incubation de 2 heures avec les anticorps secondaires). Une autre méthode consiste à monter les échantillons dans du Vectashield contenant de la Phalloïdine-TRITC. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI, présent directement dans le Vectashield quand nécessaire.

Les anticorps primaires provenant de Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) sont : anti-Dlg (4F3-c, souris, 1/200); anti-ECad (DCAD2-c, rat, 1/100); anti $\beta$ PS (CF.6G11, souris, 1/50) ; anti-MMP1 (14A3D2, 1/10). L'anticorps dirigé contre la forme clivée de la caspase Dcp1 provient de Cell Signaling Technology (#9578, lapin, 1/200). L'anticorps anti-Baz (cochon d'inde, 1/500) a été offert par J. Zallen (Sloan Kettering Institute, USA).

Les anticorps secondaires (Alexa-488, -555 and -647) proviennent de Interchim et sont dilués au 1/200 sauf pour l'Alexa-647 au 1/100.

Les échantillons fixés ont été imagés en utilisant des microscopes inversés confocaux Zeiss, soit LSM880 soit LSM900 en utilisant les objectifs : 25x/0.8 multi-immersion, 40x/1.4 à huile ou 63x/1.4 à huile. Les images ont été analysées sur les logiciels Fiji et Imaris.

### **Cinétique du développement tumoral**

Pour réaliser des cinétiques de développement avec une résolution temporelle contrôlée, la stratégie suivante a été utilisée. Des femelles vierges (à peu près 250-300 par pondoir) sont collectées en 3 à 5 jours maximum. Les mâles sont croisés avec les femelles (environ 10 mâles pour 25-30 femelles), d'abord en tube. Le lendemain, les croisements sont transférés dans des pondoirs sur du milieu nutritif standard. Les pontes durent 3 heures à 25°C puis les boîtes sur lesquelles ont été déposés les embryons sont incubées à 25°C (ou 29°C pour les expériences d'inhibition d'apoptose dans le contexte Syx7. Le jour suivant, les boîtes sont transférées dans des tubes contenant du milieu nutritif standard afin d'éviter un éventuel manque de nourriture et les tubes sont replacés à 25°C ou 29°C. Les embryons sont ensuite laissés à vieillir le temps indiqué, les plus jeunes disséqués étant à 96h ADO (après dépôt de l'œuf) à 25°C ou 64h ADO à 29°C. Pour chaque expérience, le croisement contrôle est réalisé en parallèle en remplaçant le UAS ::RNAi-Syx7 ou UAS ::Yorkie<sup>SAX3</sup> par un transgène

UAS::lacZ. Les disques contrôle ne peuvent pas être analysés après 120h ADO, à cause de la métamorphose qui démarre à ce temps.

### **Classification des phénotypes des tumeurs**

Dans nos expériences, les disques d'aile ont été classés en trois catégories : disques normaux, hyperplasiques et dysplasiques. La classification prend en compte deux paramètres : la taille globale de la zone précurseur de l'aile, c'est-à-dire la zone d'induction de la tumeur et l'organisation cellulaire de cette même zone (épithélial VS mésenchymateux). Pour cela, les disques sont systématiquement comparés à des disques contrôle (non tumoraux) du même âge pour déterminer si la taille est augmentée ou pas. Les disques sont également marqués en utilisant une combinaison de marqueurs de l'organisation épithéliale : E-cadhérine ou  $\alpha$ -caténine pour marquer les jonctions adhérentes ; Disc Large (Dlg) pour marquer les jonctions septées ;  $\beta$ -intégrine ou Taline pour marquer les adhésions basales ; Bazooka/Par3 pour voir la polarité apico-basale ; F-actine pour visualiser le cortex de la cellule. L'organisation monocouche avec des pôles apicaux et basaux bien définis sont classés comme épithéliums. Dans les zones mésenchymateuses, la structure monocouche est perdue induisant la formation de masses sans polarité apico-basale. Les disques pré-tumoraux qui présentent une taille similaire à celle du contrôle et une organisation épithéliale sont qualifiés de « normaux ». Les disques présentant une organisation épithéliale mais dont la zone précurseur de l'aile est plus grande que dans un disque contrôle sont classés en disques « hyperplasiques ». Finalement, les disques tumoraux présentant une organisation mésenchymateuse et une taille plus importante que le disque contrôle sont qualifiés de disques néoplasiques.

### **Induction d'apoptose**

Les expériences d'induction d'apoptose ont été réalisées grâce au transgène UAS::FRTstopFRT-reaper couplé au transgène UAS::Yorkie[3SA] dans la zone précurseur de l'aile. Les croisements ont été réalisés à 25°C permettant l'induction de tumeurs hyperplasiques. Un choc thermique à 37°C est réalisé pendant 20 minutes et les larves sont ensuite laissées à vieillir à 25°C pendant 16 heures avant d'être disséquées.

### **Ablation laser**



La mise en culture des tissus est faite en suivant le protocole suivant : les disques d'aile sont disséqués dans du milieu de culture Schneider (Sigma-Aldrich) complétement avec 15% de sérum de veau fœtal et 0.5% de pénicilline-streptomycine. Les disques d'aile sont ensuite transférés sur une lame dans 13.5 µl de milieu de culture dans un espaceur de 120 µm de profondeur (Secure-Seal™ from Sigma-Aldrich). Une lamelle haute précision (n°1.5H, Marienfeld) est ensuite placée sur l'espaceur. Les instruments sont soigneusement lavés à l'éthanol avant dissection.

Les expériences d'ablation laser ont été réalisées sur un microscope inversé confocal Zeiss LSM880 équipé d'un laser bi-photonique DPSS (532 nm) provenant de chez Rapp OptoElectronic, Hamburg, Germany. Les expériences ont été réalisées en utilisant un objectif 63x à eau et un zoom numérique de 2x. La coupure sur les jonctions adhérentes a été réalisée en illuminant sur une ligne de 70 pixels (environ 10µm) pendant 5 secondes à 100% du laser. Les images de la E-cadhérine-GFP ont été acquises toutes les 500 ms en utilisant un laser Argon 488 nm. Les paramètres techniques utilisés sont détaillés dans le manuscrit du papier présent en annexe.

### Analyses statistiques

Les tests de normalité et statistiques ont été réalisés sur le logiciel Prism. Les graphiques ont été générés sur Prism. Les boîtes à moustaches représentent la médiane, les 10 et 90 percentiles.

Les valeurs des p-values ont été représentées comme ce qui suit : \*\*\*\*p<0.0001; \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01; \*p<0.05; NS p>=0.05 (non significatif)

### Quantifications

#### - Intensité de fluorescence de l'Actomyosine et du Collagène IV

Pour quantifier l'actomyosine, un Z-stack des disques d'aile entiers a été pris en utilisant un objectif 25x multi immersion avec une résolution de 1.11 µm en X/Y et 1 µm en Z. Les Z-stacks ont été analysés sur des coupes sagittales sur le logiciel Fiji. Pour chaque coupe sagittale, deux lignes segmentées (épaisseur 5) ont été tracées sur la surface apicale de l'épithélium : une au niveau du notum/ région charnière (pour le contrôle) et une autre au niveau de la zone précurseur de l'aile (zone d'intérêt). La valeur d'intensité moyenne de fluorescence de la zone d'intérêt est ensuite divisée par celle de la zone contrôle pour normaliser. Pour chaque disque, 3 coupes sagittales ont

été réalisées et j'ai fait la moyenne des trois. Les analyses ont été réalisées sur des disques marqués à la Phalloïdine pour révéler la F-actine ou en utilisant la lignée Knock-in sqh-eGFP pour visualiser la Myosine-II.

Pour les quantifications du collagène IV, une stratégie similaire a été utilisée, sauf que l'épaisseur des lignes tracées était de 3. Les quantifications ont été réalisées sur la lignée knock-in Viking-TagRFPt en traçant les lignes sur le pôle basal des épithéliums. Pour la zone contrôle, les lignes ont été tracées spécifiquement dans la zone du hinge qui constitue un épithélium monocouche comme la zone précurseur de l'aile.

#### - **Intensité de fluorescence de E-Cadhérine et Disc Large après induction d'apoptose**

Les quantifications de l'intensité de fluorescence de E-cadhérine et Disc Large après induction d'apoptose ont été réalisées sur un plan pris avec l'objectif 40x/1.4 à huile. Les images ont été prises dans une région présentant à la fois de l'apoptose massive et à la fois une zone sans ou avec très peu d'apoptose. Une ligne segmentée a été tracée au niveau des jonctions adhérentes (Ecad, épaisseur de 15) et au niveau des jonctions septées (Dlg, épaisseur de 25). 2 à 3 mesures ont été réalisées dans les différentes zones pour chaque image.

#### - **Volume d'apoptose**

Pour quantifier les niveaux d'apoptose, les disques ont été marqués en utilisant l'anticorps anti-Dcp1 qui marque la forme activée de la caspase Dcp1. Des Z-stacks ont été acquis avec un objectif 25x multi immersion en imageant à chaque fois le disque entier. Des reconstructions 3D ont été réalisées en utilisant le logiciel Imaris. Le marquage Dcp1 est ensuite segmenté dans Imaris et le volume du marquage Dcp1 est ensuite calculé en additionnant le volume de chaque fragment apoptotique.

#### - **Nombre de macrophages**

Une stratégie similaire a été adoptée pour quantifier le nombre de macrophages, sauf qu'au lieu du volume, j'ai utilisé la fonction "détection de points" dans le logiciel Imaris. Un seuil de 5µm a été utilisé pour détecter les points. Les macrophages ont été marqués en utilisant l'expression de la protéine fluorescente QUAS::mCherry sous contrôle du pilote Hml::QF2, spécifique des macrophages.



# Annexes

Dans ces annexes, vous trouverez dans un premier temps le manuscrit de l'article qui reprend une grande partie des résultats présentés dans la première partie des résultats.

Cet article est intitulé « Mechanical state of pre-tumoral epithelia dictates subsequent tumour aggressiveness » et est en cours de soumission.

Dans un deuxième temps, vous trouverez également le manuscrit de la revue à laquelle j'ai participé au cours de ma thèse et qui portait sur la description des différentes étapes de la TEM au cours du développement.

Cette revue est intitulée « Getting started for migration: A focus on EMT cellular dynamics and mechanics in developmental models » et a été publiée en 2021 dans la revue Cells & Development.

1 **Mechanical state of pre-tumoral epithelia dictates subsequent tumour**  
2 **aggressiveness**

3

4 **One sentence summary:**

5 Pre-tumour cell mechanics triggers tumour aggressiveness through cell death induction and cell-cell  
6 junction weakening.

7

8 **Authors:** Marianne Montemurro<sup>1</sup>, Bruno Monier<sup>1,2</sup>, Magali Suzanne<sup>1,2</sup>

9

10 **Affiliations:**

11 <sup>1</sup> Molecular Cellular and Developmental Biology (MCD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université  
12 de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France

13 <sup>2</sup> Corresponding authors: [bruno.monier@univ-tlse3.fr](mailto:bruno.monier@univ-tlse3.fr); [magali.suzanne@univ-tlse3.fr](mailto:magali.suzanne@univ-tlse3.fr)

14

15 **ABSTRACT**

16 Tumours evolve through the acquisition of increasingly aggressive traits associated with dysplasia. This  
17 progression is accompanied by the alteration of tumour mechanical properties, especially through  
18 extracellular matrix remodelling. However, the contribution of intrinsic tumour cells mechanics to  
19 tumour aggressiveness remains unknown *in vivo*.

20 Here we show that adherens junction tension in pre-tumoral tissues dictates subsequent tumour  
21 evolution. Increased cell contractility, observed in aggressive tumours before any sign of tissue  
22 overgrowth, proved sufficient to trigger dysplasia in normally hyperplastic tumours. Unexpectedly,  
23 high contractility contributes to tumour evolution through cell death induction which favours cell-cell  
24 junctions weakening. Overall, our results highlight the need to re-evaluate the roles of tumoral cell  
25 death, and identify pre-tumour cell mechanics as an unsuspected early marker and key trigger of  
26 tumour aggressiveness.

27 **Key words:** Tumour mechanics, tumour aggressiveness, myosin II, adherens junctions, tight junctions,  
28 *Drosophila*, epithelial-mesenchymal transition, apoptosis.

29 **MAIN TEXT**

30 Cancer is a highly complex pathology leading to tissue overgrowth and, in most dramatic cases, to  
31 colonization of distant organs. Cancer is characterized by several hallmarks, such as sustained  
32 proliferative properties, evasion from immunological monitoring or increased resistance to cell death  
33 <sup>1</sup>. A vast majority of tumours, carcinoma, stems from epithelial cells. Epithelia are sheets of polarized  
34 cells, presenting an apico-basal polarity, connected among each other through intercellular junctions,  
35 especially adherens junctions (that sustain mechanical integrity of the tissue) and tight junctions (that  
36 control permeability). Epithelial cells are also connected via receptors such as Integrin to the  
37 extracellular matrix (ECM) that provides structural stability <sup>2</sup>. Tumours can evolve through increasingly  
38 aggressive steps <sup>3-5</sup>, in part due to the acquisition of mesenchymal traits such as loss of apico-basal  
39 polarity and decrease in intercellular or ECM adhesion. Thus, tumour aggressiveness is associated with  
40 an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process which can be partial, leading to cells  
41 expressing a combination of epithelial and mesenchymal markers <sup>6,7</sup>. Tumoral EMT therefore underlies  
42 the switch from initially epithelial, hyperplastic to more aggressive dysplastic tumours <sup>8</sup>. Because  
43 appearance of mesenchymal domains also favours the formation of cancer stem cells and increases  
44 resistance to therapeutic strategies <sup>9-11</sup>, understanding mechanisms initiating cancer-associated EMT  
45 is therefore of prime importance.

46 One striking characteristic of tumours of epithelial origins is the profound alteration in their mechanical  
47 properties. For instance, tissue stiffness is dramatically increased in tumours, and several mechanisms  
48 underly this change in properties, such as constrained growth <sup>12</sup>, increase in interstitial fluid pressure  
49 <sup>13</sup>, or increase in ECM deposition or crosslinking <sup>14,15</sup>. Despite acknowledgement of the importance of  
50 biomechanics associated with tumour evolution, the contribution of tumour cell mechanics is still  
51 unclear, especially because some inconsistency exists in the data obtained so far on tumour cell  
52 physical properties. On the one hand, the vast majority of rheological studies analysing the stiffness of  
53 tumour cells in culture described them as softer than normal cells, leading to the hypothesis of an  
54 inverse correlation between cell stiffness and malignancy <sup>16,17</sup>. On the other hand, an increase in  
55 cellular contractility has been associated with tumour growth in breast cancer cells, mouse skin or  
56 *Drosophila* eye epithelia <sup>18-20</sup>. These studies suggest that cancer cell stiffness could contribute to  
57 tumour development, although mechanical properties were not directly analysed in those contexts.  
58 The discrepancy between data probing mechanical properties of tumour cells may be the consequence  
59 of i- the difficulty to discriminate between tumour cells and their microenvironment in *in situ* studies  
60 and ii- the non-physiological conditions associated with tumour cells in culture. Overall, these  
61 controversial data highlight the need to characterize the evolution of tumour mechanics throughout  
62 tumour progression in a simplified and integrated *in vivo* system. For this purpose, we performed a



63 detailed characterization of actomyosin cytoskeleton dynamics and contribution in temporally and  
64 spatially controlled *Drosophila* tumours, using an inducible system to follow tumour development.

65

#### 66 **Increased adherens junction contractility is a marker of pre-tumoral tissues in evolving tumours**

67 To probe tissue mechanics in evolving tumours, we used the downregulation of the tumour-suppressor  
68 gene *Syntaxin 7* (*Syx7*, also known as *Avalanche*, *Avl*), a component of the endocytic machinery that  
69 controls trafficking of transmembrane molecules such as the Notch receptor and which is associated  
70 with dysplasia in the fly follicular epithelium<sup>21</sup>. We generated tumours in the pouch region of the  
71 *Drosophila* wing disc since this domain, in which transgene expression can be timely controlled, is  
72 composed of a simple monolayer epithelium sitting on the extracellular matrix. This system allows to  
73 unambiguously probe the mechanical properties of tumour cells, without any possible confusion with  
74 cells of the microenvironment. We confirmed that *Syx7* knockdown can promote tumour formation in  
75 the wing pouch<sup>22,23</sup> (Sup Fig.1A) and performed a detailed characterization of tumour evolution at cell  
76 and tissue scales in this context.

77 We combined the macroscopic description of tissue growth (Fig. 1A-B) with detailed characterization  
78 of tissue organization using a combination of markers for adherens junctions (E-cadherin, E-Cad), tight  
79 junctions (Disc large, Dlg), cell/ECM junctions (Talin, Beta-Integrin) (Fig.1A'-B'). We found that *Syx7*  
80 RNAi discs were initially similar or slightly smaller than control discs at 96h after egg laying (AEL), with  
81 E-Cad/Dlg and Talin respectively labelling apical and basal poles of epithelial cells (Fig.1B'). Since no  
82 sign of tumour development is visible at this stage, we call it "pre-tumoral stage". At 108h AEL, a stage  
83 we call "early tumour stage", most *Syx7* RNAi discs are overgrown compared to control discs of the  
84 same age, still keeping epithelial organization, corresponding to hyperplastic tumours. Finally, by 120h  
85 AEL onwards, which we call the "late tumour stage", nearly all *Syx7* RNAi discs have become dysplastic.  
86 Indeed, these tumoral tissues are not only overgrown but also present domains in which cells have lost  
87 their epithelial organization, as revealed by a loose shape, Dlg relocation around most of the cell  
88 cortex, and scattered E-Cad and Talin dots (Fig.1B', right panel). Similar results regarding the loss of  
89 epithelial polarity in late tumours were observed using additional markers, such as the basal beta-  
90 Integrin, the apical cell polarity marker Bazooka/Par3 and F-actin which labels cortex organisation (Sup  
91 Fig. 1B, C), revealing a mesenchymal-like state (hereafter referred to as "mesenchymal"). Hence, at  
92 25°C, we identified three main stages, with the "pre-tumour stage" at 96h AEL, just before the onset  
93 of overgrowth, the "early tumour stage" at 108h AEL in which most discs are hyperplastic, and the late  
94 tumour stage from 120h AEL onwards in which nearly all tumours are dysplastic (Fig.1 B'', C).

95 This temporal characterization of tumour evolution set up the framework to investigate possible  
96 alterations of tissue mechanics in evolving tumours. We started studying tumour development starting  
97 from the pre-tumoral stage. Since part of tissue mechanics relies on ECM constitution, we first  
98 characterized the pattern of one main ECM component, Collagen IV, as well as ECM/tumour cell  
99 interaction, by looking at the mechanoresponsive component of Integrin junctions, Talin. Neither  
100 Collagen IV levels nor Talin distribution were different between control and Syx7 RNAi discs at the pre-  
101 tumour stage (compare Fig.1A' with the left panel in Fig1B', Fig. 1D, Sup Fig. 1D). Next, we focused on  
102 the cytoskeleton itself, which could be responsible for intrinsic alterations of tumour cell mechanics.  
103 Strikingly, we observed an unsuspected strong enrichment of F-actin and of the molecular motor non-  
104 muscle myosin II (hereafter referred to as myosin II) in Syx7 RNAi discs at the pre-tumour stage (Fig.1  
105 E and Sup Fig.1E). This pointed towards a potential alteration of tumour cell mechanics already in pre-  
106 tumoral tissues. We quantified the levels of F-actin and myosin II, both on the basal side where basal  
107 junctions connect cells to the extracellular matrix, and on the apical side at the level of intercellular  
108 junctions. Interestingly, both F-actin and myosin II were strongly enriched apically (Fig.1 F-H). Indeed,  
109 while F-actin levels were not significantly different at the basal side and myosin II levels were increased  
110 by 15%, F-actin and myosin II were increased by about respectively 25% and nearly 50% at the apical  
111 pole of pre-tumoral tissue. Co-staining with E-cadherin showed that F-actin and myosin II accumulate  
112 specifically at adherens junctions (Fig. 1F), suggesting an unexpected change in adherens junction  
113 contractility between a control and a pre-tumoral tissue.

114 We therefore determined whether acto-myosin accumulation efficiently translates into an alteration  
115 of adherens junction's tension. For this purpose, we performed laser ablation on the E-cadherin-GFP  
116 knock-in line in control and Syx7 RNAi discs at pre-tumour stage (Fig.1I). Interestingly, the recoil of  
117 vertices following ablation is higher in the Syx7 RNAi discs, with both initial and maximal recoils being  
118 about 50% higher compared to control discs (Fig.1 J, K). The increase of adherens junction contractility  
119 is observed at the pre-tumour stage, when the tumour is not yet morphologically identifiable as an  
120 overgrowth. It thus appears to be the first sign of tumour development in this context and constitutes  
121 a pre-tumoral marker.

122

### 123 **High junctional contractility in tumour cells drives tumour aggressiveness**

124 We next wondered whether the increase in adherens junction tension is specific to aggressive  
125 tumours, or whether it is also observed in early hyperplastic tumours. We therefore turned to a genetic  
126 context strictly associated with hyperplasia induction in fly: the overexpression of Yorkie, the ortholog  
127 of the mammalian YAP transcription factor<sup>24</sup>. Following expression of a mutated form of Yorkie<sup>25</sup> in  
128 the wing discs, we observed that at any timepoint analysed the discs are larger than the control ones

129 (Fig.2A, Sup Fig.2A, B) and that cells keep an epithelial organization (Fig.2B, Sup Fig.2C, D). Therefore,  
130 EMT is never induced following Yorkie expression and tumours remain hyperplastic, irrespective of  
131 their age (Fig. 2C). Importantly, myosin II levels were not increased at adherens junctions in this context  
132 (Fig.2B, D), and their tension was even slightly decreased (Fig.2E, Sup Fig. 2E). Thus, comparing analysis  
133 in dysplastic (above) and hyperplastic contexts, we conclude that high adherens junction tension  
134 constitutes a pre-tumoral marker specific of dysplastic tumours.

135 We then asked whether high tension could promote tumour evolution and aggressiveness. We  
136 therefore tested whether increasing junctional contractility could be sufficient to promote an  
137 epithelial-to-mesenchymal cell behaviour in strictly hyperplastic tumours, such as Yorkie tumours.

138 To increase contractility at adherens junction, we set up two independent strategies, initially in non-  
139 tumoral wing discs, to ensure that these genetic manipulations do not perturb epithelial organisation.  
140 First, we induced the specific recruitment of myosin II at adherens junctions through the use of a trap  
141 forcing GFP-fusion protein relocation. This tool, hereafter called AJ-GFP-trap (Fig.2F) is composed of a  
142 llama antibody (or nanobody) against GFP fused to the adherens junction protein alpha-Catenin that  
143 controls its location and to a red fluorescent protein (RFP) to visualize it <sup>26,27</sup>. When the myosin II  
144 regulatory light chain (MRLC) *spaghetti squash* (*sqh*) endogenously tagged by GFP <sup>28</sup> is expressed in the  
145 wing pouch, the AJ-GFP-trap leads to a strong increase of myosin II at the apex of epithelial cells from  
146 the wing pouch (Fig.2G, H, Sup Fig.3A, B). Analysis of myosin II intensity shows that it increases by 50%  
147 at adherens junctions in presence of the AJ-GFP-trap by comparison with a control transgene  
148 expressing simply an alpha-catenin-RFP construct (Fig.2H), reaching levels close to those observed in  
149 *Syx7* RNAi discs (Fig.1H). In a complementary way to increase contractility, we inactivated the *flapwing*  
150 gene product, a component of the phosphatase complex that restrain myosin II activity through  
151 dephosphorylation of *spaghetti squash* (Sup Fig.3C) <sup>29,30</sup>. *flapwing* knockdown also led to an increase  
152 of myosin II in the wing pouch by 20% at adherens junction's, but no significantly increase at the basal  
153 pole (Sup Fig.3D-F). The increase in apical myosin II levels translated in enhanced vertex recoil following  
154 laser ablation, revealing enhanced adherens junction's tension in this context (Fig.2 I, Sup Fig. 3G).  
155 Thus, these strategies induce higher myosin II recruitment and increased tension at adherens junctions  
156 in the wing disc without affecting epithelial organization in non-tumoral epithelium, as revealed by  
157 Dlg, alpha-catenin and myosin II normal distribution (Fig.2G, Sup Fig.3B, 3E).

158 We then tested the impact of increased adherens junction contractility in the hyperplastic tumoral  
159 context. To do so, we induced myosin II junctional recruitment through either *flapwing* RNAi or AJ-  
160 GFP-trap expression in Yorkie tumours. Strikingly, we observed the apparition of domains containing  
161 rounder cells, with delocalised ECad, alpha-Cat, Dlg and Talin. (Fig.2J, K, Sup Fig.4). The cell's

162 cytoskeleton was also reorganised, with delocalised F-actin, as well as myosin II, around the whole cell  
163 cortex, instead of the apical and basal enrichments associated with the epithelial phenotype (Sup  
164 Fig.4). Importantly, the conversion of hyperplastic into dysplastic tumours by increased mechanics  
165 was fully penetrant, since all manipulated discs were dysplastic, presenting at least one mesenchymal  
166 domain (Fig.2L). Hence, while the alteration of myosin II levels at adherens junctions has no impact on  
167 the epithelial structure in non-tumoral tissues (Fig.2G, Sup Fig.3B, 3E), it is sufficient to promote  
168 epithelial-to-mesenchymal transition in tumoral discs that normally remain strictly epithelial (Fig.2 J,  
169 K, Sup Fig.4).

170

#### 171 **Apoptosis as a promoter of tumour aggressiveness downstream of contractility increase**

172 We next investigated mechanisms that could participate in triggering EMT downstream of increased  
173 junctional tension. By looking for alterations that would be present in Syx7 RNAi tumours prior to the  
174 onset of EMT, but absent in the control tissue, we observed an important amount of cell death, as  
175 revealed by staining against the active form of the effector caspase Dcp1. Indeed, massive apoptosis  
176 was observed in pre-tumour Syx7 RNAi discs (96h AEL) in which junctional tension is high, prior to EMT  
177 appearing at 108h AEL (Fig.3A, A'). Interestingly, apoptosis was absent in Yorkie tumours, irrespective  
178 of the age of the tumour (Fig.3B, left panel), suggesting that apoptosis was specifically associated with  
179 aggressive tumours (see Sup Fig.5A for quantifications). Therefore, in fly tumours, apoptosis is tightly  
180 correlated with high myosin II levels, both temporally and spatially, and its appearance precedes the  
181 induction of epithelial-to-mesenchymal transition in Syx7 RNAi tumours. Furthermore, Yorkie tumours  
182 with increased contractility also presented elevated levels of apoptosis (Fig.3B'-B''), specifically in  
183 regions where myosin levels were higher and transformation occurred (Fig.3B middle and right panels,  
184 Sup Fig. 5B). These data further suggest that apoptosis is induced by high level of adherens junction  
185 contractility present in evolving tumours.

186 Apoptotic cells are known to influence their surrounding by various signalling or mechanical means  
187 during development <sup>31-33</sup>. Moreover, while apoptosis is a well-known protective mechanism <sup>1,34</sup>,  
188 several reports pointed towards the presence of apoptosis in certain tumoral contexts and its ability  
189 to promote cell proliferation in specific cases <sup>31,35,36</sup>. Together with the close proximity of apoptotic  
190 cells to dysplastic zones (Sup Fig. 5B), this prompted us to ask whether apoptosis could contribute to  
191 the induction of epithelial-to-mesenchymal transition in *Drosophila* tumours. To investigate the  
192 potential pro-tumoral role of cell death, we first inhibited cell death in Syx7 RNAi tumours. Nearly  
193 complete cell death inhibition was difficult to obtain, and was only possible through inhibition of the  
194 three main fly proapoptotic genes *reaper*, *hid* and *grim* by expression of a RNAi transgene in a genetic

195 background heterozygous for those genes, a genetic combination hereafter referred to as “miRHG  
196 DfH99” (Supp Fig.5C-E). We next analysed Syx7 RNAi tumour evolution with or without cell death in  
197 tumours grown for exactly the same duration, and which have a similar macroscopic appearance  
198 (Fig.3C). Interestingly, when roughly half of the Syx7 RNAi tumours (containing apoptosis) are epithelial  
199 and 40% of them are starting to become mesenchymal, Syx7 RNAi tumours without apoptosis  
200 presented only 15% of mesenchymal tumours (showing only limited zones of mesenchymal cells), but  
201 about 65% of purely epithelial, hyperplastic tumours (Fig.3D). Strikingly, this tendency is amplified at  
202 later stages when all Syx7 RNAi tumours bearing apoptosis have turned massively mesenchymal, while  
203 blocking cell death maintained 60% of the tumours in an epithelial stage, showing a strong decrease in  
204 the number of aggressive tumours at an equivalent time point (Fig.3E, E'). These results show that  
205 apoptosis promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in tumoral contexts.

206 We next asked how cell death could act as a pro-tumoral factor regarding the epithelial-mesenchymal  
207 cell status. To address this question, we first investigated whether hemocytes, the fly macrophages,  
208 could play a role. Indeed, macrophages, which are attracted by dead cells to clean apoptotic corpses,  
209 are known regulators of tumour aggressiveness in mammals, while hemocytes are indirect modulators  
210 of tissue overgrowth when apoptosis is impaired in fly<sup>37-39</sup>. We observed that some hemocytes are  
211 recruited to Syx7 RNAi tumours, but only once they have become dysplastic. Importantly, we did not  
212 observe hemocytes in pre-tumoral tissues or in hyperplastic tumours, indicating that their late  
213 recruitment could not account for epithelial-to-mesenchymal induction in Syx7 RNAi tumours (Sup  
214 Fig.6A, B). We next investigated whether cell death could promote tumour evolution by directly  
215 modulating the tension of adherens junctions in Syx7 RNAi tumours, as previously described during  
216 development<sup>32</sup>. Of note, the level of contractility is unchanged by the inhibition of apoptosis, as shown  
217 by the fact that apical myosin II levels are similar in the presence or in the absence of apoptosis in pre-  
218 tumour Syx7 RNAi discs (Sup Fig.6C-D'). Finally, we investigated whether cell death could directly  
219 control the levels of key junctional components whose regulation is important for epithelial-to-  
220 mesenchymal transition<sup>40</sup>. We induced ectopic cell death in the Yorkie tumours that are normally  
221 devoid of it and stained tumours with ECad and Dlg to label both adherens and tight junctions. We did  
222 not notice epithelial-to-mesenchymal transitions upon massive cell death induction, suggesting that  
223 apoptosis *per se* may not be sufficient to induce a complete EMT in tumours. However, we observed  
224 that ECad and Dlg junctional levels dropped in epithelial zones with high cell death, compared to  
225 epithelial zones with low or no cell death (Fig.3F-F'). Quantifications show that Dlg and ECad levels in  
226 living cells are decreased by 33% or 45% respectively in presence of high apoptosis levels nearby, when  
227 compared to epithelial zones with low or no cell death in close vicinity (Fig.3F'-F''). This indicates that  
228 apoptosis non-autonomously weakens cell-cell junctions in tumours. Altogether, this led us to propose

229 that apoptosis acts downstream of increased contractility of tumour cells to facilitate EMT and  
230 therefore tumour evolution, through the destabilization of both adherens and tight junctions.

231

## 232 **Conclusion**

233 So far, alterations of tumour mechanical properties, such as increased extracellular matrix rigidity,  
234 increased pressure or compressive growth, have been essentially documented at late tumour stages,  
235 or in cultured cells which are not in a physiological environment. Here our results show that early  
236 during tumour development, high junction contractility induces the presence of massive apoptosis to  
237 eventually favor the shift from hyperplastic to dysplastic tumour stages through the non-autonomous  
238 weakening of adherens and tight junctions (Fig.4, top panel), while low-contractility tumours remain  
239 hyperplastic (Fig.4, lower panel). Overall, our results identify the intrinsic mechanical properties of pre-  
240 tumoral tissues as a trigger of tumour aggressiveness in an *in vivo* model system.

241 A key feature of tumour evolution is the activation of the EMT program. EMT is well known to be an  
242 inducible change in cell behaviour, controlled by intercellular signalling pathways such as TGFbeta<sup>40</sup>.  
243 The tumour microenvironment, through signalling from cancer associated fibroblasts (CAFs) or tumour  
244 associated macrophages (TAMs) or remodelling of the surrounding ECM is associated with tumoral  
245 EMT regulation<sup>8,41</sup>. Yet, our results point towards an unsuspected alternative pathway to trigger EMT,  
246 which is autonomously controlled by tumour cell mechanics. Although adherens junctions are known  
247 to be mechanosensitive in epithelial tissues, this work identifies them as key mechanosensitive  
248 structures driving tumour evolution. During development, endocytosis can be enhanced at adherens  
249 junctions under increased tension<sup>42</sup>, and mechanosensitive endocytosis was shown to control E-Cad  
250 and membrane removal to maintain junction homeostasis<sup>43</sup>. Forces can also impact tight junctions  
251 through ZO-1 regulation in cultured cells<sup>44</sup>. However, as we report for fly tissues, enhanced junctional  
252 tension is not sufficient to trigger EMT during development, as it does in tumours. This suggests a shift  
253 in the mechanosensitive properties of cells in pre-tumoral tissues, which will necessitate further  
254 investigations in the future.

255 A striking result is that high adherens junction tension induces cell death which favours dysplasia  
256 formation. This points towards a far more complex role of apoptosis than previously anticipated in  
257 tumours biology. While increased resistance to apoptosis is long considered as a hallmark of cancer<sup>45</sup>,  
258 more recent publications hinted at a paradoxical pro-tumoral role by promoting cell proliferation  
259<sup>35,36,46</sup>, while failed apoptosis would favour invasiveness<sup>47</sup>. Our data further show that, by fragilizing  
260 intercellular adhesions, cell death could also potentiate EMT. Given that mesenchymal tumour cells  
261 are associated with increased resistance to treatments and acquisition of cancer stem cell (CSC) traits

262 <sup>9,11</sup>, massive but incomplete cell death induction by radiotherapy or chemotherapy, depending on  
263 specific tumour properties (such as the state of tumour cells mechanics) could favour the appearance  
264 of pockets of more resistant cells and, on the long run, tumour repopulation.

265 Finally, the impact of mechanics on tumour biology takes place at very early stages of tumour  
266 formation, when overgrowth has not yet taken place. With those results in mind, it would be  
267 interesting to revisit tumour systems in other model organisms in which circulating EMT cells are  
268 detected before tumours could be histologically identified, as is the case in the pancreas <sup>48</sup>. In that  
269 case, alterations in the junctional myosin II pattern and associated tension could not only induce EMT  
270 but also be an early biomarker of aggressiveness.

271



272

## 273 **Materials & Methods**

### 274 **Fly stocks**

275 Knock-in and protein trap fluorescent proteins available from Bloomington Drosophila Stock Center  
276 (BDSC) are: ECad-GFP (BDSC\_60584); rhea[MI00296]-mCherry/TM6B (to reveal the Talin protein,  
277 BDSC\_39648), Baz[CC01941]-GFP (BDSC\_51572) and dlg1[MI06353-GFSTF.0] (BDSC\_59417). The sqh-  
278 eGFP[29] was used to reveal Myosin II distribution and was described previously<sup>28</sup>. Viking-TagRFPt is  
279 a knock-in designed and generated by homologous recombination by InDroso functional genomics  
280 (Rennes, France). The tag was inserted in N-terminal just before the ATG, and the resulting flies were  
281 validated by sequencing.

282 Drivers used in this study available from Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) are: rn::Gal4  
283 (BDSC\_7405); pdm2::Gal4[GMR11F02] (BDSC\_49828) and Hml::QF2.Delta (BDSC\_66468).

284 Responsive UAS or QUAS lines obtained from BDSC were: UAS::nls-GFP (BDSC\_4776); UAS::RNAi-  
285 flw[HMS04465] (BDSC\_57022); UAS::Yorkie[3SA] (BDSC\_28817); UAS::Diap1-H (BDSC\_6657) and  
286 QUAS::6x-mCherry-HA (BDSC\_52270). A UAS::lacZ[j] stock was generated in this study by backcrossing  
287 the UAS::lacZ.Exel line (BDSC\_8529) obtained from BDSC with *w<sup>1118</sup>* flies. The UAS::Vhh4-alpha-cat-  
288 TagRFPt stock (i.e. AJ-GFP trap) was described previously in<sup>26</sup> and the HS::Flp on the X chromosome  
289 was reported in<sup>32</sup>.

290 The following stocks were gifts: UAS::alpha-cat-TagRFP stock was obtained from K. Sugimura (iCeMS,  
291 Japan), UAS::miRHG from JH. Park (University of Tennessee, USA) and UAS::FRTstopFRTreaper[10.3]  
292 from D. Fox (Duke University, USA). The Deficiency Df(3L)H99 (BDSC\_1576) that removes the three  
293 pro-apoptotic genes *hid*, *reaper* and *grim* was a gift from H. Steller (Rockefeller University, USA).

294 *w*; *elav::Gal80*; *rn::Gal4/TM6B* and *w*; *elav::Gal80*; *rn::Gal4*, UAS::RNAi-Syx7[GD2767]/TM6B,  
295 *tub::Gal80* stocks were gifts from P. Léopold (Curie Institute, France). The UAS::RNAi-Syx7[GD2767]  
296 original line was originally generated at Vienna Drosophila Resource Center (VDRC). The *w*; *rn::Gal4*,  
297 UAS::Yorkie[3SA]/TM6B, *tub::Gal80* stock was generated in this study. Maintenance of transgenes on  
298 the second chromosome in these backgrounds was achieved by using a red fluorescently labelled CyO  
299 balancer (BDSC\_35523).

300

301 Experiments were performed at 25 degrees in both males and females indifferently, unless indicated  
302 (see below). Loss of function experiments using Syx7 RNAi were carried out at 25 degrees or 30  
303 degrees, depending respectively on the absence or the presence of an additional UAS transgene.  
304 Experiments involving the AJ-GFP trap transgene, either during development or within Yorkie tumours,  
305 were conducted in males only, at 21 degree, to avoid too high induction of cell death.

306

### 307 **Immunostainings and image acquisition**

308 Wing discs at the indicated stage (see below) were dissected in PBS 1x. Tissue were fixed by  
309 paraformaldehyde 4% diluted in PBS 1x during 20 minutes. Then the samples were washed and  
310 saturated in PBS 1x, 0.3% triton x-100 and BSA 1% (BBT). Next, the samples were incubated overnight  
311 at 4°C with primary antibodies diluted in BBT. Samples were washed for 1h in BBT before a 2h  
312 incubation at room temperature with secondary antibodies diluted in BBT. Finally, samples were

313 washed with PBS 1x, 0.3% Triton x-100 for 1h and mounted in Vectashield containing DAPI or TRITC-  
314 Phalloidin (Vector Laboratories). A 120-mm deep spacer (Secure-Seal™ from Sigma-Aldrich) was  
315 placed in between the glass slide and the coverslip to preserve morphology of the tissues.

316 The actin cytoskeleton was labelled using the Rhodamine-Phalloidin probe from Fischer Scientific  
317 (1/500, 2h incubation together with secondary antibodies). Alternatively, samples were mounted in  
318 Vectashield hardset medium complemented with TRITC-Phalloidin (Vector Laboratories). Nuclei were  
319 labelled with DAPI included in Vectashield mounting medium, when necessary.

320 Primary antibodies obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) were: anti-Dlg (4F3-  
321 c, mouse, 1/200); anti-ECad (DCAD2-c, rat, 1/100); anti-betaPS (CF.6G11, mouse, 1/50). Anti-cleaved  
322 Dcp1 (#9578, rabbit, 1/200) was purchased from Cell Signaling Technologies. Anti-Baz (guinea pig,  
323 1/500) was a gift from J. Zallen (Sloan Kettering Institute, USA).

324 Secondary antibodies (Alexa-488, -555 and -647) were purchased from Interchim and diluted at 1:200,  
325 except Alexa-647 at 1:100.

326 Fixed samples were imaged using inverted Zeiss laser scanning confocal microscopes, either LSM880  
327 or LSM900, 25x/0.8 multi immersion, 40x/1.4 oil or 63x/1.4 oil objectives and equipped with a piezo  
328 stage. Images were processed with the Fiji and Imaris softwares.

329

### 330 **Kinetics of tumour development**

331 To perform kinetics of tumour development, or compare tumours at a given timepoint, the following  
332 strategy was used. Virgin females (ultimately 250-300 per cage) were collected in 3-5 days. Males were  
333 crossed with females (about 10 males for 25-30 females) in tubes. Crosses were transferred into cages  
334 to lay eggs on standard fly food medium. Egg-laying was performed for 3 hours at 25°C. Petri dishes  
335 containing the fly food medium and the eggs was transferred either at 25°C (when UAS::Syx7 RNAi is  
336 the sole UAS transgene) or at 29°C (when we used second UAS transgene in addition to the UAS::Syx7  
337 RNAi). On the next day, the medium with eggs was transferred into standard plastic vials also  
338 containing standard fly food, and replaced at 25°C or 29°C. Eggs were aged for the indicated time  
339 before dissection, younger discs being obtained after 96h of incubation at 25°C (i.e. 96h after egg  
340 laying, AEL) or 64h of incubation at 29°C. Timepoints analysed were separated by 12 or 24h, with a  
341 temporal resolution of 3hours (corresponding to the length of the egg-laying). For each experiment,  
342 control crosses were performed in parallel by replacing the UAS::miRHG, UAS::Diap1 or UAS::flapwing  
343 RNAi by a neutral UAS::lacZ transgene or the UAS::Vhh4-alpha-cat-TagRFPT (AJ-GFP-Trap) by the  
344 UAS::alpha-cat-TagRFP.

345 Note that control discs could not be analysed past 120h AEL. This is because control individuals enter  
346 metamorphosis at this timepoint, and wing discs start to undergo morphogenesis, precluding further  
347 comparison with tumoral discs. To determine their size, tumoral discs of 144h AEL and beyond were  
348 therefore compared to 120h AEL control discs.

349

### 350 **Classification of tumour phenotypes**

351 In our experiments, wing discs were classified in 3 categories: normal, hyperplastic and dysplastic. This  
352 subdivision takes 2 parameters into account, the overall size of the wing pouch and the epithelial vs  
353 mesenchymal organization of the tissue within the pouch.

354 For such an analysis, we systematically generated control (non-tumoral discs in which UAS::Syx7 RNAi  
355 or UAS::Yorkie[3SA] were replaced by a neutral UAS::lacZ transgene) of the same age. This allowed to  
356 determine whether the pouch was overgrown or not.

357 We also stained the discs with a combination of markers of epithelium organization: ECadherin or  
358 alpha-Catenin to label adherens junctions, Disc Large (Dlg) to label septate junctions, beta-Integrin or  
359 Talin to label basal adhesions, or Bazooka/Par3 as a marker of apico-basal polarity. Both fluorescent  
360 knock-in/protein trap lines and antibodies were used. A combination of DAPI/Phalloidin was also used,  
361 alone or in combination with the above markers. Organization of the tissue in a monolayer structure,  
362 with defined apical and basal poles, was classified as epithelial. In mesenchymal zones, the monolayer  
363 structure is lost, producing mass-like structures in which apico-basal polarity is lost. This is reflected  
364 for example by the proximity of apical and basal markers, the F-actin cytoskeleton that surrounds the  
365 whole cell or the spacing between nuclei which increases in mesenchymal zones.

366 Experimental wing pouches which were of a similar size than control pouches at the same timepoint,  
367 and in which the tissue is strictly epithelial were classified as "normal". Experimental wing pouches  
368 wider than the pouch of control discs, and in which the tissue is strictly epithelial were classified as  
369 "hyperplastic". Finally, experimental wing pouches wider than the pouch of control discs, and in which  
370 at least one zone is organized in a mesenchymal-like fashion were classified as "dysplastic". Data were  
371 represented as 100% stacked histograms, with normal, hyperplastic and dysplastic discs coloured in  
372 green, yellow and red respectively. Number of discs analysed is indicated in figure legends.

373

#### 374 **Apoptosis ectopic induction**

375 Induction of apoptosis was performed by driving an inducible UAS::FRTstopFRT-reaper transgene  
376 together with UAS::Yorkie[3SA] in the whole wing pouch. Crosses were performed and larvae initially  
377 developed at 25°C, producing hyperplastic tumours. A heat shock was performed at 37°C for 20  
378 minutes, and larvae were grown for 16 additional hours at 25°C before dissection.

#### 379 **Laser dissection**

380 Tissue culture was performed as follow: wing discs were dissected in Schneider's insect medium  
381 (Sigma-Aldrich) supplemented with 15% fetal calf serum and 0.5% penicillin-streptomycin. Wing discs  
382 were transferred on a glass slide in 13.5 uL of this medium confined in a 120 mm-deep double-sided  
383 adhesive spacer (Secure-Seal™ from Sigma-Aldrich). A high precision glass coverslip (n°1.5H,  
384 Marienfeld) was then placed on top of the spacer. Dissection tools are cleaned with ethanol before  
385 dissection.

386 Laser dissection experiments were performed on a Zeiss LSM880 laser scanning microscope fitted with  
387 a pulsed DPSS laser (532 nm, pulse length 1.5 ns, repetition rate up to 1 kHz, 3.5 µJ/pulse) steered by  
388 a galvanometer-based laser scanning device (DPSS-532 and UGA-42, from Rapp OptoElectronic,  
389 Hamburg, Germany). The laser beam was focused through a water-immersion lens of high numerical  
390 aperture (Plan-Apochromat 63x from Zeiss). Experiments were performed using a numerical 2x zoom.  
391 Photo-disruption at adherens junctions was produced in the focal plane by illuminating at 80 % laser  
392 power a 20 pixel line (3 runs). Images of ECadherin-GFP were acquired every 500 ms using a 488 nm  
393 Argon laser and a GaAsP photomultiplier.

#### 394 **Statistical analysis**

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

397 The normality of data sets was determined using Prism 8 (GraphPad). For data sets that follow a normal  
398 law, a two-tailed unpaired Student's t-test was used to assess the significance. Otherwise, a Mann  
399 Whitney test was performed.

400 Significance is denoted as follows according to the p value: \*\*\*\*p<0.0001; \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01;  
401 \*p<0.05; NS p>=0.05 (not significant). Box plot were generated with Prism.

402

### 403 **Quantifications**

#### 404 - **Acto-myosin and Collagen IV intensity**

405 To quantify acto-myosin, confocal Z-stacks were acquired, with a 25x multi immersion objective, and  
406 a resolution of 1.11µm in x/y and 1µm in z respectively. We systematically imaged the whole disc, both  
407 in x-y and in depth. Z-stacks were analyzed by generating sagittal sections with the Fiji software. For  
408 each sagittal section, two segmented lines (with a thickness of 5) were drawn on the apical surface of  
409 the epithelium: one in the notum/hinge region (internal control) and one in the pouch region  
410 (experimental zone). The mean fluorescence intensity for each marker of interest was measured and  
411 the value in the pouch was divided by the value in the unmanipulated notum/hinge region to obtain a  
412 normalized value. 3 sagittal sections were analyzed with this strategy per disc, and the averaged value  
413 was calculated. Analysis was conducted on tissues stained with Phalloidin to reveal the F-actin  
414 cytoskeleton, and on the sqh-eGFP knock-in line to visualize myosin II.

415 For quantifications on the basal side, a similar strategy was performed, except segmented lines with a  
416 thickness of 3 were used. Quantifications of Collagen IV were performed on the Viking-TagRFPT knock-  
417 in line, with the segmented lines drawn on the basal side of the epithelium by following Viking-TagRFPT  
418 staining. For quantification of basal stainings, the control region analyzed was the hinge region, in with  
419 there is only a monolayer epithelium, as in the pouch. The notum region was avoided, since a layer of  
420 mesenchymal-like adepithelial cells lies underneath the disc epithelium, which could complicate  
421 Collagen IV measurements.

#### 422 - **ECadherin and Disc Large intensity after cell death induction**

423 Quantifications of E-cadherin and Disc large after cell death induction were performed on tissues  
424 obtained as indicated in the "Apoptosis ectopic induction" section. Single plane confocal images were  
425 acquired with 40x/1.4 oil objective, with a x/y resolution of 0.078 µm and an image size of 2048\*2048  
426 pixels. Images were taken in region in which a zone with massive apoptosis was in close vicinity to a  
427 zone with low/no apoptosis. Segmented lines were drawn at the level of adherens junctions (ECad  
428 staining, line thickness of 15) or at the level of septate junctions (Dlg staining, line thickness of 25). 2  
429 to 3 measures were made in both the apoptotic and the non-apoptotic zones, which were recognized  
430 based on nuclei integrity.

#### 431 - **apoptosis volume**

432 To quantify apoptosis levels, discs were stained with the anti-cleaved Dcp1 antibody, which labels the  
433 activated form of the executioner Caspase Dcp1. Discs were counterstained with DAPI to visualize the  
434 whole disc morphology. Confocal Z-stacks were acquired, with a 25x multi immersion objective. We  
435 systematically imaged the whole disc, both in x-y and in depth. 3D image stacks were reconstructed  
436 using Imaris software (Bitplane). The channel corresponding to the apoptotic staining was segmented

437 in Imaris and the total volume was calculated by summing up the volume of each apoptotic cell or  
438 fragment.

439 - **macrophages number**

440 A similar strategy than the one used to quantify apoptosis volume was used, except that the Spot  
441 detection function was used in Imaris. A threshold of 7 $\mu$ m was set up to detect the spot, based on the  
442 average size of macrophages initially determined. Macrophages were labelled using expression of a  
443 QUAS::mCherry fluorescent protein driven by the Hml::QF2 driver.

444

445

446 **Acknowledgments:** We thank Alice Davy and Corinne Benassayag for their constructive comments on  
447 the manuscript. We thank K.Sugimura, J.H.Park, H.Steller, P.Léopold and BDSC for sharing fly stocks  
448 and J.Zallen and DGRC for providing reagents.

449

450 **Funding:** MS's lab is supported by grants from the National Agency of Research (ANR, PRC  
451 AAPG2021, CellPhy) and from the Research Association against Cancer (ARC, Programme Labélisé  
452 AAP2020, ARCPGA12020010001154\_1591). MM was supported by MENRT and ARC fellowships.

453

454 **Author contributions:** MM performed the experiments with the help of BM. BM and MS supervised  
455 the project and wrote the manuscript. MS provided funding.

456

457 **Competing interests:** Authors declare that they have no competing interests.

458

459 **Data and materials availability:** All data are available in the main text or the supplementary materials.

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

## **FIGURES**



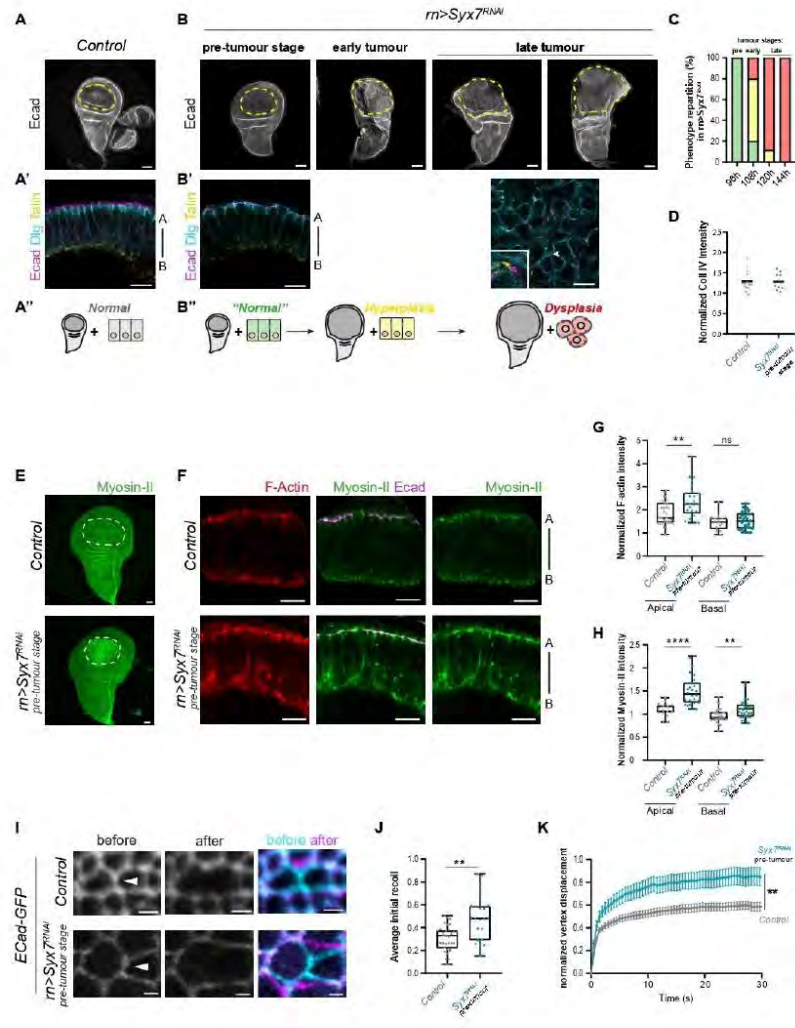


Figure 1

472

473

474 **Figure 1. Increased adherens junction contractility constitutes an early marker of**  
475 **tumorigenesis.**

476 (A, B) E-Cad staining of control (A) and Syx7 RNAi (B) wing discs (projections), showing overall  
477 tissue morphology. The region of Syx7 RNAi expression, the wing pouch, is delineated by a  
478 dotted yellow line. In (B), discs shown from left to right were collected at 96h, 108h, 120h and  
479 144h after egg laying (AEL). Note the progressive increase in size of the pouch domain in Syx7  
480 RNAi discs from 108h onwards. The control disc shown in (A) was collected at 96h AEL. (A',  
481 B') Single plane close up showing organisation of wing pouch tissues at the 96h AEL from  
482 control (A') and Syx7 RNAi disc (B', left), and at 120h after tumour formation (B', right). Note  
483 that cells were epithelial at 96h, but have become mesenchymal at 120h AEL in Syx7 RNAi  
484 tumours, with apical (ECad and Dlg, magenta and cyan) and basal (Talin, yellow) structures in  
485 close vicinity (see inset taken at the level of the arrowhead), and cells becoming round. (A'',  
486 B'') Schemes summarizing global tissue size and tissue organization (epithelial vs  
487 mesenchymal) as illustrated in (A-B'). Stages (normal, hyperplasia, dysplasia) are therefore  
488 determined based on the size of the wing pouch and the cellular organisation. (C) Histogram  
489 showing the repartition of wing disc phenotypes at the indicated time points (+/- 1.5h), in Syx7  
490 RNAi tumours according to the legend in (B''). Number of discs analysed at 96, 108, 120h and  
491 144h AEL are respectively 46, 15, 26, 31. (D) Analysis of extracellular matrix intensity in control  
492 (grey, n=15) and Syx7 RNAi (blue, n=12) at the pre-tumour stage (96h AEL). The intensity of  
493 Collagen IV was quantified on sagittal sections (as shown in Sup Fig.1D). On the graph, each  
494 dot corresponds to the level of Collagen IV expression in one individual disc. (E) Wing discs  
495 expressing endogenous myosin II-GFP (green) at the pre-tumour stage (96h AEL), showing  
496 myosin II accumulation in the pouch (white dashed line) following Syx7 RNAi knockdown  
497 (bottom) compared to the control (top). (F) Close up views showing F-actin (red), myosin II  
498 (green) and E-cadherin (magenta) in control (top) and Syx7 RNAi (bottom) epithelial tissues at  
499 the pre-tumour stage (96h AEL). Note the accumulation of F-actin and myosin II at adherens  
500 junctions before any sign of tumour in Syx7 RNAi. (G, H) Box plots showing F-actin (G) and  
501 myosin II (H) fluorescence levels at adherens junctions (apical) and basal junctions (basal) in  
502 the wing pouch of control (grey) and Syx7 RNAi (blue) discs at the pre-tumour stage (96h AEL).  
503 Pouch levels are normalized with levels in the unmanipulated hinge/notum region for each  
504 disc. Numbers of discs analysed in control and Syx7 RNAi discs are respectively 31 and 25 in  
505 apical and 16 and 25 in basal for (G) and 40 and 32 in apical and 25 and 32 in basal for (H).  
506 (I-K) Analysis of adherens junction tension by laser ablation in control and Syx7 RNAi discs  
507 expressing E-Cadherin-GFP at the pre-tumour stage (96h AEL). (I) Example of single plane  
508 images before and after laser ablation. (J) Box plots showing quantification of the initial recoil  
509 of junctions from control (grey, n=33) and Syx7 RNAi (blue, n=23). (K) Curves of normalized

510 vertex displacement following laser ablation in the same genetic backgrounds. Number of  
511 junctions analysed: 33 and 29 in control and Syx7 RNAi respectively.

512 In all panels, transgenes are driven in the wing pouch using the *rotund*:Gal4 driver at 25°C.  
513 Scale bars: 10µm, except 50µm for panels A, B, E and 2µm for panel I. Apical-basal (A-B) is  
514 indicated for each close up showing a polarized epithelial tissue. In box plots, the black bar  
515 indicates the median, the whiskers indicate the maximal range, and each value is indicated by  
516 a dot. Statistical tests: T-test for (G, J, K) and Mann-Whitney for (D, H). p-value: \*\*, <0.01; \*\*\*,  
517 <0.0001, ns, non-significant.

518

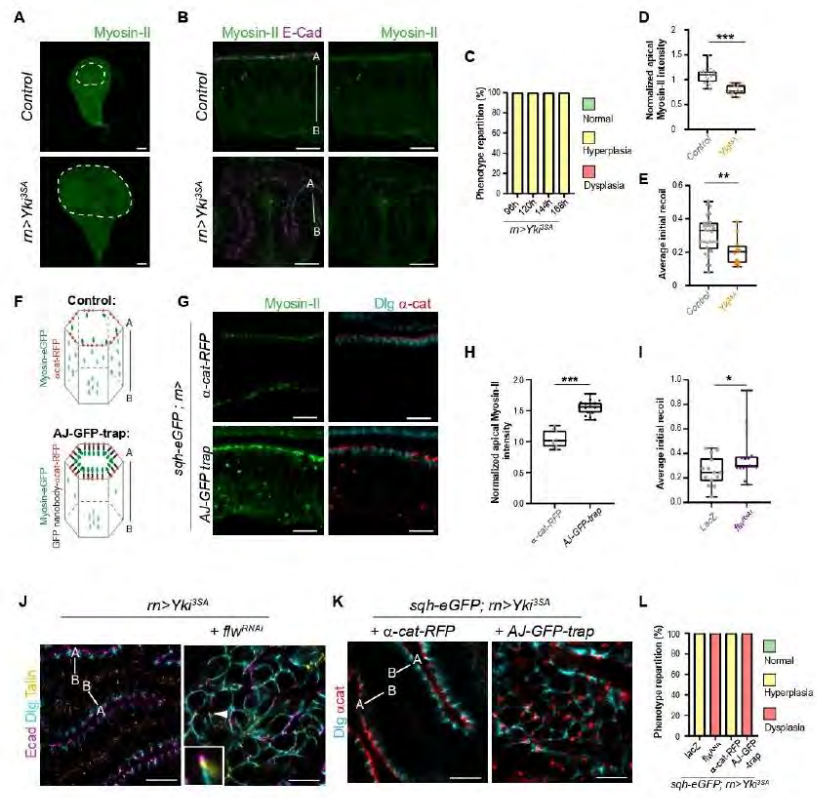


Figure 2

519

520

521 **Figure 2. High tumour cell contractility triggers dysplasia.**

522 (A) Wing discs expressing endogenous myosin II-GFP (green) at 96h AEL, in control (top) and  
523 Yorkie overexpression (bottom). Myosin II does not accumulate in the pouch (white dashed  
524 line) following Yorkie overexpression. (B) Close up views showing myosin II (green) and E-  
525 cadherin (magenta) in control (top) and Yorkie overexpression (bottom) contexts (96h AEL).  
526 Note epithelial convolutions associated with tissue hyperplasia in Yorkie tumours. (C)  
527 Histogram showing the repartition of wing disc stages at the indicated time points (+/- 1.5h) in  
528 Yorkie tumours. Number of discs analysed at 96h, 120h, 144h, 168h AEL are respectively 47,  
529 43, 18, 12. (D) Box plots showing myosin II fluorescence levels at adherens junctions in the  
530 wing pouch of control (grey, n= 24) and Yorkie overexpression (orange, n=14) contexts at 96h  
531 AEL. (E) Analysis of adherens junction tension by laser ablation in control (grey) and Yorkie  
532 overexpression (orange) contexts expressing E-Cadherin-GFP at 96h AEL. Box plots shows  
533 quantification of the initial recoil of junctions (n=33 in control and 12 in Yorkie). (F) Principle of  
534 AJ-GFP-trap function to target myosin II-GFP accumulation specifically at adherens junctions.  
535 Cytoplasmic and adherens junctions' pools of myosin II are respectively shown in light and  
536 dark green. (G-I) Analysis of wing discs mechanics in late third instar larvae. (G) Close up  
537 views of the epithelial tissue showing myosin II (green) and adherens junctions (red). Note the  
538 strong enrichment of myosin II at adherens junctions caused by the presence of the AJ-GFP  
539 trap (bottom), compared to the control (top). Dlg (cyan) localisation is still localised apically  
540 following enrichment of myosin II caused by the trap (bottom). (H) Quantification of myosin II-  
541 GFP levels at adherens junctions of the wing pouch in control discs (expressing alpha-catenin-  
542 RFP, n=9), or following expression of the AJ-GFP trap fused to alpha-catenin-RFP (n=15). (I)  
543 Analysis of adherens junction tension by laser ablation in control (expressing lacZ, grey) and  
544 flapwing RNAi discs (magenta) co-expressing E-Cadherin-GFP. Box plots show quantification  
545 of the initial recoil of junctions following laser ablation. Number of junctions analysed: 14 and  
546 16 in control and flapwing RNAi respectively. (J) Close up views of the organisation of Yorkie  
547 tumours without (control, left, n=27) or with myosin II increase at adherens junction due to  
548 flapwing RNAi knockdown (right, n=4). Cell rounding and loss of epithelial organisation is  
549 associated with loss of segregation of apico-basal polarity makers, as shown by E-  
550 Cadherin/Dlg/Talin proximity in the inset taken at the level of the arrowhead. (K) Close up views  
551 of the organisation of Yorkie tumours without (alpha-Catenin-RFP expression, left, n=30) or  
552 with myosin II increase at adherens junction due to expression of the AJ-GFP trap (right, n=17).  
553 (L) Histogram showing the repartition of Yorkie tumours co-expressing the indicated  
554 transgenes. Numbers of discs analysed: alpha-cat-RFP (control), 30; AJ-GFP-Trap, 17; lacZ  
555 (control), 14; *flapwing* RNAi, 16.

556 The same controls are shown in (E) and in figure 1J (same set of experiments). Transgenes  
557 are driven in the wing pouch using the *rotund::Gal4* driver at 25°C, apart from panels (I) where  
558 *pdm2::Gal4* was used, and experiments with the AJ-GFP trap which were conducted at 22°C.  
559 Scale bars: 10µm, except 50µm for panels A. Apical-basal (A-B) is indicated for each close up  
560 illustrating an epithelial tissue. In box plots, the black bar indicates the median, the whiskers  
561 indicate the maximal range, and each value is indicated by a dot. Statistical tests: T-test in D  
562 and I or Mann-Whitney in E, H. p-value: \*, <0.05; \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001; ns, non-significant).

563

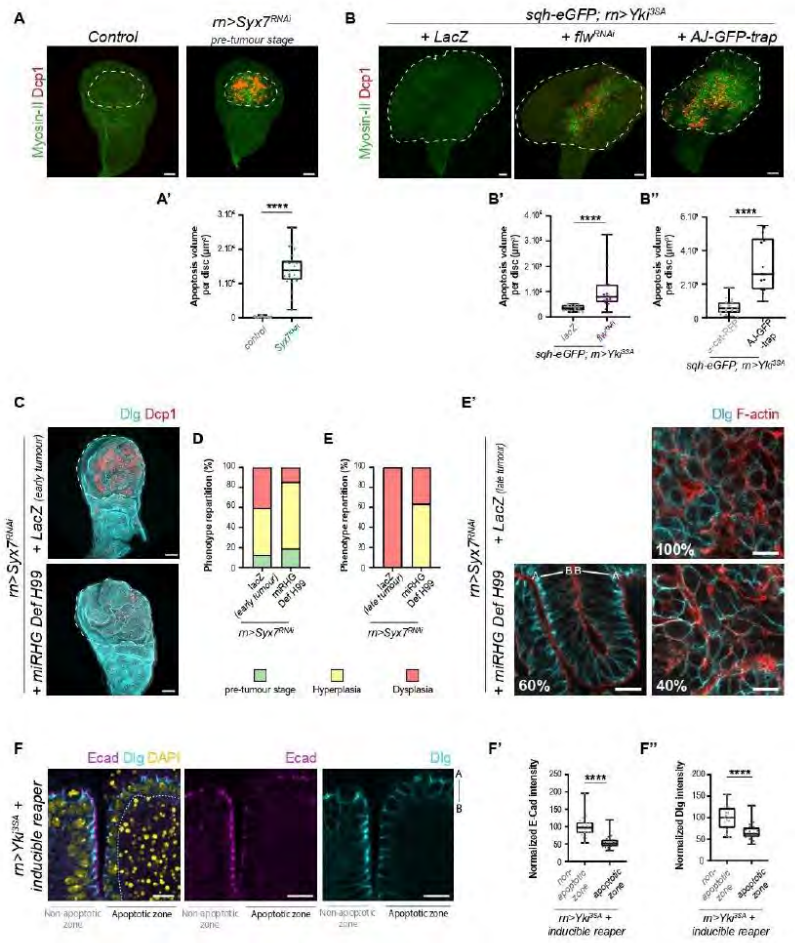


Figure 3

564

565



566 **Figure 3. Apoptosis is triggered by high adherens junction tension and facilitates**  
567 **tumour evolution**

568 (A) Global views (projections) of pre-tumour stage (96h AEL) wing discs, either control (left) or  
569 expressing Syx7 RNAi (right). Note that apoptosis (Dcp-1 staining, red) spatially coincides with  
570 the region of myosin II enrichment (green). (A') Quantification of apoptosis in control discs  
571 (n=26) and Syx7 RNAi tumours (n=26) at 96h AEL. (B) Global views (projections) of Yorkie  
572 tumours (discs overexpressing Yorkie) co-expressing lacZ (used as a control, left), *flapwing*  
573 RNAi (middle) or the AJ-GFP trap (GFP trap fused to alpha-Catenin-RFP, right). Note that here  
574 again, apoptosis (Dcp-1 staining, red) spatially coincides with regions of myosin II enrichment  
575 (green). (B') Quantification of apoptosis in Yorkie tumours concomitantly expressing lacZ  
576 (n=14) or *flapwing* RNAi (n=16) to increase myosin II levels. (B'') Quantification of apoptosis in  
577 Yorkie tumours concomitantly expressing alpha-Catenin-RFP (control, n=18) or the AJ-GFP  
578 trap (n=14) to increase myosin II-GFP levels at adherens junctions. (C) Global views  
579 (projections) of Syx7 RNAi wing discs of the same age (96h AEL at 30°C, which corresponds  
580 to early tumour stage in the control), either co-expressing lacZ (control, top) or miRHG in a  
581 Deficiency H99 / + background to inhibit apoptosis (bottom). Note that overall size and shape  
582 of Syx7 RNAi tumours with or without apoptosis is similar. (D, E) Histograms of phenotype  
583 repartition in Syx7 RNAi discs of the same age with (lacZ) or without (miRHG H99) apoptosis.  
584 Control discs are at early tumour stage in (D) (96h at 30°C) and at the late tumour stage in (E)  
585 (128h AEL at 30°C). Number of discs analysed: 32 and 19 in lacZ in (D) and (E) respectively;  
586 21 and 22 in miRHG H99 in (D) and (E) respectively. (E') Close up views of Syx7 RNAi tumours  
587 of equivalent age with (lacZ) or without (miRHG DefH99) apoptosis, corresponding to tumours  
588 analysed in (E). (F) Single plane image showing the state of adherens junctions and septate  
589 junctions, respectively labelled with E-Cad (magenta) and Dlg (cyan), in a Yorkie tumour in  
590 which apoptosis was induced through controlled *reaper* expression. Apoptosis was massively  
591 induced on the right side, but not on the left side of the image. DAPI staining (yellow) labelling  
592 nuclei shows the zone of apoptosis induction, with condensed DNA and numerous fragments  
593 accumulated. (F', F'') Quantification of E-Cad (F') and Dlg (F'') expression levels in apoptotic  
594 versus non-apoptotic zones of Yorkie tumours, as shown in (F). Number of discs analysed: 20.

595 Transgenes are driven in the wing pouch using the *rotund::Gal4* driver at 25°C, apart from  
596 panels (C-E') at 30°C, and experiments with the AJ-GFP trap at 22°C. Scale bars: 10µm for  
597 panels E' and F; 50µm for A, B, D. Apical-basal (A-B) is indicated for each close up illustrating  
598 an epithelial tissue. In box plots, the black bar indicates the median, the whiskers indicate the  
599 maximal range, and each value is indicated by a dot. Statistical tests: T-test in B'' or Mann-  
600 Whitney in A', B'. p-value, Wilcoxon in F' and paired T-test in F'': \*\*\*\*, <0.0001.

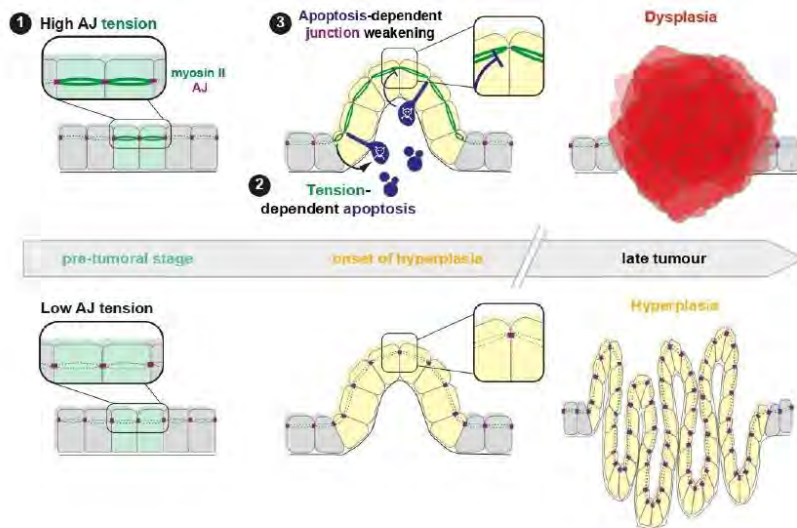


Figure 4

601

602 **Figure 4:** Model of tumour evolution controlled by adherens junction tension and apoptosis.

603 Tumour evolution from the pre-tumoral stage (left) to late tumours (right) depending on whether  
 604 adherens junctions (AJ, magenta) are under high tension (top row) or low tension (bottom row).  
 605 High adherens junction tension (1) is caused by myosin II accumulation (dark green) starts at  
 606 the pre-tumoral stage (cells in light green) and induces apoptosis (2). Apoptosis (blue) triggers  
 607 weakening of adherens junctions (3) and tight junctions (not illustrated) in surrounding living  
 608 cells, thereby facilitating the switch from hyperplasia (yellow cells) to dysplasia (red cells). High  
 609 AJ tension can also triggers dysplasia, independently of apoptosis (not depicted). On the  
 610 contrary, when tension is low at AJ, hyperplasia expands but does not switch into dysplasia.

611

612

613 **REFERENCES**

- 614 1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**,  
615 646–674 (2011).
- 616 2. Buckley, C. E. & St Johnston, D. Apical-basal polarity and the control of epithelial  
617 form and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 559–577 (2022).
- 618 3. Abdulkadir, S. A. Mechanisms of prostate tumorigenesis: roles for transcription  
619 factors Nkx3.1 and Egr1. *Ann N Y Acad Sci* **1059**, 33–40 (2005).
- 620 4. Bell, G. P. & Thompson, B. J. Colorectal cancer progression: lessons from  
621 *Drosophila*? *Semin Cell Dev Biol* **28**, 70–77 (2014).
- 622 5. Lin, E. Y. *et al.* Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein  
623 mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* **163**,  
624 2113–2126 (2003).
- 625 6. Pastushenko, I. *et al.* Identification of the tumour transition states occurring during  
626 EMT. *Nature* **556**, 463–468 (2018).
- 627 7. Pastushenko, I. & Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and  
628 Metastasis. *Trends Cell Biol* **29**, 212–226 (2019).
- 629 8. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-  
630 mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 69–84 (2019).
- 631 9. Dongre, A. *et al.* Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to  
632 Immunosuppression in Breast Carcinomas. *Cancer Res* **77**, 3982–3989 (2017).
- 633 10. Dongre, A. *et al.* Direct and Indirect Regulators of Epithelial-Mesenchymal Transition-  
634 Mediated Immunosuppression in Breast Carcinomas. *Cancer Discov* **11**, 1286–1305 (2021).
- 635 11. Shibue, T. & Weinberg, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link  
636 and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 611–629 (2017).
- 637 12. Fernández-Sánchez, M. E. *et al.* Mechanical induction of the tumorigenic  $\beta$ -catenin  
638 pathway by tumour growth pressure. *Nature* **523**, 92–95 (2015).
- 639 13. Mohammadi, H. & Sahai, E. Mechanisms and impact of altered tumour mechanics.  
640 *Nat Cell Biol* **20**, 766–774 (2018).
- 641 14. Levental, K. R. *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing  
642 integrin signaling. *Cell* **139**, 891–906 (2009).
- 643 15. Lopez, J. I., Kang, I., You, W.-K., McDonald, D. M. & Weaver, V. M. In situ force  
644 mapping of mammary gland transformation. *Integr Biol (Camb)* **3**, 910–921 (2011).
- 645 16. Chen, X. *et al.* Biomechanics of cancer stem cells. *Essays Biochem* **66**, 359–369  
646 (2022).
- 647 17. Alibert, C., Goud, B. & Manneville, J.-B. Are cancer cells really softer than normal  
648 cells? *Biol Cell* **109**, 167–189 (2017).
- 649 18. Tavares, S. *et al.* Actin stress fiber organization promotes cell stiffening and  
650 proliferation of pre-invasive breast cancer cells. *Nat Commun* **8**, 15237 (2017).

- 651 19. Külshammer, E. *et al.* The mechanosensor Filamin A/Cheerio promotes  
652 tumorigenesis via specific interactions with components of the cell cortex. *FEBS J* **289**,  
653 4497–4517 (2022).
- 654 20. Samuel, M. S. *et al.* Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue  
655 stiffness and  $\beta$ -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer*  
656 *Cell* **19**, 776–791 (2011).
- 657 21. Lu, H. & Bilder, D. Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in  
658 *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **7**, 1232–1239 (2005).
- 659 22. Andersen, D. S. *et al.* The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell  
660 polarity and neoplastic growth. *Nature* **522**, 482–486 (2015).
- 661 23. Colombani, J., Andersen, D. S. & Léopold, P. Secreted peptide Dilp8 coordinates  
662 *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* **336**, 582–585 (2012).
- 663 24. Herranz, H., Eichenlaub, T. & Cohen, S. M. Cancer in *Drosophila*: Imaginal Discs as a  
664 Model for Epithelial Tumor Formation. *Curr Top Dev Biol* **116**, 181–199 (2016).
- 665 25. Oh, H. & Irvine, K. D. In vivo analysis of Yorkie phosphorylation sites. *Oncogene* **28**,  
666 1916–1927 (2009).
- 667 26. Martin, E. *et al.* Arp2/3-dependent mechanical control of morphogenetic robustness in  
668 an inherently challenging environment. *Dev Cell* **56**, 687–701.e7 (2021).
- 669 27. Harmansa, S., Alborelli, I., Bieli, D., Caussin, E. & Affolter, M. A nanobody-based  
670 toolset to investigate the role of protein localization and dispersal in *Drosophila*. *Elife* **6**,  
671 e22549 (2017).
- 672 28. Ambrosini, A., Rayer, M., Monier, B. & Suzanne, M. Mechanical Function of the  
673 Nucleus in Force Generation during Epithelial Morphogenesis. *Dev Cell* **50**, 197–211.e5  
674 (2019).
- 675 29. Urbano, J. M., Naylor, H. W., Scarpa, E., Muresan, L. & Sanson, B. Suppression of  
676 epithelial folding at actomyosin-enriched compartment boundaries downstream of Wingless  
677 signalling in *Drosophila*. *Development* **145**, dev155325 (2018).
- 678 30. Vereshchagina, N. *et al.* The essential role of PP1beta in *Drosophila* is to regulate  
679 nonmuscle myosin. *Mol Biol Cell* **15**, 4395–4405 (2004).
- 680 31. Pérez-Garijo, A. & Steller, H. Spreading the word: non-autonomous effects of  
681 apoptosis during development, regeneration and disease. *Development* **142**, 3253–3262  
682 (2015).
- 683 32. Monier, B. *et al.* Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding.  
684 *Nature* **518**, 245–248 (2015).
- 685 33. Toyama, Y., Peralta, X. G., Wells, A. R., Kiehart, D. P. & Edwards, G. S. Apoptotic  
686 force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science* **321**, 1683–1686  
687 (2008).
- 688 34. Pfeffer, C. M. & Singh, A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol*  
689 *Sci* **19**, E448 (2018).

690 35. Huang, Q. *et al.* Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during  
691 cancer radiotherapy. *Nat Med* **17**, 860–866 (2011).

692 36. Ford, C. A. *et al.* Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell  
693 lymphoma. *Curr Biol* **25**, 577–588 (2015).

694 37. Diwanji, N. & Bergmann, A. Basement membrane damage by ROS- and JNK-  
695 mediated Mmp2 activation drives macrophage recruitment to overgrown tissue. *Nat Commun*  
696 **11**, 3631 (2020).

697 38. Fogarty, C. E. *et al.* Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced  
698 Proliferation via Drosophila Macrophages. *Curr Biol* **26**, 575–584 (2016).

699 39. Pérez, E., Lindblad, J. L. & Bergmann, A. Tumor-promoting function of apoptotic  
700 caspases by an amplification loop involving ROS, macrophages and JNK in Drosophila. *Elife*  
701 **6**, e26747 (2017).

702 40. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–  
703 45 (2016).

704 41. D'Angelo, E. *et al.* Intrinsic and Extrinsic Modulators of the Epithelial to Mesenchymal  
705 Transition: Driving the Fate of Tumor Microenvironment. *Front Oncol* **10**, 1122 (2020).

706 42. Levayer, R., Pelissier-Monier, A. & Lecuit, T. Spatial regulation of Dia and Myosin-II  
707 by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis.  
708 *Nat Cell Biol* **13**, 529–540 (2011).

709 43. Cavanaugh, K. E., Staddon, M. F., Munro, E., Banerjee, S. & Gardel, M. L. RhoA  
710 Mediates Epithelial Cell Shape Changes via Mechanosensitive Endocytosis. *Dev Cell* **52**,  
711 152-166.e5 (2020).

712 44. Spadaro, D. *et al.* Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the  
713 Junctional Localization of Its Interactors. *Curr Biol* **27**, 3783-3795.e8 (2017).

714 45. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).

715 46. Pavlyukov, M. S. *et al.* Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote  
716 Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell* **34**,  
717 119-135.e10 (2018).

718 47. Berthenet, K. *et al.* Failed Apoptosis Enhances Melanoma Cancer Cell  
719 Aggressiveness. *Cell Rep* **31**, 107731 (2020).

720 48. Rhim, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*  
721 **148**, 349–361 (2012).

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

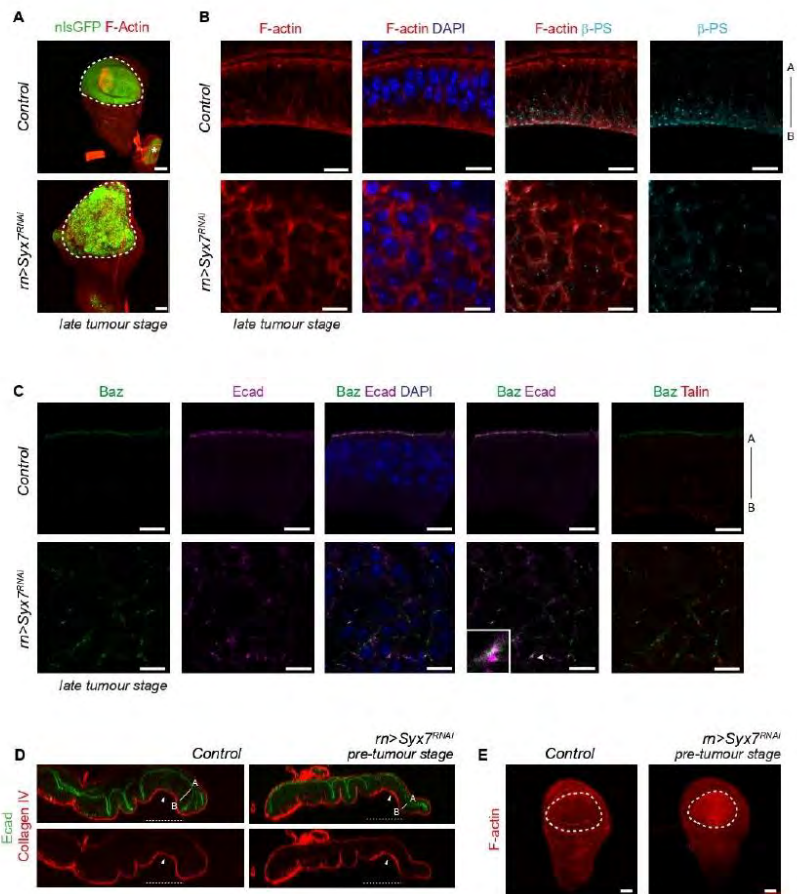
735

736

737

738

## Supplementary Materials



Supplementary Fig. 1

739

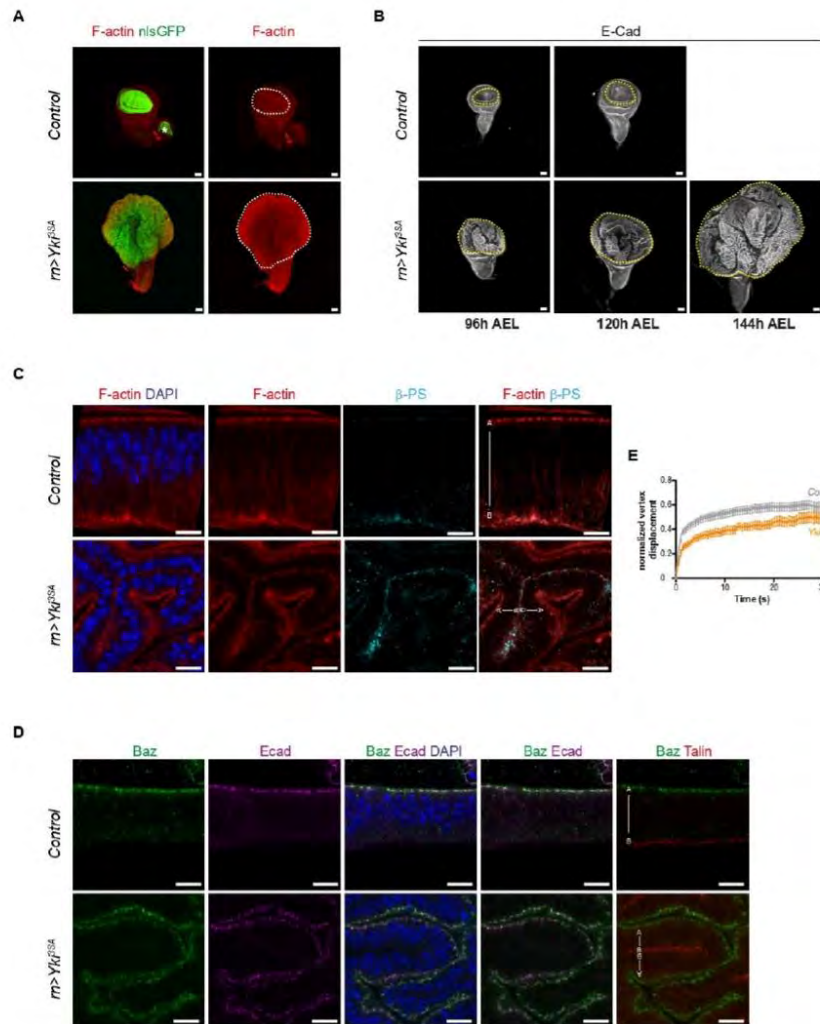
740



741 **Supplementary Figure 1. Additional characterization of Syx7 RNAi tumour organisation**

742 (A) General views (projections) of *Drosophila* wing discs stained for F-actin (red) to reveal  
743 overall tissue morphology in the control (top) or Syx7 RNAi disc at the late tumour stage  
744 (bottom). A nuclear GFP (green) is expressed in the wing pouch to highlight the domain of  
745 interest in this study (surrounded by a dashed line). Note that the green staining indicated by  
746 the asterisk in the control correspond to a haltere disc, which is not analysed in this study. (B,  
747 C) Close up views showing tissue organisation in control discs (approximately 120h AEL, top  
748 row) and late tumour stage Syx7 RNAi discs (approximately 144h AEL, bottom row). In (B),  
749 discs were stained with phalloidin to reveal F-actin and beta-PS antibody to reveal Integrin  
750 receptors. Note tissue disorganisation associated with epithelial-to-mesenchymal transition in  
751 Syx7 RNAi tumours, with rounder cells instead of a columnar organisation, F-actin  
752 redistributing all around the cell cortex instead of accumulating essentially at apical and basal  
753 poles, and mislocalised dots of Integrins. In (C), discs were labelled using endogenous E-  
754 Cadherin fused to GFP (ECad, magenta), endogenous Talin fused to mCherry to label Integrin  
755 associated basal adhesions (red), and an antibody against the junctional component  
756 Par3/Bazooka (Baz, green) which is a key component of epithelial apico-basal cell polarity.  
757 Like in (B), note the disorganisation of the tissue following Syx7 knockdown, with mislocalised  
758 dots for each marker. Dots for apical (ECad, Baz) and basal (Talin) markers can be observed  
759 in close vicinity, indicating the loss of polarity. Note also that while Ecad and Baz colocalize in  
760 control epithelium, they do not systematically colocalize in Syx7 RNAi tumours (see inset taken  
761 at the level of the arrowhead). Number of discs analysed are respectively 6 and 2 in control  
762 and Syx7 RNAi in (B) and 11 and 9 in control and Syx7 RNAi in (C). (D) Analysis of extracellular  
763 matrix distribution in control (left, n=15) and Syx7 RNAi (right, n=12) at the pre-tumour stage  
764 (96h AEL) in the wing pouch (underlined by dashed lines). Representative sagittal sections are  
765 shown, with high ECM staining on the basal side (arrowhead), as revealed by Collagen IV-  
766 TagRFPt staining (red). The epithelium, and especially its apical side, is revealed by ECad  
767 staining (green). At that stage, Collagen IV is normally distributed in the wing pouch of Syx7  
768 RNAi tumours. (E) General views (projections) of *Drosophila* wing discs stained for F-actin  
769 (red) to reveal overall tissue morphology in the control (left) or Syx7 RNAi disc at the early  
770 tumour stage (right). The wing pouch is indicated by a white dashed line. Scale bars: 50µm in  
771 A and E, 10µm in B and C. A-B indicate apical-basal polarity in the control and Syx7 RNAi pre-  
772 tumoral epithelium.

773



Supplementary Fig. 2

774

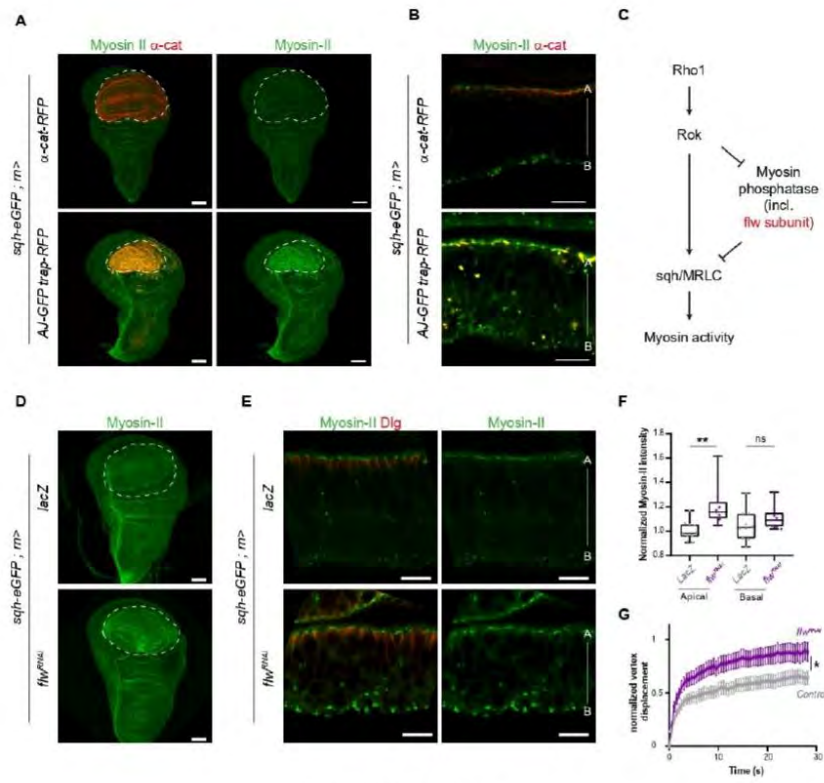
775

776 **Supplementary Figure 2. Additional characterization of Yorkie tumours**

777 (A) General views (projections) of *Drosophila* wing discs stained for F-actin (red), to reveal  
778 overall disc morphology, and expressing a nuclear GFP in the wing pouch to reveal its size in  
779 control (top) and following Yorkie overexpression (bottom). (B) General views (projections) of  
780 *Drosophila* wing discs stained for E-Cadherin (white) to reveal overall tissue morphology at the  
781 indicated timepoints (+/- 1.5 hour) for control (top row) or Yorkie overexpression (bottom row)  
782 conditions. The wing pouch is delineated by the yellow dashed line. Note the strong increase  
783 in pouch size in discs overexpressing Yorkie compared to the control at any timepoint as well  
784 as at successive timepoints. Control animals enter pupariation just after 120h AEL, preventing  
785 further analysis of larval tissues in this condition. On the contrary, Yorkie tumours lead to an  
786 extension of larval life, and further analysis of larval tissues is possible at timepoints such as  
787 144h AEL and beyond. Number of discs analysed are indicated in legend of Figure.2C. (C, D)  
788 Close up views showing tissue organisation in control discs (approximately 120h AEL, top row)  
789 and late Yorkie tumours (approximately 144h AEL, bottom row). DAPI was used to reveal  
790 nuclei (blue). A-B indicate apical-basal polarity. In (C), discs were stained with phalloidin to  
791 reveal F-actin, and beta-PS antibody to reveal Integrin receptors. Note that despite multiple  
792 convolutions, the tissue keeps an epithelial organisation in Yorkie tumours, with a columnar  
793 organisation, F-actin still accumulated essentially at apical and basal poles, and strictly basal  
794 dots of Integrins are observed. In (D), discs were labelled using endogenous E-Cadherin  
795 (ECad) fused to GFP (magenta), endogenous Talin fused to mCherry to label Integrin  
796 associated basal adhesions (red), and an antibody against the junctional component  
797 Par3/Bazooka (Baz, green) which is a key component of epithelial apico-basal cell polarity.  
798 Like in (C), note the polarized organisation of the tissue following Yorkie overexpression, and  
799 the colocalization of ECad and Baz, as expected for epithelial cells. Apical (ECad, Baz) and  
800 basal (Talin) markers are observed at opposite cell poles, indicating the maintenance of  
801 epithelial polarity. Number of discs analysed are respectively 6 and 8 in control and Yorkie  
802 overexpression conditions in (C) and 11 and 14 in control and Yorkie overexpression  
803 conditions in (D). (E) Analysis of adherens junction tension by laser ablation in control (grey)  
804 and Yorkie (orange) discs expressing E-Cadherin-GFP at 96h AEL. Curves of vertex  
805 displacement following laser ablation are shown. The number of junctions analysed in control  
806 and Yorkie overexpression conditions are respectively of 33 and 12. Related to Fig.2E. Scale  
807 bars: 50µm. in A, B and 10µm in C, D. Statistical test: T-test in E. p-value: ns, non-significant.

808

809



Supplementary Fig. 3

810

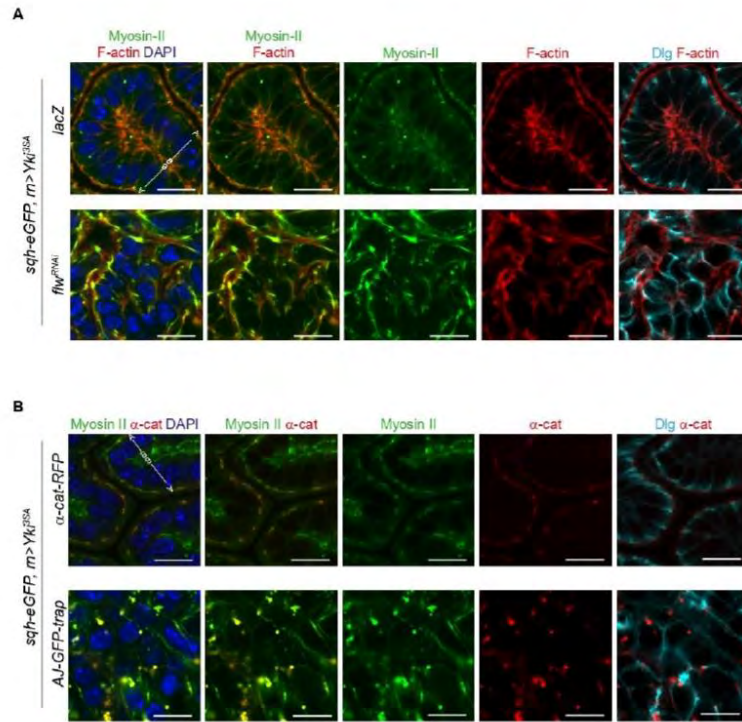
811

812 **Supplementary Figure 3. Increase in myosin II levels at adherens junctions caused by**  
813 **flapwing inhibition or AJ-GFP-trap expression**

814 (A, B) General views (projections) and close up views (single plane, B) of wing discs in which  
815 either alpha-catenin-TagRFP (control, top) or the AJ-GFP-trap (bottom) are expressed  
816 specifically in the pouch (indicated by the dashed line). The AJ-GFP-trap is constituted by a  
817 fusion between a nanobody that recognizes GFP, the adherens junction constituent alpha-  
818 Catenin and the TagRFP fluorescent molecule to follow its subcellular localisation. The  
819 regulatory subunit of myosin II, Sqh, is endogenously tagged with eGFP. (B) The close-up  
820 views illustrate that myosin II (green) levels are increased at the level of adherens junctions in  
821 presence of the AJ-GFP-trap (colocalization with the TagRFP, red). Note that myosin II alone  
822 and Dlg staining from the same images are shown in Fig.2G. (C) Scheme of myosin II  
823 regulation by a balance of phosphorylation/dephosphorylation. (D, E) General views  
824 (projections, D) and close up views (single plane, E) of wing discs either control (expressing  
825 lacZ, top) or in which the myosin II phosphatase activity is reduced due to flapwing RNAi  
826 expression (bottom). The wing pouch is indicated by a dashed line. Note the increase in myosin  
827 II levels caused by flapwing inactivation. (E) The close-up views illustrate that the apico-basal  
828 polarity is maintained, with Dlg (red) still localized at apical tight (septate) junctions. Number  
829 of discs analysed: 5 and 7 in control and *flapwing* RNAi respectively. (F) Quantification of  
830 myosin II-GFP levels at adherens junctions (apical) or basal junctions (basal) in control  
831 (expressing lacZ, n=10) and flapwing RNAi wing discs (n=9). (G) Analysis of adherens junction  
832 tension by laser ablation in control (expressing lacZ, grey) and flapwing RNAi discs (magenta)  
833 co-expressing E-Cadherin-GFP. Curves of vertex displacement following laser ablation.  
834 Number of junctions analysed: 14 and 16 in control and flapwing RNAi respectively. Related  
835 to Fig.2E.

836 Transgenes are driven in the wing pouch using the *rotund::Gal4* driver at 25°C, apart from  
837 experiments with the AJ-GFP trap which were conducted at 22°C. Scale bars: 10µm, except  
838 50µm for panels A, D. Apical-basal (A-B) is indicated for each close up illustrating an epithelial  
839 tissue. In box plots, the black bar indicates the median, the whiskers indicate the maximal  
840 range, and each value is indicated by a dot. Statistical tests: T-test in F, G. p-value: \*, <0.05;  
841 \*\*, <0.01; ns, non-significant).

842



Supplementary Fig. 4

843

844

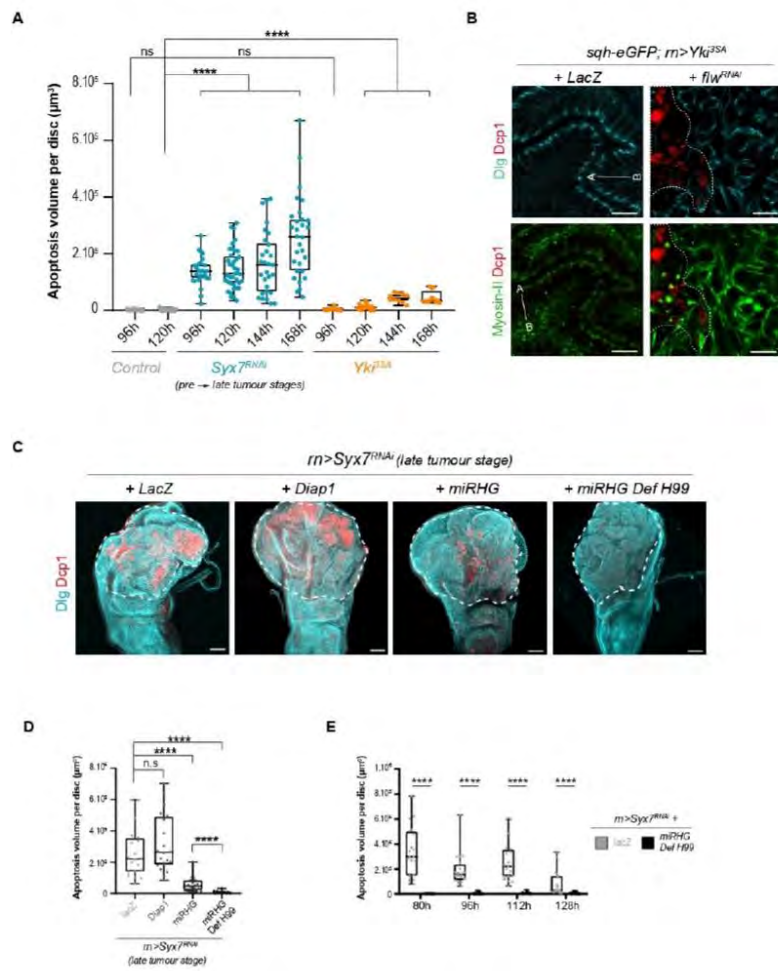
845 **Supplementary Figure 4. Hyperplasia-to-dysplasia transition caused by increased**  
846 **adherens junction tension in Yorkie tumours**

847 (A) Close up views of the organisation of Yorkie tumours either control (*lacZ*, top) or in which  
848 myosin II levels were increased due to flapwing RNAi expression (bottom). Myosin II (green)  
849 levels are increased in mesenchymal cells (bottom), compared to control epithelial cells (top),  
850 and reorganize discontinuously around the cell cortex. Nuclei are labelled in blue (DAPI  
851 staining), F-actin in red and tight junctions in cyan (Dlg). Number of discs analysed: *lacZ*, 3;  
852 flapwing RNAi, 6. (B) Close up views of the organisation of Yorkie tumours without (alpha-  
853 Catenin-RFP expression, top) or with myosin II increase at adherens junction due to the  
854 expression of the AJ-GFP trap (bottom). Nuclei are labelled in blue (DAPI staining), adherens  
855 junctions in red (alpha-Catenin-RFP), tight junctions in cyan (Dlg) and endogenous myosin II-  
856 GFP in green. Number of discs analysed: alpha-CatRFP, 30; AJ-GFP-Trap, 17.

857 Transgenes are driven in the wing pouch using the *rotund::Gal4* driver at 25°C for flapwing  
858 RNAi (B) or 22°C for AJ-GFP trap experiments. Scale bars: 10µm. Apical-basal (A-B) is  
859 indicated for each close up illustrating an epithelial tissue.

860





Supplementary Fig. 5

861

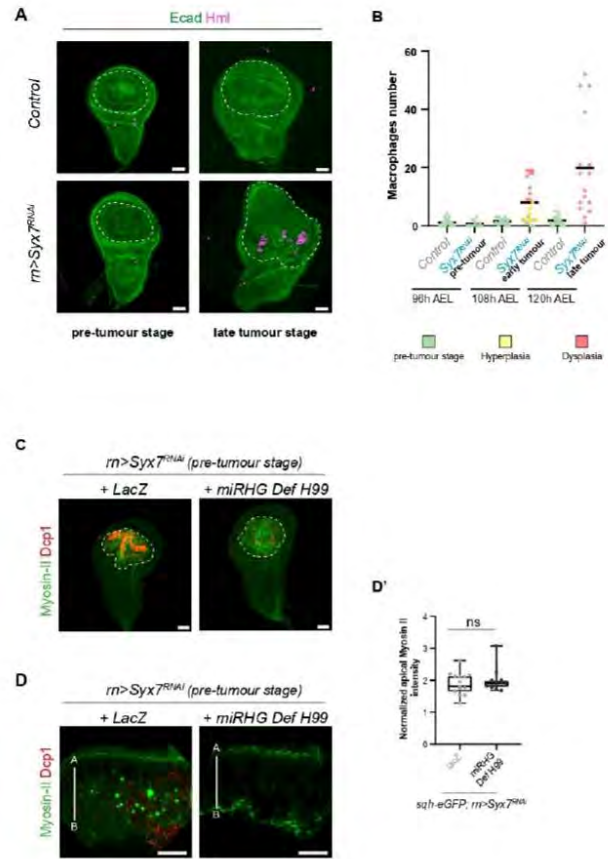
862

863 **Supplementary Figure 5. Characterisation and manipulation of apoptosis in fly tumours**

864 (A) Quantification of apoptosis in wing discs in control (grey), Syx7 RNAi (blue) and Yorkie  
865 overexpression (orange) conditions at the indicated timepoints (+/- 1.5h AEL). Number of discs  
866 analysed: 26 and 38 in control discs at 96h and 120h AEL respectively; 26, 39, 29 and 30 at  
867 96h, 120h, 144h and 168h AEL respectively in Syx7 RNAi, and 11, 18, 10 and 12 at 96h, 120h,  
868 144h and 168h AEL respectively in Yorkie tumours. Experiments were conducted at 25°C. (B)  
869 Close up views showing myosin II (green), Dlg (cyan) and active caspase DCP-1 (red) in Yorkie  
870 tumours either expressing lacZ (control, left, n=14) or *flapwing* RNAi to increase myosin II  
871 levels (right, n=16). Note that mesenchymal cells were in close vicinity of apoptotic domain  
872 following myosin II increase. (C) General views (projections) of Syx7 RNAi tumours  
873 coexpressing lacZ (control, n=20), Diap1 (n=20), miRHG alone (n=20) or miRHG in a  
874 heterozygous background for the H99 deficiency (miRHG Def H99, n=20) at the late stage  
875 (112h AEL at 30°C). Tumour shape is visualized using Dlg (cyan), while apoptosis is revealed  
876 using anti-active Dcp-1 caspase staining (red). Syx7 RNAi tumours have a similar size and  
877 shape, irrespective of apoptosis inhibition efficiency. The pouch domain is indicated by a  
878 dashed line. Scale bar: 50µm. (D) Quantification of apoptosis at the late tumour stage (112h  
879 AEL at 30°C) for the indicated genotypes. Apoptosis is not affected by Diap1 overexpression,  
880 reduced but not abolished by miRHG expression, and very low in miRHG Def H99. (E)  
881 Quantification of apoptosis in Syx7 RNAi tumours with (lacZ, in grey) or without apoptosis  
882 (miRHG Def H99, black) at the indicated timepoints at 30°C. Note that apoptosis is always  
883 efficiently abolished in Syx7 RNAi miRHG Def H99 tumours, irrespective of the timepoint  
884 analysed. Number of discs analysed are respectively 20, 20, 20 and 19 at 80h, 96h, 112h and  
885 128h AEL in controls and 14, 20, 20 and 22 in miRHG Def H99.

886 In box plots, the black bar indicates the median, the whiskers indicate the maximal range, and  
887 each value is indicated by a dot. Statistical tests: Mann-Whitney in A, D, E. p-value: \*, <0.05;  
888 \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001; \*\*\*\*, <0.0001; ns, non-significant). All statistical tests were performed by  
889 comparison with the control at 120h AEL in (A), and between the control and miRHG Def H99  
890 at each indicated timepoint in (E).

891



Supplementary Fig. 6

892

893

894 **Supplementary Figure 6. Apoptosis does not promote dysplasia formation through**  
895 **macrophage recruitment or increase in tissue tension**

896 (A, B) Analysis of macrophages (hemocytes) recruitment in Syx7 RNAi tumours. In (A), top  
897 and bottom rows show projection views of control and Syx7 RNAi discs respectively. Syx7  
898 RNAi discs are at the pre-tumour stage (96h AEL, left) or late tumour stage (120h AEL, right).  
899 ECad (green) labels the discs. Macrophages, labelled with Hml::QF2, QUAS::mCherry  
900 transgenes, are shown in magenta. (B) Quantifications of the number of macrophages in the  
901 contexts shown in (A). Each dot represents the number of macrophages in one individual disc,  
902 and is colour-coded depending on the stage of the disc determined based on ECad staining  
903 (size of the wing pouch and epithelial vs mesenchymal state of the cells). Note that  
904 macrophages are recruited once tumours have turned dysplastic (red dots at 108 and 120h),  
905 but not before the hyperplastic-to-dysplastic switch (green and yellow dots at 96 and 108h).  
906 Number of discs analysed in control and Syx7 RNAi discs respectively: 20 and 11 at 96h, 19  
907 and 23 at 108h and 18 and 16 at 120h. (C, D) General views (projections, C) and close up  
908 views (single plane, D) of Syx7 RNAi tumours with (*lacZ*, left) or without apoptosis (*miRHG Def*  
909 *H99*, right) at a similar age which corresponds to the pre-tumour stage in controls (80h AEL at  
910 30°C). Myosin II (green) accumulates similarly in presence or absence of apoptosis (red) in  
911 early Syx7 RNAi discs, apart from apoptotic fragments (bright dots in D). (D') Quantification of  
912 myosin II levels at adherens junctions in Syx7 RNAi tumours with (*lacZ*, grey, n=15) or without  
913 (*miRHG H99*, black, n=13) apoptosis.

914 Transgenes are driven in the wing pouch using the *rotund::Gal4* driver at °C in (A, B), or at  
915 30°C in (C-D'). The pouch is indicated by a dashed line in C. Apical-basal (A-B) is indicated for  
916 each close up illustrating an epithelial tissue. Scale bars: 10µm in D and 50µm in A and C. In  
917 box plots, the black bar indicates the median, the whiskers indicate the maximal range, and  
918 each value is indicated by a dot. Statistical tests: Mann-Whitney in D'. ns, non-significant.

919

920

921





## Getting started for migration: A focus on EMT cellular dynamics and mechanics in developmental models

Meritxell Font-Noguera<sup>1</sup>, Marianne Montemurro<sup>1</sup>, Corinne Benassayag<sup>1</sup>, Bruno Monier<sup>1</sup>, Magali Suzanne

Molecular, Cellular and Developmental Biology Department (MCD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), University of Toulouse, CNRS, UPS, 31062 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

EMT  
Cell adhesion  
Cell polarity  
Mechanical forces  
Cell protrusions  
Development  
Cytoskeleton  
Cell dynamics

### ABSTRACT

The conversion of epithelial cells into mesenchymal ones, through a process known as epithelial-mesenchymal transition (or EMT) is a reversible process involved in critical steps of animal development as early as gastrulation and throughout organogenesis. In pathological conditions such as aggressive cancers, EMT is often associated with increased drug resistance, motility and invasiveness. The characterisation of the upstream signals and main decision takers, such as the EMT-transcription factors, has led to the identification of a core molecular machinery controlling the specification towards EMT. However, the cellular execution steps of this fundamental shift are poorly described, especially in cancerous cells. Here we review our current knowledge regarding the stepwise nature of EMT in model organisms as diverse as sea urchin, *Drosophila*, zebrafish, mouse or chicken. We focus on the cellular dynamics and mechanics of the transitional stages by which epithelial cells progressively become mesenchymal and leave the epithelium. We gather the currently available pieces of the puzzle, including the overlooked property of EMT cells to produce mechanical forces along their apico-basal axis before detaching from their neighbours. We discuss the interplay between EMT and the surrounding tissue. Finally, we propose a conceptual framework of EMT cell dynamics from the very first hint of epithelial cell reorganisation to the successful exit from the epithelial sheet.

### 1. Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an important cellular process, corresponding to the progressive transformation of one or more cohesive epithelial cells integrated in an epithelial layer into mesenchymal ones. EMT is characterised by extracellular matrix remodelling, a shift in cell polarity, the remodelling of adhesion and cytoskeleton components and finally, most of the time, the acquisition of cell motility (Yang et al., 2020).

This transition was first described in the late 1970s during primitive streak formation in early chicken embryo, and was subsequently observed in a number of other developmental models ranging from sea urchin and *Drosophila* to vertebrates such as *Xenopus*, zebrafish and mouse, each one bringing a specific set of information. Developmental genetic studies in *Drosophila* led to the identification of master EMT

regulators, such as Snail and Twist (Leptin, 1991), which orchestrate mesoderm invagination during gastrulation. Related transcription factors were then identified in chordates revealing the high degree of conservation of EMT regulation and underlying the relevance of studying EMT in model organisms. EMT-transcription factors, including Twist, Snail and Zeb families, regulate the expression of one another and, in different combinations, induce the expression of target genes associated with the mesenchymal state and repress genes associated with the epithelial state (Yang et al., 2020; Nieto et al., 2016; Chang et al., 2016).

In addition to its multiple functions during development, EMT participates in wound healing and tissue regeneration. Furthermore, accumulating evidence suggests that the progression of most carcinomas is associated with EMT, through the ability of epithelial tumour cells to escape from primary tumours, invade new tissues and organs and form

**Abbreviations:** BM, Basement Membrane; EMT, Epithelia-Mesenchymal Transition; MCC, Multiciliated Cells; MET, Mesenchymal to Epithelial Transition; MMPs, Matrix Metalloproteinases; Myosin II, Non-muscle Myosin II; MT, Microtubules; NC, Neural Crest; NCCs, Neural Crest Cells; PMCs, Primary mesenchyme cells; PS, Primitive Streak; SMCs, Secondary mesenchyme cells.

\* Corresponding author.

E-mail address: [magali.suzanne@univ-tlse3.fr](mailto:magali.suzanne@univ-tlse3.fr) (M. Suzanne).

<sup>1</sup> These authors participated equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203717>

Received 16 March 2021; Received in revised form 11 June 2021; Accepted 28 June 2021

Available online 7 July 2021

2667-2901/© 2021 Published by Elsevier B.V. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).



**Box 1**

Overview of the main developmental models where EMT cellular dynamics and mechanics have been characterised.

**Gastrulation in sea urchin**

EMT is involved twice during the invagination processes associated with sea urchin gastrulation. First the primary mesenchyme cells (PMCs), which are distributed in a circle around the most vegetal part of the blastula, start to ingress. This coincides with the first sign of curvature of the vegetal plate. Then, a second round of EMT takes place when secondary mesenchyme cells (SMCs) ingress at the tip of the archenteron (Fig. 1A) (Hardin, 1996).

**Mesoderm invagination in *Drosophila***

*Drosophila* mesoderm formation occurs through the invagination of the most ventral domain at the onset of gastrulation. It starts with the apical constriction of most ventral cells, followed by the internalisation of the whole ventral tissue. It transiently forms a tube of cells that eventually loses its epithelial characteristics to form an inner mesodermal mass (Fig. 1B) (Winklbauer and Müller, 2011).

**Primitive streak formation in chicken and mouse**

Primitive streak (PS) is a transient structure that marks the onset of gastrulation in avian, reptilian and mammalian embryonic development. Cells from the epiblast migrate into the interior of the embryo via the PS and ingress using an EMT process, first sporadically, then collectively (Fig. 1C) (Serrano Nájera and Weijer, 2020).

**Neural crest cell delamination in chicken, zebrafish, mouse and *Xenopus***

Neural crest cells (NCCs) are multipotent cells emerging during neurulation at the lateral borders of the neural plate. NCCs subsequently detach from the dorsal neuroepithelium by an EMT process, migrate to populate a wide variety of tissues and participate in the formation of various structures, such as cranio-facial bones and cartilage and peripheral nervous system (Fig. 1D) (Milmoe and Tucker, 2021; Le Douarin et al., 2004). Although the process of NCC delamination varies depending on the species considered, NCC origin (cephalic versus trunk) and the type of migration (single in chicken, collective in zebrafish), a common cellular pathway and similar molecular actors can be found in each case (Piacentino et al., 2020).

**Gastrulation in *Xenopus***

Gastrulation in *Xenopus* starts with the formation of the blastopore. The first morphological change corresponds to the formation of bottle cells, a group of cells that constrict their apex and elongate apico-basally. This is followed by the invagination of the blastopore and the formation of the mesoderm layer (Winklbauer, 2020).

**Cardiac development in zebrafish**

The zebrafish heart is a two-chamber contractile organ. The embryonic heart is initially composed of an inner endothelial cohesive monolayer, in contact with the blood, and an outer compact cardiomyocyte monolayer, separated by a layer of extracellular matrix called cardiac jelly. A phenomenon known as trabeculation enlarges the ventricle wall through EMT-like events in zebrafish (but not in avian or mammals) (Fig. 1E) (Staudt and Stainier, 2012).

metastasis (Yang and Weinberg, 2008; Dongre and Weinberg, 2019). Although EMT has been extensively studied over the past 50 years, the scientific community focused mainly on the identification of epithelial and mesenchymal markers and viewed EMT mainly as an ON/OFF switch between two cellular states. However, the full complexity of this process is more and more recognised with growing evidence of the existence of a diversity of partial EMT states (Yang et al., 2020; Nieto et al., 2016). It therefore becomes important to consider the stepwise aspect of the transition between epithelial and mesenchymal states per se in both developmental and pathological contexts.

Here, we bring together and summarise data obtained over a long period of time in developmental contexts. We focus on cellular stepwise dynamics and mechanics of the understated EMT execution stage, and chose not to mention the subsequent stage of mesenchymal cell migration that has been extensively reviewed (Szabó and Mayor, 2019). An overview of the models and terms used to describe EMT execution is provided in Boxes 1 and 2. We next gather evidence pointing at the emerging interplay between EMT cell dynamics and tissue properties or

behaviour. Finally, we combine the fragmented information characterised in different model systems into a potential framework for the sequence of events taking place during execution of the EMT process.

**2. Getting ready to leave the epithelium: on the starting blocks**

Once cells have taken the decision to perform EMT, they need to prepare their exit acutely in order to maintain epithelial tissue integrity. The very first steps in this process do not interfere with epithelial cell characteristics but rather prepare cells for the subsequent events. These first steps include basement membrane remodelling, apical surface reduction and, at least in some contexts, nucleus relocation.

**2.1. Basement membrane breakdown**

The basement membrane (BM) is usually subjected to important remodelling when cells ingress or delaminate. This constitutes an early EMT event and, in some cases, the first recognisable event of the process



**Box 2**

## Some definitions.

Below, we provide some definitions that have been used for decades in the developmental EMT field. If some terms initially had discrete meanings (see below) that we tried to respect, it is important to note that terms such as “**ingression**”, “**delamination**” and “**extrusion**” may currently be used as synonyms to refer to the transitional phase of EMT during which a given cell exits the epithelium.

**Ingression** initially referred to the process by which individual cells move from the surface layer into the interior of the embryo, becoming mesenchymal and migrating individually. “Ingression” was used for example to describe internalisation of sea urchin PMCs and SMCs or of avian epiblast cells going through the primitive streak to form endodermal and mesodermal derivatives (Gilbert, 2003).

**Delamination** was initially considered similar to ingression on a cellular basis, although the output is slightly different as cells transiently accumulate under the epithelium of origin before moving away or reorganising. Examples of delamination include vertebrate neural crest cells, zebrafish cardiac cells or fly neuroblasts, which individually exit the primary epithelium but transiently accumulate below it (Gilbert, 2003). NCC delamination may also be referred to as emigration or segregation from the neural tube.

**Extrusion** is the process by which epithelia exclude unwanted cells to maintain tissue homeostasis. Initially associated with apoptotic cell death (Rosenblatt et al., 2001), some studies now refer to the extrusion of live cells.

**De-epithelialisation** corresponds to the loss of main epithelial characteristics, principally loss of tight and adherens junctions and the associated apical domain. This could coincide with a loss of cohesion between neighbours, but it does not imply cell movement (Shook and Keller, 2003).

**Epithelial cell characteristics:** Epithelial cells form cohesive sheets. They have different types of cell-cell contacts including tight junctions and adherens junctions. Adherens junctions are composed of Cadherins, which are transmembrane proteins forming homodimers with Cadherins of adjacent cells, and cytosolic Catenins, which link adherens junctions to the actin cytoskeleton. Tight junctions (septate junctions in invertebrates) are responsible of the barrier function of epithelia, preventing the diffusion of molecules. Epithelial cells are highly polarised with several membrane domains along their apico-basal axis. Indeed, the apical membrane faces the external or luminal environment, while the basal membrane sits on the basement membrane of the extracellular matrix. This supportive matrix is composed of networks of Collagen IV and Laminin fibrils, together with linker proteins. Epithelial cells adhere to the basement membrane through focal adhesion complexes, which include Integrins. At the level of the apical membrane, the antagonistic activity of polarity complexes Crumbs/Par3/Par6/aPKC and Scribble/Disc Large/Lgl finely positions adherens junctions (Yang et al., 2020).

**Mesenchymal cell characteristics:** If epithelial characteristics are well defined, mesenchymal cell properties and markers are less clear. Some migratory mesenchymal cells may adopt a front-rear polarity and protrusions, yet not all mesenchymal cells migrate. Likewise, some mesenchymal cells may turn on markers such as N-Cadherin or the intermediate filament protein Vimentin, although this is not an absolute rule (Yang et al., 2020). For instance, EMT occurs in flies, despite the absence of cytosolic intermediate filaments in this species.

as observed during mouse or chicken primitive streak (PS) formation (Fig. 1C). Indeed, basement membrane disruption, possibly driven by matrix metalloproteinases (MMPs) (Mogi and Toyozumi, 2010), occurs while PS cells are still integrated in the epithelium and preserve both their apico-basal polarity and their adherens junctions (Nakaya et al., 2008; Williams et al., 2012). Interestingly, basal microtubule (MT) dynamics contribute to BM disruption in chickens. MTs are anchored basally in epithelial cells through CLASP proteins, MT plus-end tracking proteins, and Dystroglycan, a transmembrane protein, which links extracellular matrix to the cytoskeleton (Nakaya et al., 2013). During EMT, basal MTs are destabilised and this appears to be a prerequisite for BM disruption. This destabilisation relies on GTPase RhoA downregulation. RhoA reduction leads to premature MT destabilisation and premature BM breakdown, while RhoA increase coincides with the maintenance of basal MTs and BM (Nakaya et al., 2006). Thus, both basal MT destabilisation mediated by RhoA downregulation as well as CLASP and Dystroglycan dissociation from the basal cortex contribute to BM breakdown during chick gastrulation EMT.

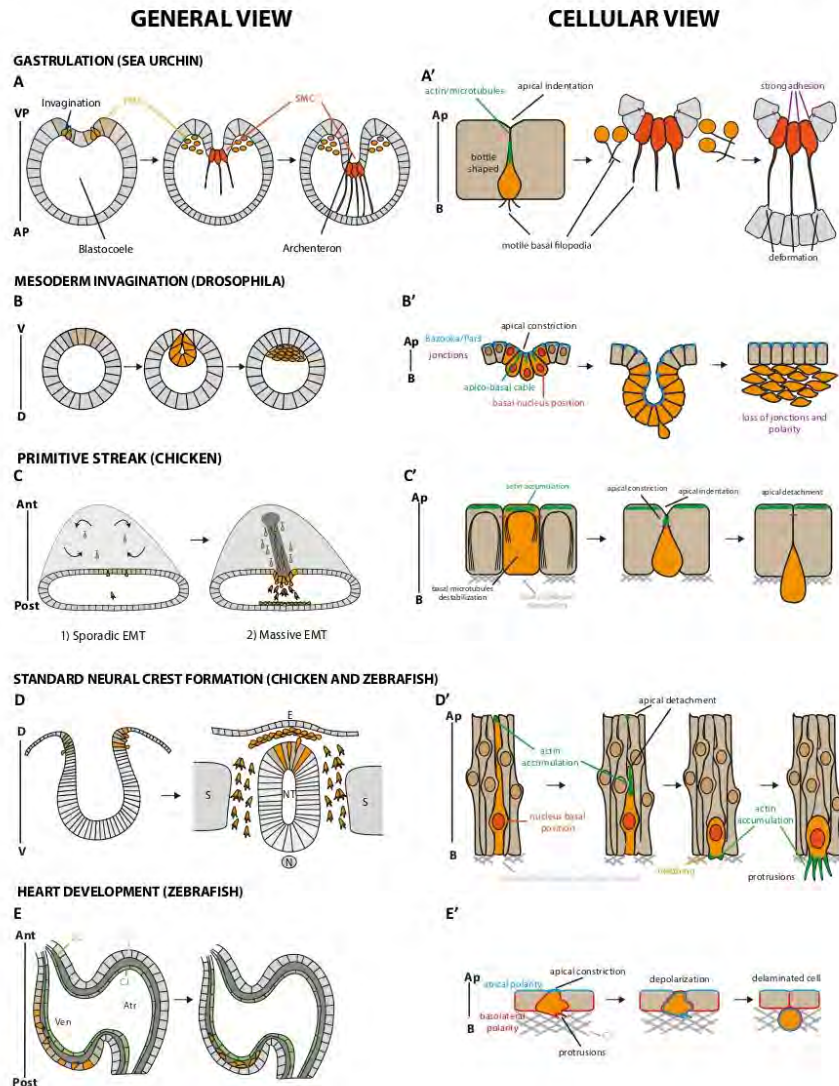
Extracellular matrix degradation has also been observed in other EMT contexts such as neural crest cell (NCC) delamination for example, where BM remodelling is a precocious process of de-epithelialisation (Fig. 1D') (Paik and Gumbiner, 2012). BM dismantling, as seen by Fibronectin and Laminin degradation, precedes NCC delamination and occurs prior to adhesion downregulation (Schiffmacher et al., 2018). BM dismantling is mediated by enzymes such as MMPs from the ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) family (Garmon et al., 2018; Alfandari et al., 2001). Concomitantly, the post-translational downregulation of adhesion junctions reinforces BM dismantling. Indeed, Cadherin-6B (Cad6B) proteolytic products induce a localised increase in MMP2 activity and further degradation of BM components, thus coupling the

dismantling of apical adherens junctions with that of the BM (Schiffmacher et al., 2018). Interestingly, ectopic expression of Cad6B proteolytic products induces precocious NCC delamination, suggesting that BM dismantling may be sufficient to trigger delamination in chicken.

BM breakdown thus represents an important feature of EMT both in the PS and NCCs. However, differences exist in other systems. Indeed, in *Drosophila*, basal extracellular matrix has not yet been deposited when mesoderm and neuroblasts delaminate, precluding the need for remodelling mechanisms. In sea urchins, PMCs do not possess a basal lamina but attach directly to the blastocoelic extracellular matrix (Cherrier et al., 1992) and change their adherence towards extracellular matrix substrates (showing more affinity for Fibronectin and less for Laminin in binding assays) (Hertzler and McClay, 1999). Altogether, the level of similarities between species regarding BM dynamics is still difficult to envision.

## 2.2. Apical surface reduction driven by apical constriction

To prepare their exit, the next step for cells starting the EMT process is to reduce their apical surface while maintaining their apical adhesion in order to maintain epithelium integrity. Consistently, apical constriction has been observed in most EMT models such as mesoderm invagination in *Drosophila*, bottle cells in the *Xenopus* blastopore lip, PS formation in mice and chickens, sea urchin PMCs and SMCs (Lim and Thiery, 2012) as well as EMT-like models such as neuroblast delamination in *Drosophila* and zebrafish heart development (An et al., 2017; Simoes et al., 2017; Staudt et al., 2014). Apical surface reduction generally coincides with the acquisition of an elongated apical neck and a basal cell body, leading to the characteristic “bottle cell shape” observed during the early stages of EMT (Winklbauer and Müller, 2011).



**Fig. 1.** EMT dynamics in developmental models. Dynamics of the Epithelial-Mesenchymal Transition process (EMT) at the tissue level (left) and cellular level (right) in the indicated model organisms (one per line). The domain that undergoes EMT is coloured in brown and delaminating cells in orange. Arrows in the primitive streak model represent Polonaise movements. VP, vegetal pole; AP, animal pole; PMC, primary mesenchyme cell; SMC, secondary mesenchyme cell; Ap, apical; B, basal; V, ventral; D, dorsal; Ant, anterior; Post, posterior; E, ectoderm; S, somite; NT, neural tube; N, notochord; Ven, ventricle; Atr, atrium; EC, endothelial cell; CM, cardiomyocyte; Cj, cardiac jelly. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Solursh and Revel, 1978; Amemiya, 1989; Ramkumar et al., 2016; Kam et al., 1991; Gelbart et al., 2012; Hashimoto and Nakatsuji, 1989).

Pioneering work on *Xenopus* bottle cells indicate that apical constriction is an intrinsic cell property, as shown by the apical surface reduction of bottle cells cultured ex vivo (Hardin and Keller, 1988). Electron micrograph observations revealed that bottle cells present a

fibrillar dense structure in their apex (Kumar et al., 2020), which corresponds to the actomyosin cytoskeleton (Lee and Hardland, 2007). Actomyosin is a contractile structure composed of actin filaments coupled to myofilaments of non-muscular Myosin II (hereafter called Myosin II for simplification) whose activity is phosphorylation-dependent (Lecuit et al., 2011). It turns out that actomyosin drives



apical constriction not only in *Xenopus* bottle cells but also in most if not all apical constriction models (Martin and Goldstein, 2014).

The mechanisms driving apical constriction have been particularly well characterised for *Drosophila* mesoderm gastrulation. In this context, pulsatile contractions of a medio-apical actomyosin meshwork depend on the small GTPase Rho1, which regulates both Myosin II contractility and F-actin assembly. The pulsatile activity of the network is ensured by positive and negative regulation of Rho1 by RhoGEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) and RhoGAP (GTPase Activating Protein) proteins (for review see (Ko and Martin, 2020)). Moreover, coordination between Myosin II stabilisation and actin filament polymerisation, involving the formin Diaphanous, is essential to stabilise cell shape during pulsing (Mason et al., 2013). For the contraction to be efficiently transduced in cell shape changes, medioapical actin filaments need to be anchored to apical junctions, favouring apical surface reduction after Myosin II activation. Thus, actin cross-linking plays a crucial role during the constriction process and some key molecular regulators of junctional F-actin anchoring such as  $\beta_H$ -Spectrin have recently been identified (Kueger et al., 2020).

In the mesoderm, apical constriction involves a series of contraction-stabilisation events leading to the stepwise reduction of apical surface in a "ratchet-like" fashion. Interestingly, apical constriction starts stochastically in about 40% of mesoderm cells before propagating to the other 60% (Kam et al., 1991; Sweeton et al., 1991). This stochastic phase creates a mechanical signal that can be mimicked either by mechanical deformation of the ventral domain using a needle or by stochastic apical constriction driven by magnetic nanoparticles (Mittossilis et al., 2017; Poutille and Farge, 2006). Thus, the first constricting cells mechanically stimulate their neighbours, leading to the propagation of the constriction wave to the whole mesoderm territory, the global accumulation of Myosin II and the invagination. These works nicely demonstrate the non-autonomous impact of apically constricting cells.

Both EMT transcription factors Snail and Twist have specific functions in the first stochastic phase and the second propagative phase respectively. They also have specific function at the cellular level in the contraction and stabilisation phases, respectively (Martin et al., 2009). They regulate actomyosin contractility through the activation of their downstream targets, such as *Mist* (a G Protein-Coupled Receptor or GPCR activated by Snail), *Folded gastrulation* and *T48* (respectively a GPCR ligand and a transmembrane protein activated by Twist) (Ko and Martin, 2020; Martin et al., 2009; Sawyer et al., 2010; Manning and Rogers, 2014). Nevertheless, these transcription factors may not be implicated in every EMT apical constriction event, given that *Snail* and *Twist RNAi*s do not affect apical surface reduction during neuroblast delamination (An et al., 2017; Simões et al., 2017). In this model, apical constriction also goes through pulses but using a slightly different strategy (An et al., 2017; Simões et al., 2017). Delaminating neuroblasts benefit from global junctional Myosin II polarity, with Myosin II being enriched at every adherens junction parallel to the dorsal-ventral (DV) axis. Neuroblast apical constriction is therefore anisotropic, initially driven by the contraction of DV junctions (Simões et al., 2017). This requires the presence of the junction-actin linker Canoe as well as Myosin II activity (Simões et al., 2017). Yet surprisingly, strong reduction of the Myosin II regulatory light chain (*spaghetti squash*) by 90% of its normal expression level strongly delays but does not abolish neuroblast apical constriction, suggesting the existence of additional mechanisms (Simões et al., 2017).

MT also play an essential role during apical constriction in some contexts. In *Xenopus* blastopore bottle cells, MT proved important for the transport of recycling vesicles which accumulate in the apical neck of the cells. Importantly, live imaging of wild type versus endocytosis-deficient bottle cells show that the constriction rate becomes slower in the absence of endocytosis in a second phase of apical constriction (Lee and Harland, 2010). These experiments strongly suggest a key role of endocytic vesicle transport along MT in removing the excess of membrane during EMT apical surface reduction (Lee and Harland, 2010). In

addition, MT can also play a role in apical surface reduction through the apical localisation of F-actin and phosphorylated Myosin II in these cells (Lee and Harland, 2007). During *Drosophila* mesoderm invagination, experiments that disrupted MT dynamics or organisation did not seem to affect apical constriction initiation, although they appeared necessary to maintain actomyosin anchoring to adherens junctions during tissue invagination (Ko et al., 2019).

Thus, apical constriction is a dynamic process involving a range of actors that have been well characterised in different EMT contexts. It thus constitutes an important common early step of EMT (see Fig 1 A', B', C', E'), sometimes involving MT and vesicular trafficking, and always relying on actomyosin dynamics, even if the dynamics, behaviour and subcellular distribution of this particular machinery varies depending on the system studied.

### 2.3. Nuclear repositioning

Another intriguing observation, made in some EMT contexts, is the early relocation of the nucleus in a more basal position. Pioneering work on cell shape analysis during *Drosophila* gastrulation shows that mesoderm nuclei, initially apical before ventral furrow formation, undergo a basal relocation when invagination begins (Kanai et al., 1991). Further analysis of apical constriction rate and nucleus velocity have shown that both phenomena are strongly correlated and that the volume above the nucleus is largely unchanged during nucleus relocation. These observations, together with computational modelling, suggest that the cytoplasm acts as an incompressible fluid which moves basally while apical constriction proceeds and pushes the nucleus to the basal side of the cell, conserving the volume above nucleus and triggering cell lengthening (Gelbart et al., 2012). It suggests that apical constriction drives nuclear relocation in the *Drosophila* mesoderm, showing that nuclear basal location is an early event in the ingressing process.

Similarly, in avians, nucleus basal relocation appears to precede NCC ingression. In this model however, it appears to be linked to the interkinetic movement of the nucleus during the cell cycle. In the trunk, NCC delamination is facilitated by the passage into S-phase (Bustyn-Cohen and Kalcheim, 2002), the phase of the cell cycle in which nuclei are located on the basal side of the pseudoepithelium. This is supported by the observation, using live imaging, that 90% of delaminating NCCs have their nuclei located basally within the hour preceding their exit from the neural tube (Ahlstrom and Erickson, 2009). In addition, a connection has been established between cell-cell adhesion and cell cycle regulation. Indeed, the expression of Cyclin-D1, which is essential for the G1/S transition of the cell cycle, is regulated on the one hand by Adam10-dependent degradation of N-Cadherin (N-Cad) (Shoval et al., 2007) and on the other hand by the proteolysis cleavage products of Cad6B, which are translocated to the nucleus with  $\beta$ -Catenin (Schiffmacher et al., 2016). Interestingly, a link between cell cycle regulation and nuclear positioning may also exist in other EMT contexts such as *Xenopus* bottle cell formation which depends on cell cycle arrest (Kurth, 2005).

Thus, depending on the context, nuclear positioning would depend on apical constriction or cell cycle regulation in cells initiating EMT (Fig. 1B', D').

### 3. To shift or not to shift cell polarity before leaving? That is the question

Another important cellular aspect of the transition to migrating mesenchymal cells is the loss of apico-basal polarity. Indeed, cell polarity is usually considered to be reset during EMT in order to provide a new front-rear polarity associated with mesenchymal cell migration.

Recent evidence pinpoints the importance of apico-basal polarity in maintaining the epithelial phenotype (Jung et al., 2019). In a surprising experiment, the key EMT-transcription factor SNA11, while sufficient to trigger EMT of 2D cell cultures, proved unable to trigger EMT in 3D



cultures. This striking result was due to the instability of SNAI1 in 3D highly polarised cells following phosphorylation by aPKC. Breaking apico-basal polarity may therefore be a critical event to potentiate EMT execution once a cell has started to engage on this path. In addition, positive feedback loops might be at play to potentiate EMT efficiency as EMT transcription factors repress key polarity genes. Examples include repression of Crumbs (Crb) genes by Snail in MDCK cells, or by the GATA transcription factor Serpent during endoderm formation in *Drosophila* (Whiteman et al., 2008; Campbell et al., 2011).

While the importance of polarity regulation highlighted above comes from the study of cells in culture, knowledge of polarity dynamics has been gathered during studies of developmental EMT. In *Drosophila*, following apical constriction, cells from the mesoderm domain form an internal tube while mesectodermal cells at the border of the invaginating domain fuse to seal the ectoderm. Cells in the mesodermal tube concomitantly lose adhesion (E-Cadherin or E-Cad,  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin) and polarity (Baz/Par3) components in order to form a mesenchymal mass that subsequently resolves in a one-cell depth monolayer (Sun and Stathopoulos, 2018; Weng and Wieschaus, 2016). Altogether, during mesoderm formation, polarity is lost subsequently to apical constriction (Fig. 1B'). However, it is not clearly established whether this is strictly concomitant to or slightly precedes adhesion loss and disorganisation within the mesodermal tube. Characterising polarity dynamics at the single cell level in this model could help better understand the relationship between adhesion and polarity.

Time-lapse analyses of developing zebrafish hearts has provided more direct insight into polarity dynamics during an EMT-like process at the single cell level (Jiménez-Amilburu et al., 2016). Cardiomyocytes of the ventricular chamber are polarised with an apicobasal-like polarity: apical Zonula Occludens-1 (ZO-1) intercellular junctions also accumulate Crb (Jiménez-Amilburu and Stainier, 2019) and the apical surface is labeled by the Podocalyxin molecule, while the basal face sits on extracellular matrix (the cardiac jelly). Some cardiomyocytes engage an EMT-like process to thicken the ventricular cardiac wall, a process called trabeculation. They first constrict their apical surface, which is accompanied by the formation of protrusions on more basal regions (Staudt et al., 2014; Jiménez-Amilburu et al., 2016). Next, the apical marker Podocalyxin relocates all around the cell membrane, indicating that a loss of polarity occurs before the cell detaches. Consistent with previous analysis during mouse PS formation, where Crb2 loss of function impairs EMT cell detachment (Ranikumar et al., 2016), Crb2a appears necessary for EMT-like events during trabeculation (Jiménez-Amilburu and Stainier, 2019). Altogether, these studies show that polarity loss is not the first event of EMT in cardiac cells although it precedes the phases of detachment and exit from the cardiomyocyte monolayer (see Fig. 1E').

The shift between apico-basal and front-rear polarity has also been characterised in the mouse PS and shown to coincide with a reversal of intracellular organelles. Indeed, ingressing cells relocate their apical centrosome so that the nucleus/centrosome axis initially pointing to the amniotic cavity is globally reversed in mesenchymal cells to point towards the endodermal layer (Burute et al., 2017). A similar polarity reversal is observed in mammary gland 3D cell cultures in which EMT is triggered by TGF $\beta$ . By using cell culture assays, centrosome repositioning was shown to be dependent on MT dynamics, since their stabilisation through Stathmin knockdown or taxol treatment prevents centrosome polarity reversal. In addition, Par3b overexpression prevents centrosome repositioning, suggesting a role of Par3 in this polarity shift (Burute et al., 2017).

Counterexamples, in which polarity is not or only partially lost during EMT, also exist during development. For instance, a partial loss of apically polarised adherens junctions (Cad6B,  $\beta$ -Catenin), tight junctions (ZO-1) and polarity proteins (Par3, aPKC or Crb complex), which become more lateral prior to delamination, indicate that chicken NCCs remodel their apico-basal polarity, albeit not completely (Lee et al., 2013; Park and Gumbiner, 2010). Coherent with a partial loss of polarity, live imaging shows that centrosome apical positioning is

maintained even after apical detachment in NCCs (Ahlgren and Erickson, 2009), in contrast to the situation in mouse PS cells (Burute et al., 2017). In a similar way, fly neuroblasts do not lose their apico-basal polarity while delaminating: Baz/Par3 and its partner Par6 remain segregated in the "trailing edge" originating from the apical region (Schober et al., 1999; Petronczki and Knoblich, 2001). Thus, a complete shift of polarity does not seem to be a necessary step for delamination, although it could facilitate subsequent migration.

#### 4. Time to let go: cell detachment from the apical surface

At some point, cells undergoing EMT have to leave the epithelial sheet. To avoid altering the integrity of the epithelium, they have to finely regulate their adhesive properties. A key step in this adhesion loss is the down-regulation of Cadherins and in particular of the major component of the adherens junctions, E-Cad (Le Bras et al., 2012). For example, in mice, the apical polarity protein Crb2 promotes PS cell ingression by controlling E-Cad localisation and apical detachment during EMT (Ranikumar et al., 2016). We focused here on the model systems in which apical detachment has been thoroughly characterised at the cellular level, in particular NCCs delamination in chicken and mesoderm invagination in *Drosophila*.

##### 4.1. Segregation from the neighbouring neural cells: molecular understanding of adhesion regulation at the tissue level

In NCC EMT, cell-cell adhesion strength decreases through the regulation of Cadherin expression, either type I Cadherins such as N-Cad or E-Cad, or type II Cadherins such as Cad6 (Cad6B in chickens, Cad6 in zebrafish), Cadherin-7 and Cadherin-11 (Taneyhill and Schiffrmacher, 2017; Schiffrmacher et al., 2014; Coles et al., 2007). During neurulation, NCC progenitors which have partially lost E-Cad have first to be sorted and amassed through early Cad6B expression within the premigratory NCC population (Coles et al., 2007; Nakagawa and Takeichi, 1995; Dady and Duband, 2017). Since Cad6B preferentially forms homophilic interactions and does not form heterophilic interactions with N-Cad, its expression could help the initial segregation of the neural crest domain from the rest of the neural tube that is positive for N-Cad (Nakagawa and Takeichi, 1995; Dady and Duband, 2017; Nakagawa and Takeichi, 1998). Then, as EMT is initiated, Cad6B is rapidly down-regulated transcriptionally, within two hours, by transcription factor Snail2 (Taneyhill et al., 2007). Other studies suggest that, in addition to transcriptional regulation, the timing of NCC delamination is also defined by post-transcriptional regulation of Cad6B activity (Fauchild and Gammill, 2013). Cad6B repression (either transcriptionally or post-transcriptionally) has thus been proposed to be a major triggering event at the onset of EMT adhesion rupture.

##### 4.2. Cell adhesion and contractility: insights from single cell resolution in living tissues

Advances in imaging, from early electron micrographs to more recent microscopy of living cells, have allowed for improved characterisation of cell behaviors during NCCs delamination. These breakthroughs have been instrumental in characterising the dynamics of apical detachment of delaminating cells. Of note, before detaching NCCs become strongly elongated bottle-shaped cells with a tiny apex suggesting that apical constriction has taken place earlier.

Studies in either zebrafish cranial NCCs or chick trunk NCCs (from cultured trunk slices) have provided novel insight into EMT mechanisms (Ahlgren and Erickson, 2009; Clay and Halloran, 2014; Clay and Halloran, 2013). Using 4D confocal imaging in chickens, it has been shown that cell detachment and exit from the neural tube can occur either by a disruption of cell adhesion or by mechanical rupture of the cell body, leaving the apical domain behind with its intact adhesion complexes (Ahlgren and Erickson, 2009). This observation indicates that both cell



adhesion shift and cell traction forces could be involved in apical detachment. This work further shows that the downregulation of adherens junction components is not necessarily a prerequisite for delamination. Interestingly, apical abscission has also been well described in newborn neurons which detach from the apical lumen before migrating within the neural tube. This process looks similar to EMT since it requires adherens junction disassembly (N-Cad downregulation) and loss of apical complex proteins and might be regulated by transcription factors related to the Snail family (Das and Storey, 2014). Using live and super resolution imaging in chicken and mouse neural tubes, the authors found that actomyosin contraction and MT reorganisation are both required for apical abscission and subsequent detachment (Kasioulis et al., 2017). Indeed, they observed that, as newborn neurons delaminated, the actin cable constricted apically and the MT condensed, forming a tunnel that allowed the centrosome to move basally and the cell to detach (Kasioulis et al., 2017). Furthermore, centrosome disruption using CALI (chromophore-assisted light inactivation, a protein inactivation method mediated by light) decreased the incidence of delamination, suggesting that new MT generated by this organelle are required for apical detachment (Kasioulis et al., 2017).

In zebrafish, apical detachment depends on initial maintenance of apical adhesion component Cad6 during the initial steps of NCC EMT. Cad6 and the GTPase-activating protein Arhgap1 (a Rho GTPase inactivator) both regulate Rho localisation and activation to apical areas and are necessary for apical detachment (Clay and Halloran, 2014; Clay and Halloran, 2013). This suggests that apical actomyosin contractility may contribute to the traction force required for apical detachment (Clay and Halloran, 2014). Accordingly, inhibition of Rho, ROCK (Rho-associated protein kinase) or Myosin II disrupts apical detachment and NCC EMT (Clay and Halloran, 2013). Cad6 also regulates apical actomyosin contractility by promoting stable F-actin apical accumulation (Clay and Halloran, 2014). Similarly, in chicken NCCs, Cad6B dependent regulation of apical F-actin dynamics through LIMK1/Cofilin might also contribute to apical cytoskeleton remodelling (Park and Gumbiner, 2012). Altogether, these data obtained in chicken and zebrafish NCCs show that apical detachment, which is a crucial step required for EMT (Fig. 1D'), requires the collaboration between apical adhesion components and actomyosin contractility. They further suggest that apical actomyosin dependent contractility contributes to the generation of a traction force required for apical detachment.

#### 4.3. Protecting junction dismantling by forces

Interestingly, regulation of tension applied to adherens junctions can also modulate their disassembly. As mentioned above, fly mesoderm formation is coordinated by transcription factors Snail and Twist. Snail is a repressor of E-Cad in mammalian cells (Battle et al., 2000; Cano et al., 2000; Peinado et al., 2004), as well as in flies (Oda et al., 1998). However, E-Cad junctions persist until all mesodermal cells are internalised, indicating that a protective mechanism is at play at the post-translational level (Weng and Wieschaus, 2016; Oda et al., 1998). Interestingly, Myosin II-dependent tension applied to junctions was found to maintain their integrity. Indeed, *Myosin II* knockdown leads to precocious loss of E-Cad junctional localisation. Moreover, on dorsal regions of the fly embryo where junctional tension is low, ectopic expression of Snail triggers E-Cad loss from the apical domain. However, Snail no longer promotes dorsal E-Cad depletion when Myosin II activity is concomitantly increased (Weng and Wieschaus, 2016). Therefore, tension protects E-Cad junctions from precocious dismantling that would otherwise accelerate EMT and perturb invagination. The current challenge is now to understand how tension mediates this protective effect on junctions.

Altogether these observations reveal that if cell-cell adhesion dismantling is generally described as an essential step in EMT, questions remain as to how it is regulated and integrated with the other cellular events occurring throughout the process. First, since apical constriction

requires the coupling of actomyosin networks between adjacent cells through adherent complexes, adhesions have to be maintained while cells constrict their apex. Thus, cell adhesion reduction is tightly regulated in time, and does not occur during the very first steps of the EMT process. Furthermore, adhesion dismantling is not a mandatory feature of EMT, since some cells can detach apically through apical abscission (see Fig. 1D'). Therefore, E-Cad loss, seen as a mandatory step of EMT, may not be lost in some EMT cases. Supporting this, fly endodermal cells that undergo EMT under the GATA factor *Serpent*, keep spots of E-Cad that proved necessary for subsequent collective migration (Campbell and Casanova, 2015). Thus, cell-cell adhesion regulation during EMT appears more complex than previously anticipated and many successful strategies for apical detachment appear to be at play depending on the organisms considered.

#### 5. Pointing out: protrusion dynamics during EMT

Another important aspect in delaminating cell dynamics is the formation of cellular protrusions. These local extensions of cell membrane can be either blebs which correspond to round membrane protrusions, or long and thin filopodia, or else bulbous protruding domains known as lamellipodia/pseudopodia. These protrusions, for instance found in zebrafish cardiomyocytes or in sea urchin PMCs and SMCs (Staudt et al., 2014; Miller et al., 1995) are recognised by their shape, which usually specifies the type of actin network organisation at play, as detailed below. Here we focus on NCCs in which the role of different types of protrusions in the delamination process has been better characterised.

Blebs are often considered to be associated with apoptosis. However, blebs are also frequently observed during cell migration and cancer cell invasion (Fackler and Grosse, 2008). During NCC delamination, membrane blebbing occurs prior to the formation of other protrusion types (Ahlinstrom and Erickson, 2009; Berndt et al., 2008). In particular, live confocal imaging of zebrafish NCCs has revealed that after apical detachment, transient blebs are observed at the basal surface of NCCs. Several studies of bleb dynamics suggest that, while bleb extension does not require actin polymerisation, bleb retraction results from polymerisation of actin filaments beneath the bleb cortex and of subsequent cortex contraction (Fackler and Grosse, 2008; Charas and Paluch, 2008; Paluch and Raz, 2013). Accordingly, inhibition of Myosin II or ROCK perturbs NCC blebbing, reducing bleb dynamics and preventing bleb retraction (Berndt et al., 2008). This blebbing perturbation coincides with defects in delamination (Berndt et al., 2008), suggesting that blebbing might be a potential actomyosin based force helping NCC expulsion from the epithelial layer. However, inhibiting Myosin II contractility may affect other forces generated in NCCs, such as those exerted on apical detachment (Clay and Halloran, 2013).

Furthermore, membrane blebs have been shown to reduce cell-cell adhesion in cultured cells, suggesting that mechanical changes associated with bleb protrusions promote cell-cell detachment (Gonnemann et al., 2015). Consistently, intercellular blebbing has been observed in the neural tube and occurs as soon as loss of contact between NCCs is visible within the dorsal ectoderm (Berndt et al., 2008). This suggests that, on top of the basal blebbing described above, intercellular blebbing may help NCCs detach from their neighbours. In conclusion, blebbing is a prominent cell behaviour associated with the first steps of NCC EMT, with bleb dynamics relying on actomyosin contractility and potentially involved in the regulation of cell-cell adhesion and/or cell expulsion from the epithelial layer.

The blebbing stage is followed by the extension of lamellipodia and filopodia protrusions and the translocation of the cell body out of the neural tube (Clay and Halloran, 2014; Clay and Halloran, 2013; Berndt et al., 2008; Halloran and Berndt, 2003; Erickson and Perris, 1993; Savagner, 2010; Savagner, 2001; Thiery and Sleeman, 2006). Many studies demonstrate a role of lamellipodia in NCC migration. Although migration is out of the scope of this review which concerns mostly the pre-migratory stage, we find interesting to mention that the different



protrusions formed during NCC EMT have specific functions in either NCC delamination or migration. Thus, the formation of blebs appears specifically required for delamination while lamellipodia and filopodia play a specific role in migration. Reducing Rac1 and consequently reducing lamellipodia extensions affects NCCs migration while delamination still occurs. This indicates that these protrusive extensions are only required to generate a migratory force in NCCs. Conversely, activation of Rac1 in NCCs (via Rho downregulation) generates lamellipodia and cell movement (Shoval and Kalcheim, 2012). Consistently, in *Xenopus*, NCC mutants for Cad11 analysed by live imaging appear blocked in the blebbing stage, fail to form lamellipodia and lose migratory ability (Kashef et al., 2009). Finally, upon exit from the neuroepithelium, NCCs adopt a new front-rear polarity to leave the epithelium and migrate. Polarised RhoA activity, with no activity at the front and high activity at the back, determines NCC directional delamination and migration (Liu et al., 2017). The studies described above focused on single cell behaviour. However, NCCs can also present a supra-cellular organisation during collective migration in *Xenopus* (Shellard et al., 2018). Interestingly, this collective organisation has been observed at different levels including cell polarity, mechanical forces and flow generation.

Altogether, these studies reveal that different types of protrusions play specific functions during NCC delamination and subsequent migration (see Fig. 1D'). While the role of protrusions in cell migration is well characterised, the role of blebbing in early steps of cell ingression is less understood. It will be interesting in the future to determine if blebbing plays a role specifically in NCCs or whether it occurs in other EMT models and actively participates in the stepwise progression from the epithelial to mesenchymal state.

#### 6. Forcing the way out: apico-basal contractile activity of ingressing cells

Recently, an intriguing additional characteristic of EMT cells came into light: their property to generate forces in the depth of the epithelium, in other words to generate apico-basal forces. This has been characterised during the invagination of the *Drosophila* mesoderm, but observations in other model organisms suggest that it could be a more widespread property.

Apical constriction has long been considered as the driving force of *Drosophila* mesoderm invagination (Martin et al., 2009). Yet, inference force microscopy, an image analysis method that predicts forces based on cell shape, hinted at the possible presence of an additional component necessary for tissue invagination, and suggested the existence of an apico-basal force (Brodland et al., 2010). More recently, evidence for apico-basal pulling forces in cells starting the EMT process was provided (Gracia et al., 2019; John and Rauzi, 2021). This traction force is generated through the formation of transient apico-basal structures of Myosin II that extend from the apical surface to the middle of mesodermal cells (Gracia et al., 2019). Of note, this structure or "cable" does not appear synchronously in all mesodermal cells and is rather formed in cells that are more advanced in the apical constriction process. However, the number of cables formed during the invagination process suggests that every cell from the mesoderm territory end up forming an apico-basal cable at some point during invagination. Laser ablation experiments reveal that these structures are highly contractile and exert an apico-basal pulling force, thus creating an inward force all along the invagination process. In an inducible EMT system based on ectopic expression of Snail in small groups of cells in *Drosophila* imaginal discs, similar structures have been observed in ingressing cells at the end of their apical constriction. Interestingly, a deformation of the apical surface of the epithelium has been observed at the time of cable contraction, indicative here again of a pulling force exerted by EMT cells. A second study reported the presence of adhesion-like structures enriched in adherens junction components and Myosin II, a few micrometers below the canonical adherens junctions (John and Rauzi, 2021). Such structures, which are dependent on Snail activity, are associated with

increased lateral tension. Thus, the generation of an apico-basal force is a common feature of cells undergoing EMT in the mesoderm and in ectopically induced EMT in imaginal discs.

Could this apico-basal contractility be a more specific feature of EMT cells? A similar contractile, pulsatory behaviour had been previously observed by timelapse imaging in ingressing sea urchin PMCs that decreases when cells have left the epithelial sheet (Jännander and Gustafson, 1960). These results suggest that the pulsatile activity of PMCs could participate in cell exiting from the epithelium. It was further observed that PMCs, when adopting a bottle shape, accumulate F-actin in their narrow apical neck region, consistent with the contractile properties of these cells (Nakajima and Burke, 1996).

In vertebrates, cells undergoing EMT early during embryogenesis also appear to bear apico-basal contractile activity. In chicken, scattered cell ingressions have been observed 6 to 15h before PS formation. These sporadic ingressions are first visible by local deformation of the apical surface of the epiblast, which coincides with apically constricted cells surrounded by a rosette of neighbouring cells (Bancroft and Bellairs, 1974; Voiculescu et al., 2014). These deformations are reminiscent of those created by apico-basal forces associated with cell delamination in fly imaginal tissues (Gracia et al., 2019). Indeed, they are present before and during PS formation, and increase in width and depth with time (Voiculescu et al., 2014), suggesting an active pulling force generated by ingressing cells. Moreover, live imaging experiments in the mouse PS also suggest the existence of an apico-basal force in ingressing cells. Indeed, *Crb2*<sup>-/-</sup> PS mutant cells adopt a bottle shape, like their wild-type counterparts, but fail to undergo apical detachment. Interestingly, their basal body eventually moves back up more apically (at the time when wild-type cells detach), suggesting that the apical neck is contractile and that an apico-basal contractility of PS ingressing cells could participate in apical detachment (Ramkumar et al., 2016). This contractile activity is reminiscent of the apical detachment mechanism observed in NCCs, which includes actin apical accumulation and apical rupture (Ahlsrom and Erickson, 2009; Clay and Halloran, 2014).

Altogether, these data reveal the highly dynamic behaviour of cells undergoing EMT when leaving the epithelial sheet, and this appears to be conserved during evolution. It also strongly suggests that while such cells are still attached to their neighbours, they can exert pulling forces which may eventually mechanically impact their environment (see part 7).

#### 7. A dynamic dialog: interplay between EMT cells and the surrounding tissue

EMT is frequently associated with tissue shape remodelling. Indeed, in most of the EMT models described in this review, a strong spatio-temporal correlation between EMT and tissue invagination is observed, with EMT starting just prior to tissue remodelling. For example, the first signs of PMC ingression in the sea urchin precede the first signs of invagination, the same is true for chicken and mouse PS formation, mesoderm invagination in *Drosophila* and bottle cell invagination in *Xenopus*. EMT could also affect some aspects of cardiac morphogenesis since vertebrate heart looping has been proposed to be a consequence of asymmetric cell movements and forces caused by a differential left/right EMT pattern (Ocaña et al., 2017). This strongly suggests that the behaviour or properties of EMT cells can actively participate in the remodelling of the surrounding tissue.

During chicken gastrulation, the notion of a non-autonomous impact of EMT cells came from the observation that ingression rate increases in the proximity of the future PS territory, suggesting that cells that have already ingressed may favour ingression of their neighbours (Voiculescu et al., 2014). To test this, Voiculescu and colleagues grafted small groups of recently ingressed cells from the posterior early PS of quail embryos, under the epiblast of pre-PS stage chicken embryos. The grafted cells induced the expression of PS markers in the adjacent epiblast within 4 h and this was followed by massive ingression. After 14 h, a second host-



derived streak had developed at the graft site, where grafted cells had delaminated and migrated away. In control experiments, when a similar graft was made using cells that had ingressed long before, no such induction occurred. While in this tissue, the underlying mechanism remains unknown, this experiment clearly demonstrates the inductive capacity of recently ingressed cells.

The non-autonomous effect of EMT was also observed during sea urchin gastrulation. First, PMC bottle cells appear in a ring encircling the central cells from the vegetal pole. Interestingly, the deepest point of invagination of the future archenteron corresponds to the location of bottle cells and the ablation of a large portion of bottle cells delays invagination, while ablation of the neighbouring tissue does not affect invagination (Kimberly and Hardin, 1998). In a second step, SMCs ingress from the tip of the forming archenteron. SMCs form particularly long and very active filopodia (extending to more than 80  $\mu\text{m}$ ) (Miller et al., 1995), crossing the whole cavity of the embryo to contact the ectoderm at the animal pole (Fig. 1A') (Kinnander and Gustafson, 1960; Dan and Okazaki, 1956). The existence of pulling forces generated by SMC filopodia was unravelled by drug treatment that selectively detached filopodia from the ectoderm, and by laser ablation of filopodia. Both types of treatments impaired archenteron formation (Spiegel and Burger, 1982; Hardin, 1998). Altogether, these works constitute the proof of a direct impact of cells undergoing EMT on the invagination of neighbouring tissue, and support the idea that the impact could be mechanic.

More recently, mechanical impact of cells undergoing EMT on the surrounding tissue has been characterised during *Drosophila* mesoderm invagination (Gracia et al., 2019; John and Rauzi, 2021). As mentioned above, following apical constriction, mesoderm cells form an apico-basal structure of Myosin II and generate an inward traction force. Since these contractile structures are first visible at the onset of invagination, it was tempting to speculate that apico-basal forces could participate in invagination progression. Using laser ablation at the tissue scale, it was shown that apical constriction alone was not sufficient for tissue ingression and that absence of apico-basal traction prevented tissue invagination (Gracia et al., 2019). Accordingly, loss of lateral contractility achieved through local inhibition of Rho through optogenetics also impairs initiation of mesoderm invagination (John and Rauzi, 2021). Complementarily, ectopic EMT induced in a naive epithelial tissue was sufficient to induce ectopic tissue folding. Those results are supported by biophysical modelling that recapitulates individual cell behaviour in a virtual embryo (Gracia et al., 2019). In this theoretical model, the presence of an apico-basal traction force is a prerequisite for tissue invagination. Hence, combined in silico and experimental data strongly suggest that cells initiating their EMT process can mechanically contribute to tissue invagination (Gracia et al., 2019; John and Rauzi, 2021).

Altogether, these data highlight that ingressing cells, while initiating their progressive transformation from epithelial to mesenchymal, are able to communicate with their surroundings and influence them. Because EMT cells initially conserve strong cell-cell adhesion and can be highly contractile, they can exert a pulling force on the neighbouring tissue. It will be interesting in the future to test if mechanical communication is a general feature of EMT or if it is only at play in particular cellular or tissue contexts.

While above we consider how EMT cells can influence their neighbours, it is equally important to consider how the tissue environment, and in particular its mechanical properties, can also modulate various parameters of the EMT process. A first insight into the mechanical influence of surrounding tissues on cell ingression came from work in *Xenopus* in which bottle cell regions were isolated and cultured ex vivo on a non-adherent substratum (Hardin and Keller, 1988). Under these conditions, the normally highly anisotropic apical constriction became barely anisotropic, while the characteristic apico-basal elongation of bottle cells was lost, leading to relatively spherical cells. This indicates that apical cell neck elongation, now considered a characteristic of

ingressing cells, likely depends on mechanical and geometric properties of adjacent tissue. Tissue mechanics can also control EMT efficiency. In *Drosophila* embryos, the junctional tension imposed by neighbouring cells is important for neuroblast delamination kinetics (Simões et al., 2017). For instance, if junctions between a neuroblast and its non-ingressing neighbours are quickly released by laser ablation, neuroblast apical constriction speed increases. Therefore, neuroblast apical constriction is slowed down by the tension borne by the neighbours' junctions. In *Xenopus*, the onset of NCC delamination depends upon the compaction and consequently the stiffening of the underlying mesoderm (Bañiga et al., 2018). This change in mesoderm mechanical property might act in the neighbouring neural tissue as a temporal switch to trigger EMT, presumably because a stiff substrate leads to concomitant E-Cad reduction and N-Cad increase. Finally, tissue topography can also affect the rate of delamination in the zebrafish heart: proliferation-induced crowding causes more cardiomyocytes to delaminate and form the trabecular layer, while reducing proliferation limits delamination. In the latter case, creating heterogeneities in tissue tension through the generation of mosaic tissues with cells under more tension (e.g. through expression of a constitutive active Myosin II) rescues delamination defects (Priya et al., 2020). They also suggest that epithelial mechanical properties could play an important function, still mostly unknown, in the regulation of cell exit from epithelia, as shown in contexts of cell extrusion (Priya et al., 2020; Levayer et al., 2016; Eisenhoffer et al., 2012). Together, these reports demonstrate that mechanical constraints of the environment can influence multiple aspects of EMT, controlling 3D cell shape and ingression kinetics as well as the timing and number of EMT events.

## 8. Simply reversing EMT into MET?

As mentioned above, EMT is a reversible process, and mesenchymal cells can undergo mesenchymal-epithelial transition (MET) to acquire an epithelial state. This suggests that the cellular steps of EMT and MET could just mirror each other, for example the loss vs acquisition of cell polarity or loss vs creation of cellular junctions. However, the detailed chronological steps of MET remain largely unknown.

Interestingly, the study of radial intercalation of multiciliated cells (MCCs) in the *Xenopus* epidermis provides insights into some steps of the MET process, especially apical surface emergence, revealing that some key regulators are common between EMT and MET. The polarity Par complex is required for the apical localisation of centrioles in MCC cells. It also recruits CLAMP protein apically, which stabilises MT in the apical tip of intercalating cells, which could in turn provide structural rigidity (Werner et al., 2014). The number of apical centrioles can affect the timing of MCC apical insertion by promoting their protrusive behaviour (Collins et al., 2020). The Par complex could also help set up apical junctions. Indeed, in cell culture, components of adherens junctions ( $\alpha$ - or  $\beta$ -Catenin) are recruited to Nectin-based cell-cell adhesions through the Afadin protein (Tachibana et al., 2000). Interestingly, Nectin can bind to cell polarity proteins like Par3, linking adhesion formation to cell polarity establishment (Takekumi et al., 2003). This mirrors EMT in which adhesion loss is usually associated with polarity loss. After this first step of insertion, MCCs need to expand their apical surface. Laser ablation experiments have shown that the emergence on an apical surface in inserting MCCs is driven cell-autonomously by forces intrinsic to the inserting cell. In fact this pushing force is provided by 2D pressure in the apical surface and exerted by an apical actin network assembly (Sedzinski et al., 2016). At the molecular level, this MET step would slightly differ from EMT, as it would not rely on Myosin II activity.

Altogether, the cellular mechanisms occurring in epithelializing cells described above support the notion of mirrored steps between EMT and MET. Yet, given the complexity of both cellular processes, we can speculate that some specific mechanisms might differentiate them. In fact, the interaction between the cells engaged in EMT or MET and their environment could potentially be a big difference between both



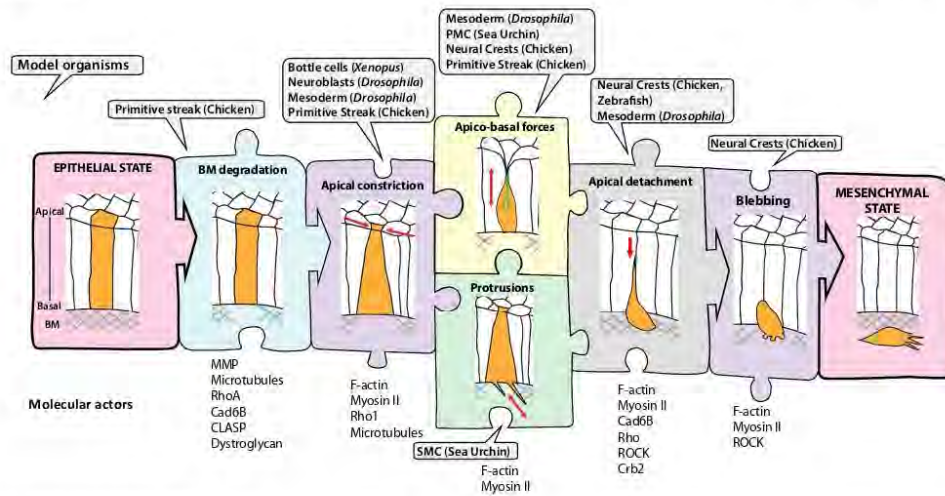


Fig. 2. A hypothetical model of EMT dynamics. The figure recapitulates the different EMT execution phases. For each step, species in which these have been observed are mentioned. BM: Basement Membrane.

processes. This differential cellular dialog with the environment in EMT and MET could give rise to some potential non-autonomous effects specific to each process, so the sequence of EMT dynamics might not be strictly reversible to describe MET dynamics.

## 9. Discussion

### 9.1. Organising fragmented information from multiple developmental contexts

Our vision of EMT has changed over the past decade. EMT is now described as a series of progressive changes rather than a binary switch between epithelial and mesenchymal states (Nieto et al., 2016). The progressive aspect of EMT is often defined by the existence of cells expressing different sets of epithelial and mesenchymal markers (Pastushenko et al., 2018), while the corresponding cellular sequence is poorly characterised. Focusing on EMT cellular dynamics in various developmental processes has been instrumental in deciphering the cellular modifications occurring in 3D, from the very first steps of the EMT process to successful cell ingression and exit from the epithelial layer of origin. The interaction of an ingressing cell with its surroundings, including the mechanical constraint due to the shape of the tissue and its environment, is only possible in integrated systems, reminding the importance of studying developmental EMT models. Although each developmental context has its own specificities (shape of the cells, structure of the epithelium, associated with tissue deformation or not, followed by migration or not), and although the pathways regulating the successive steps of EMT may vary from one to the other, here we recapitulated our current knowledge on EMT cellular dynamics and mechanics in order to propose a global and sequential view of the EMT process as a temporal puzzle (Fig. 2). Of note, we still do not know whether the successive steps described here are found in every single model or if only a subset corresponds to general features. This reveals however that on top of BM remodelling, apical constriction and cell detachment, that are frequently described, additional EMT cell characteristics have been observed in several contexts and have been often overlooked in others. In this view, the contractile activity of EMT cells way before their delamination from the epithelial sheet deserves to be highlighted.

### 9.2. Understanding developmental EMT dynamics to understand metastasis

Beyond development, EMT is also a process involved in the formation of tumour metastasis. Although in vitro studies have been important to identify molecular markers of EMT, they may have missed important players of the ingressing process since they could not recapitulate the stepwise progression of this process, in particular the interaction with the surrounding tissue while the cell exits the epithelial sheet. Analysing EMT dynamics and mechanics in developmental contexts has been instrumental in identifying important cellular aspect in a 3D natural environment and to consider cell behaviour diversity, including the contractile properties of ingressing cells or the complex temporal regulation of cell-cell adhesion.

Since mechanical constraint appears to play an important role in tumour development as suggested by the strong correlation observed between tumour aggressiveness and tumour stiffness (Levental et al., 2009), understanding how ingressing cells interact mechanically with their surroundings could give us important insights into EMT regulation and the formation of metastasis and may provide therapeutic new leads to prevent metastatic processes.

### CRedit authorship contribution statement

MFN, MM, CB, BM contributed equally to this work.  
MS supervised and drove the project.

### Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

### Acknowledgements

MS's lab is supported by grants from the European Research Council (ERC) under the European Union Horizon 2020 research and innovation program (grant number EAPAF: 648001), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, Plan cancer 2014-2019), and the association Toulouse Cancer Santé (TCS, ApoMacImaging: 171441). MFN has a PhD fellowship from the Fondation pour la Recherche



Médicale (FRM). MM has a PhD fellowship from the Ministry of Education and Research.

## References

- Ahlfors, J.D., Erickson, C.A., 2009. The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: a &apost;&apost; of multiple non-obligatory cellular mechanisms. *Development* 136, 1801–1812.
- Alfandari, D., et al., 2001. Xenopus ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr. Biol.* 11, 918–930.
- Amemiya, S., 1989. Electron microscopic studies on primary mesenchyme cell ingression and gastrulation in relation to vegetal pole cell behavior in sea urchin embryos. *Exp. Cell Res.* 183, 453–462.
- An, Y., et al., 2017. Apical constriction is driven by a pulsatile apical myosin network in delaminating. *Development* 144, 2153–2164.
- Bancroft, M., Bellairs, R., 1974. The onset of differentiation in the epiblast of the chick blastoderm (SEM and TEM). *Cell Tissue Res.* 155, 399–418.
- Barriga, E.H., Franze, K., Charras, G., Mayor, R., 2018. Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature* 554, 523–527.
- Battle, E., et al., 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89.
- Berndt, J.D., Clay, M.R., Langenberg, T., Halloran, M.C., 2008. Rho-kinase and myosin II affect dynamic neural crest cell behaviors during epithelial to mesenchymal transition in vivo. *Dev. Biol.* 324, 236–244.
- Brodlund, G.W., et al., 2010. Video force microscopy reveals the mechanics of ventral furrow invagination in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22111–22116.
- Burstein-Cohen, T., Kalchauer, C., 2002. Association between the cell cycle and neural crest delamination through specific regulation of G1/S transition. *Dev. Cell* 3, 383–395.
- Burute, M., et al., 2017. Polarity reversal by centrosome repositioning primes cell scattering during epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev. Cell* 40, 168–184.
- Campbell, K., Casanova, J., 2015. A role for E-cadherin in ensuring cohesive migration of a heterogeneous population of non-epithelial cells. *Nat. Commun.* 6, 7998.
- Campbell, K., Whitsell, G., Franch-Marro, X., Battle, E., Casanova, J., 2011. Specific GATA factors act as conserved inducers of an endodermal-EMT. *Dev. Cell* 21, 1051–1061.
- Cano, A., et al., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83.
- Chang, H., et al., 2016. Synergistic action of master transcription factors controls epithelial-to-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* 44, 2514–2527.
- Charras, G., Paluch, E., 2008. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 730–736.
- Cherr, G.N., Summers, R.G., Baldwin, J.D., Morrill, J.B., 1992. Preservation and visualization of the sea urchin embryo blastocoel extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech.* 22, 11–22.
- Clay, M.R., Halloran, M.C., 2013. Rho activation is apically restricted by Arhgap1 in neural crest cells and drives epithelial-to-mesenchymal transition. *Development* 140, 3198–3209.
- Clay, M.R., Halloran, M.C., 2014. Cadherin 6 promotes neural crest cell detachment via F-actin regulation and influences active Rho distribution during epithelial-to-mesenchymal transition. *Development* 141, 2506–2515.
- Coles, E.G., Taneyhill, L.A., Bronner-Fraser, M., 2007. A critical role for Cadherin6B in regulating avian neural crest emigration. *Dev. Biol.* 312, 533–544.
- Collins, C., Majekodunni, A., Mitchell, B., 2020. Centriole number and the accumulation of microtubules modulate the timing of apical insertion during radial intercalation. *Curr. Biol.* 30, 1958–1964 e1953.
- Dady, A., Duband, J.L., 2017. Cadherin interplay during neural crest segregation from the non-neural ectoderm and neural tube in the early chick embryo. *Dev. Dyn.* 246, 550–565.
- Dan, K., Okazaki, K., 1956. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab Woods Hole* 110, 29–42.
- Das, R.M., Storey, K.G., 2014. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science* 343, 200–204.
- Dongre, A., Weinberg, R.A., 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84.
- Eisenhoffer, G.T., et al., 2012. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* 484, 546–549.
- Erickson, C.A., Perris, R., 1993. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Dev. Biol.* 159, 60–74.
- Fackler, O.T., Grosse, R., 2008. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181, 879–884.
- Fairchild, C.L., Gammill, L.S., 2013. Tetraspanin18 is a FoxD3-responsive antagonist of cranial neural crest epithelial-to-mesenchymal transition that maintains cadherin-6B protein. *J. Cell Sci.* 126, 1464–1476.
- Garmon, T., Wittling, M., Nie, S., 2018. MMP14 regulates cranial neural crest epithelial-to-mesenchymal transition and migration. *Dev. Dyn.* 247, 1083–1092.
- Gelbart, M.A., et al., 2012. Volume conservation principle involved in cell lengthening and nucleus movement during tissue morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 19298–19303.
- Gilbert, S.F., 2003. In: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., pp. 221–262 chap. 8.
- Gonnermann, C., et al., 2015. Quantitating membrane bleb stiffness using AFM force spectroscopy and an optical sideview setup. *Integr. Biol. (Camb.)* 7, 356–363.
- Gracia, M., et al., 2019. Mechanical impact of epithelial-mesenchymal transition on epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 10, 2951.
- Halloran, M.C., Berndt, J.D., 2003. Current progress in neural crest cell motility and migration and future prospects for the zebrafish model system. *Dev. Dyn.* 228, 497–513.
- Hardin, J., 1988. The role of secondary mesenchyme cells during sea urchin gastrulation studied by laser ablation. *Development* 103, 317–324.
- Hardin, J., 1996. The cellular basis of sea urchin gastrulation. *Curr. Top Dev. Biol.* 33, 159–262.
- Hardin, J., Keller, R., 1988. The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 103, 211–230.
- Hashimoto, K., Nakatsuji, N., 1989. Formation of the primitive streak and mesoderm cells in mouse embryos -detailed scanning electron microscopical study. *Develop. Growth Differ.* 31, 209–218.
- Hertler, P.L., McClay, D.R., 1999. alpha5U2, an epithelial integrin that binds laminin in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 207, 1–13.
- Jiménez-Amilburu, V., et al., 2016. In vivo visualization of cardiomyocyte apicobasal polarity reveals epithelial to mesenchymal-like transition during cardiac trabeculation. *Cell Rep.* 17, 2687–2699.
- Jiménez-Amilburu, V., Stainier, D.Y.R., 2019. The transmembrane protein Crb2a regulates cardiomyocyte apicobasal polarity and adhesion in zebrafish. *Development* 146.
- John, A., Rauzi, M., 2021. A two-tier junctional mechanism drives simultaneous tissue folding and extension. *Dev. Cell* 56, 1469–1483 e1465.
- Jung, H.Y., et al., 2019. Apical-basal polarity inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis by PAR-complex-mediated SNAIL1 degradation. *Nat. Cell Biol.* 21, 359–371.
- Kam, Z., Minden, J.S., Agard, D.A., Sedat, J.W., Leptin, M., 1991. *Drosophila* gastrulation: analysis of cell shape changes in living embryos by three-dimensional fluorescence microscopy. *Development* 112, 365–370.
- Kashef, J., et al., 2009. Cadherin-11 regulates protrusive activity in *Xenopus* cranial neural crest cells upstream of Trio and the small GTPases. *Genes Dev.* 23, 1393–1398.
- Kasioulis, I., Das, R.M., Storey, K.G., 2017. Inter-dependent apical microtubule and actin dynamics orchestrate centrosome retention and neuronal delamination. *Elife* 6.
- Kimberly, E.L., Hardin, J., 1998. Bottle cells are required for the initiation of primary invagination in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 204, 235–250.
- Kinnander, H., Gustafson, T., 1960. Further studies on the cellular basis of gastrulation in the sea urchin larva. *Exp. Cell Res.* 19, 278–290.
- Ko, C.S., Martin, A.C., 2020. The cellular and molecular mechanisms that establish the mechanics of *Drosophila* gastrulation. *Curr. Top Dev. Biol.* 136, 141–165.
- Ko, C.S., Tserunyan, V., Martin, A.C., 2019. Microtubules promote intercellular contractile force transmission during tissue folding. *J. Cell Biol.* 218, 2726–2742.
- Krueger, D., Pallares Cartes, C., Makaske, T., S., 2020. De Renzis,  $\beta$ -spectrin is required for ratcheting apical pulsatile constrictions during tissue invagination. *EMBO Rep.* 21, e49858.
- Kumar, T., Pandey, R., Chauhan, N.S., 2020. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ : the curator of gut homeostasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00227>.
- Kurth, T., 2005. A cell cycle arrest is necessary for bottle cell formation in the early *Xenopus* gastrula: integrating cell shape change, local mitotic control and mesodermal patterning. *Mech. Dev.* 122, 1251–1265.
- Le Bras, G.F., Taubenslag, K.J., Andl, C.D., 2012. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell. Adh. Migr.* 6, 365–373.
- Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G., Dupin, E., 2004. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637–4650.
- Lecuit, T., Lenne, P.F., Munro, E., 2011. Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 157–184.
- Lee, J.Y., Harland, R.M., 2007. Actomyosin contractility and microtubules drive apical constriction in *Xenopus* bottle cells. *Dev. Biol.* 311, 40–52.
- Lee, J.Y., Harland, R.M., 2010. Endocytosis is required for efficient apical constriction during *Xenopus* gastrulation. *Curr. Biol.* 20, 253–258.
- Lee, R.T., et al., 2013. Cell delamination in the mesencephalic neural fold and its implication for the origin of ectomesenchyme. *Development* 140, 4890–4902.
- Leptin, M., 1991. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* 5, 1568–1576.
- Levayer, R., Dupont, C., Moreno, E., 2016. Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Curr. Biol.* 26, 670–677.
- Levental, K.R., et al., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.
- Lim, J., Thiery, J.P., 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 139, 3471–3486.
- Liu, J.A., et al., 2017. Asymmetric localization of DLG1 defines avian trunk neural crest polarity for directional delamination and migration. *Nat. Commun.* 8, 1185.
- Manning, A.J., Rogers, S.L., 2014. The Fog signaling pathway: insights into signaling in morphogenesis. *Dev. Biol.* 394, 6–14.
- Martin, A.C., Goldstein, B., 2014. Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development* 141, 1987–1998.
- Martin, A.C., Kaschube, M., Wieschaus, E.F., 2009. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* 457, 495–499.
- Mason, F.M., Tworoger, M., Martin, A.C., 2013. Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction. *Nat. Cell Biol.* 15, 926–936.
- Miller, J., Fraser, S.E., McClay, D., 1995. Dynamics of thin filopodia during sea urchin gastrulation. *Development* 121, 2501–2511.
- Milmoos, N.J., Tucker, A.S., 2021. Craniofacial transitions: the role of EMT and MET during head development. *Development* 148.



- Mitrossilis, D., et al., 2017. Mechanotransductive cascade of Myo-II-dependent mesoderm and endoderm invaginations in embryo gastrulation. *Nat. Commun.* 8, 13883.
- Mogi, K., Toyozumi, R., 2010. Invasion by matrix metalloproteinase-expressing cells is important for primitive streak formation in early chick blastoderm. *Cells Tissues Organs* 192, 1–16.
- Nakagawa, S., Takeichi, M., 1995. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* 121, 1321–1332.
- Nakagawa, S., Takeichi, M., 1998. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 125, 2963–2971.
- Nakajima, Y., Burke, R.D., 1996. The initial phase of gastrulation in sea urchins is accompanied by the formation of bottle cells. *Dev. Biol.* 179, 436–446.
- Nakaya, Y., Sukowati, E.W., Wu, Y., Sheng, G., 2008. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 10, 765–775.
- Nakaya, Y., Sukowati, E.W., Sheng, G., 2013. Epiblast integrity requires CLASP and dystroglycan-mediated microtubule anchoring to the basal cortex. *J. Cell Biol.* 202, 637–651.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A., Thiery, J.P., 2016. EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45.
- Ocana, O.H., et al., 2017. A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature* 549, 86–90.
- Oda, H., Tsukita, S., Takeichi, M., 1998. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev. Biol.* 203, 435–450.
- Paluch, E.K., Raz, E., 2013. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 582–590.
- Park, K.S., Gumbiner, B.M., 2010. Cadherin 6B induces BMP signaling and de-epithelialization during the epithelial mesenchymal transition of the neural crest. *Development* 137, 2691–2701.
- Park, K.S., Gumbiner, B.M., 2012. Cadherin-6B stimulates an epithelial mesenchymal transition and the delamination of cells from the neural ectoderm via LIMK/cofilin mediated non-canonical BMP receptor signaling. *Dev Biol* 366, 232–243.
- Pastushenko, I., et al., 2018. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463–468.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., Cano, A., 2004. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell Biol.* 24, 306–319.
- Petronczki, M., Knoblich, J.A., 2001. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 3, 43–49.
- Piacentino, M.L., Li, Y., Bronner, M.E., 2020. Epithelial-to-mesenchymal transition and different migration strategies as viewed from the neural crest. *Curr. Opin. Cell Biol.* 66, 43–50.
- Pouille, P.A., Farge, E., 2008. Hydrodynamic simulation of multicellular embryo invagination. *Phys. Biol.* 5, 015005.
- Priya, R., et al., 2020. Tension heterogeneity directs form and fate to pattern the myocardial wall. *Nature* 588, 130–134.
- Ramkumar, N., et al., 2016. Crumbs2 promotes cell ingress during the epithelial-to-mesenchymal transition at gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 18, 1281–1291.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., Cramer, L.P., 2001. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 11, 1847–1857.
- Savagner, P., 2001. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912–923.
- Savagner, P., 2010. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann. Oncol.* 21, vii89–vii92.
- Sawyer, J.M., et al., 2010. Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev Biol* 341, 5–19.
- Schiffmacher, A.T., Padmanabhan, R., Jhingory, S., Taneyhill, L.A., 2014. Cadherin-6B is proteolytically processed during epithelial-to-mesenchymal transitions of the cranial neural crest. *Mol. Biol. Cell* 25, 41–54.
- Schiffmacher, A.T., Xie, V., Taneyhill, L.A., 2016. Cadherin-6B proteolysis promotes the neural crest cell epithelial-to-mesenchymal transition through transcriptional regulation. *J. Cell Biol.* 215, 735–747.
- Schiffmacher, A.T., Adomako-Ankomah, A., Xie, V., Taneyhill, L.A., 2018. Cadherin-6B proteolytic N-terminal fragments promote chick cranial neural crest cell delamination by regulating extracellular matrix degradation. *Dev. Biol.* 444 (Suppl. 1), S237–S251.
- Schober, M., Schaefer, M., Knoblich, J.A., 1999. Bazoooka recruits inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548–551.
- Sedzinski, J., Hannezo, E., Tu, F., Biro, M., Wallingford, J.B., 2016. Emergence of an apical epithelial cell surface in vivo. *Dev. Cell* 36, 24–35.
- Serrano Nájera, G., Weijer, C.J., 2020. Cellular processes driving gastrulation in the avian embryo. *Mech. Dev.* 163, 103624.
- Shellard, A., Szabó, A., Trepat, X., Mayor, R., 2018. Supracellular contraction at the rear of neural crest cell groups drives collective chemotaxis. *Science* 362, 339–343.
- Shook, D., Keller, R., 2003. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech. Dev.* 120, 1351–1383.
- Shoval, I., Kalcheim, C., 2012. Antagonistic activities of Rho and Rac GTPases underlie the transition from neural crest delamination to migration. *Dev. Dyn.* 241, 1155–1168.
- Shoval, I., Ludwig, A., Kalcheim, C., 2007. Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development* 134, 491–501.
- Simões, S., Oh, Y., Wang, M.F.Z., Fernandez-Gonzalez, R., Tepass, U., 2017. Myosin II promotes the anisotropic loss of the apical domain during. *J. Cell Biol.* 216, 1387–1404.
- Solursh, M., Revel, J.P., 1978. A scanning electron microscope study of cell shape and cell appendages in the primitive streak region of the rat and chick embryo. *Differentiation* 11, 185–190.
- Spiegel, M., Burger, M.M., 1982. Cell adhesion during gastrulation. A new approach. *Exp. Cell Res.* 139, 377–382.
- Staudt, D., Stainier, D., 2012. Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* 46, 397–418.
- Staudt, D.W., et al., 2014. High-resolution imaging of cardiomyocyte behavior reveals two distinct steps in ventricular trabeculation. *Development* 141, 585–593.
- Sun, J., Stathopoulos, A., 2018. FGF controls epithelial-mesenchymal transitions during gastrulation by regulating cell division and apicobasal polarity. *Development* 145.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M., Wieschaus, E., 1991. Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development* 112, 775–789.
- Szabó, A., Mayor, R., 2018. Mechanisms of neural crest migration. *Annu. Rev. Genet.* 52, 43–63.
- Tachibana, K., et al., 2000. Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J. Cell Biol.* 150, 1161–1176.
- Takekuni, K., et al., 2003. Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J. Biol. Chem.* 278, 5497–5500.
- Taneyhill, L.A., Schiffmacher, A.T., 2017. Should I stay or should I go? Cadherin function and regulation in the neural crest. *Genesis* 55.
- Taneyhill, L.A., Coles, E.G., Bronner-Fraser, M., 2007. Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest. *Development* 134, 1481–1490.
- Thiery, J.P., Sleeman, J.P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.
- Voiculescu, O., Bodenstein, L., Lau, I.J., Stern, C.D., 2014. Local cell interactions and self-amplifying individual cell ingress drive amniote gastrulation. *Elife* 3, e01817.
- Weng, M., Wieschaus, E., 2016. Myosin-dependent remodeling of adherens junctions protects junctions from Snail-dependent disassembly. *J. Cell Biol.* 212, 219–229.
- Werner, M.E., et al., 2014. Radial intercalation is regulated by the Par complex and the microtubule-stabilizing protein CLAMP/Spefl. *J. Cell Biol.* 206, 367–376.
- Whiteman, E.L., Liu, C.J., Fearon, E.R., Margolis, B., 2008. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene* 27, 3875–3879.
- Williams, M., Burdall, C., Periasamy, A., Lewandoski, M., Sutherland, A., 2012. Mouse primitive streak forms in situ by initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev. Dyn.* 241, 270–283.
- Winklbauer, R., 2020. Mesoderm and endoderm internalization in the *Xenopus* gastrula. *Curr. Top Dev. Biol.* 136, 243–270.
- Winklbauer, R., Müller, H.A., 2011. Mesoderm layer formation in *Xenopus* and *Drosophila* gastrulation. *Phys. Biol.* 8, 045001.
- Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 14, 818–829.
- Yang, J., et al., 2020. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 341–352.

# Références

- Aaronson, S. A.** (1991). Growth Factors and Cancer. *Science* **254**, 1146–1153.
- Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y. Y., Liphardt, J., Hwang, E. S. and Weaver, V. M.** (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **7**, 1120–1134.
- Ambrosini, A., Rayner, M., Monier, B. and Suzanne, M.** (2019). Mechanical Function of the Nucleus in Force Generation during Epithelial Morphogenesis. *Dev. Cell* **50**, 197–211.e5.
- Andersen, D. S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., Toggweiler, J., Basler, K., Mapelli, M., Hueber, A. O., et al.** (2015). The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature* **522**, 482–486.
- Bancroft, M. and Bellairs, R.** (1974). The onset of differentiation in the epiblast of the chick blastoderm (SEM and TEM). *Cell Tissue Res.* **155**, 399–418.
- Barbacid, M.** (1987). ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779–827.
- Bates, R. C. and Mercurio, A. M.** (2003). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1790–1800.
- Beaucher, M., Hersperger, E., Page-McCaw, A. and Shearn, A.** (2007). Metastatic ability of Drosophila tumors depends on MMP activity. *Dev. Biol.* **303**, 625–634.
- Becker, D., Meier, C. B. and Herlyn, M.** (1989). Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *EMBO J.* **8**, 3685–3691.
- Bell, G. P. and Thompson, B. J.** (2014). Colorectal cancer progression: Lessons from Drosophila? *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**, 70–77.
- Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. and Steller, H.** (1998). The Drosophila gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell* **95**, 331–341.
- Bergmann, A., Perez, E. and Lindblad, J. L.** (2017). Tumor-promoting function of apoptotic caspases by an amplification loop involving ROS, macrophages and JNK in Drosophila. *eLife* **6**, 1–20.
- Bertet, C., Sulak, L. and Lecuit, T.** (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667–671.
- Berthenet, K., Castillo Ferrer, C., Fanfone, D., Popgeorgiev, N., Neves, D., Bertolino, P., Gibert, B., Hernandez-Vargas, H. and Ichim, G.** (2020). Failed Apoptosis Enhances Melanoma Cancer Cell Aggressiveness. *Cell Rep.* **31**,.
- Bilder, D.** (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev.* **18**, 1909–1925.

- Bilder, D., Li, M. and Perrimon, N.** (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**, 113–116.
- Blanchoin, L.** (2014). Laurent Blanchoin. *Curr. Biol.* **24**, R674–R675.
- Bonde, A.-K., Tischler, V., Kumar, S., Soltermann, A. and Schwendener, R. A.** (2012). Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* **12**, 35.
- Bos, J. L.** (1988). The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.* **195**, 255–271.
- Boukhatmi, H., Martins, T., Pillidge, Z., Kamenova, T., Boukhatmi, H., Martins, T., Pillidge, Z., Kamenova, T. and Bray, S.** (2020). Notch Mediates Inter-tissue Communication to Promote Tumorigenesis Article Notch Mediates Inter-tissue Communication to Promote Tumorigenesis. *Curr. Biol.* **30**, 1809-1820.e4.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- Broders-Bondon, F., Ho-Bouloires, T. H. N., Fernandez-Sanchez, M. E. and Farge, E.** (2018). Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *J. Cell Biol.* **217**, 1571–1587.
- Brumby, A. M. and Richardson, H. E.** (2003). scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J.* **22**, 5769–5779.
- Brumby, A. M., Goulding, K. R., Schlosser, T., Loi, S., Galea, R., Khoo, P., Bolden, J. E., Aigaki, T., Humbert, P. O. and Richardson, H. E.** (2011). Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: a RhoGEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis. *Genetics* **188**, 105–125.
- Bryan, D. S., Stack, M., Kryzstofiak, K., Cichoń, U., Thomas, D. G., Surcel, A., Schiffhauer, E. S., Beckett, M. A., Khodarev, N. N., Xue, L., et al.** (2020). 4-Hydroxyacetophenone modulates the actomyosin cytoskeleton to reduce metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 22423–22429.
- Bryant, P. J. and Schubiger, G.** (1971). Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **24**, 233–263.
- Buckley, C. E. and St Johnston, D.** (2022a). Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 559–577.
- Buckley, C. E. and St Johnston, D.** (2022b). Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 559–577.
- Campbell, I. D. and Humphries, M. J.** (2011). Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004994.
- Campbell, K., Lebreton, G., Franch-Marro, X. and Casanova, J.** (2018). Differential roles of the *Drosophila* EMT-inducing transcription factors Snail and Serpent in driving primary tumour growth. *PLoS Genet.* **14**, 1–17.



- Campellone, K. G. and Welch, M. D.** (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 237–251.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A.** (2000). The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76–83.
- Cavanaugh, K. E., Staddon, M. F., Munro, E., Banerjee, S. and Gardel, M. L.** (2020). RhoA Mediates Epithelial Cell Shape Changes via Mechanosensitive Endocytosis. *Dev. Cell* **52**, 152-166.e5.
- Che, D., Zhang, S., Jing, Z., Shang, L., Jin, S., Liu, F., Shen, J., Li, Y., Hu, J., Meng, Q., et al.** (2017). Macrophages induce EMT to promote invasion of lung cancer cells through the IL-6-mediated COX-2/PGE2/ $\beta$ -catenin signalling pathway. *Mol. Immunol.* **90**, 197–210.
- Chen, Y.-Q., Lan, H.-Y., Wu, Y.-C., Yang, W.-H., Chiou, A. and Yang, M.-H.** (2018). Epithelial-mesenchymal transition softens head and neck cancer cells to facilitate migration in 3D environments. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 3837–3846.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J. C. and Galliot, B.** (2009). Apoptotic Cells Provide an Unexpected Source of Wnt3 Signaling to Drive Hydra Head Regeneration. *Dev. Cell* **17**, 279–289.
- Colombani, J., Andersen, D. S. and Léopold, P.** (2012). Secreted peptide dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. *Science* **336**, 582–585.
- Conklin, M. W., Eickhoff, J. C., Riching, K. M., Pehlke, C. A., Eliceiri, K. W., Provenzano, P. P., Friedl, A. and Keely, P. J.** (2011). Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* **178**, 1221–1232.
- Coopman, P. and Djiane, A.** (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3535–3553.
- Croft, D. R., Sahai, E., Mavria, G., Li, S., Tsai, J., Lee, W. M. F., Marshall, C. J. and Olson, M. F.** (2004). Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Res.* **64**, 8994–9001.
- Cross, S. E., Jin, Y.-S., Rao, J. and Gimzewski, J. K.** (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 780–783.
- Cuervo, R. and Covarrubias, L.** (2004). Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development* **131**, 15–24.
- Dannenbergh, J.-H. and te Riele, H. P. J.** (2006). The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis. *Results Probl. Cell Differ.* **42**, 183–225.
- Davis, J. R. and Tapon, N.** (2019). Hippo signalling during development. *Development* **146**, dev167106.

- Devarajan, E., Sahin, A. A., Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A.-M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.-H., et al.** (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* **21**, 8843–8851.
- Dewhirst, M. W. and Secomb, T. W.** (2017). Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 738–750.
- Dhanasekaran, D. N. and Reddy, E. P.** (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–51.
- Diwanji, N. and Bergmann, A.** (2020). Basement membrane damage by ROS- and JNK-mediated Mmp2 activation drives macrophage recruitment to overgrown tissue. *Nat. Commun.* **11**,.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A. and Pan, D.** (2007). Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals. *Cell* **130**, 1120–1133.
- Dongre, A. and Weinberg, R. A.** (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 69–84.
- Dongre, A., Rashidian, M., Reinhardt, F., Bagnato, A., Keckesova, Z., Ploegh, H. L. and Weinberg, R. A.** (2017). Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas. *Cancer Res.* **77**, 3982–3989.
- Dow, L. E., Kauffman, J. S., Caddy, J., Peterson, A. S., Jane, S. M., Russell, S. and Humbert, P. O.** (2007). The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: Regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge. *Oncogene* **26**, 2272–2282.
- Dow, L. E., Elsum, I., King, C. L., Kinross, K. M., Richardson, H. E. and Humbert, P. O.** (2008). Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling. *Oncogene* **27**, 5988–6001.
- Egeblad, M. and Werb, Z.** (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174.
- Eichenlaub, T., Villadsen, R., Freitas, F. C. P., Andrejeva, D., Aldana, B. I., Nguyen, H. T., Petersen, O. W., Gorodkin, J., Herranz, H. and Cohen, S. M.** (2018). Warburg Effect Metabolism Drives Neoplasia in a *Drosophila* Genetic Model of Epithelial Cancer. *Curr. Biol.* **28**, 3220-3228.e6.
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A. E. M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalka, A. J., Oriá, R., Kechagia, J. Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A. L., et al.** (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* **171**, 1397-1410.e14.
- Espina, C., Céspedes, M. V., García-Cabezas, M. A., Gómez del Pulgar, M. T., Boluda, A., Oroz, L. G., Benitah, S. A., Cejas, P., Nistal, M., Mangues, R., et al.** (2008). A

- critical role for Rac1 in tumor progression of human colorectal adenocarcinoma cells. *Am. J. Pathol.* **172**, 156–166.
- Fan, Q.-M., Jing, Y.-Y., Yu, G.-F., Kou, X.-R., Ye, F., Gao, L., Li, R., Zhao, Q.-D., Yang, Y., Lu, Z.-H., et al.** (2014). Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **352**, 160–168.
- Fearon, K., Arends, J. and Baracos, V.** (2013). Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 90–99.
- Ferguson, L. P., Diaz, E. and Reya, T.** (2021). The Role of the Microenvironment and Immune System in Regulating Stem Cell Fate in Cancer. *Trends Cancer* **7**, 624–634.
- Fife, C. M., McCarroll, J. A. and Kavallaris, M.** (2014). Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 5507–5523.
- Figuroa-Clarevega, A. and Bilder, D.** (2015). Malignant Drosophila tumors interrupt insulin signaling to induce cachexia-like wasting. *Dev. Cell* **33**, 47–55.
- Fogarty, C. E., Diwanji, N., Lindblad, J. L., Tare, M., Amcheslavsky, A., Makhijani, K., Brückner, K., Fan, Y. and Bergmann, A.** (2016). Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via Drosophila Macrophages. *Curr. Biol.* **26**, 575–584.
- Font-Noguera, M., Montemurro, M., Benassayag, C., Monier, B. and Suzanne, M.** (2021). Getting started for migration: A focus on EMT cellular dynamics and mechanics in developmental models. *Cells Dev.* **168**, 203717.
- Ford, C. A., Petrova, S., Pound, J. D., Voss, J. J. L. P., Melville, L., Paterson, M., Farnworth, S. L., Gallimore, A. M., Cuff, S., Wheadon, H., et al.** (2015). Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma. *Curr. Biol.* **25**, 577–588.
- Friesen, C., Fulda, S. and Debatin, K.-M.** (1997). Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* **11**, 1833–1841.
- Fritz, G., Just, I. and Kaina, B.** (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer* **81**, 682–687.
- Froldi, F., Ziosi, M., Tomba, G., Parisi, F., Garoia, F., Pession, A. and Grifoni, D.** (2008). Drosophila Lethal Giant Larvae Neoplastic Mutant as a Genetic Tool for Cancer Modeling. *Curr. Genomics* **9**, 147–154.
- Fuchs, Y. and Steller, H.** (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **147**, 742–758.
- Fuchs, Y. and Steller, H.** (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 329–344.
- Fulda, S.** (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 370835.

- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M. and Kroemer, G.** (2010). Mitochondrial gateways to cancer. *Mol. Aspects Med.* **31**, 1–20.
- Gascoyne, R. D., Adomat, S. A., Krajewski, S., Krajewska, M., Horsman, D. E., Tolcher, A. W., O'Reilly, S. E., Hoskins, P., Coldman, A. J., Reed, J. C., et al.** (1997). Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* **90**, 244–251.
- Gateff, E.** (1978). Malignant Neoplasms of Genetic Origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **200**, 1448–1459.
- Go, M. J., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* **125**, 2031–2040.
- Goebel, L., Grage-Griebenow, E., Gorys, A., Helm, O., Genrich, G., Lenk, L., Wesch, D., Ungefroren, H., Freitag-Wolf, S., Sipos, B., et al.** (2015). CD4+ T cells potently induce epithelial-mesenchymal-transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells-novel implications of CD4+ T cells in pancreatic cancer development. *Oncoimmunology* **4**, e1000083.
- Gonzalez, C.** (2013). *Drosophila melanogaster*: A model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 172–183.
- González, I., Simón, R. and Busturia, A.** (2009). The Polyhomeotic protein induces hyperplastic tissue overgrowth through the activation of the JAK/STAT pathway. *Cell Cycle* **8**, 4103–4111.
- Gracia, M., Theis, S., Proag, A., Gay, G., Benassayag, C. and Suzanne, M.** (2019). Mechanical impact of epithelial–mesenchymal transition on epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Nat. Commun.* **10**, 2951.
- Graninger, W. B., Seto, M., Boutain, B., Goldman, P. and Korsmeyer, S. J.** (1987). Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J. Clin. Invest.* **80**, 1512–1515.
- Gravdal, K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A. and Akslen, L. A.** (2007). A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 7003–7011.
- Grifoni, D., Garoia, F., Schimanski, C. C., Schmitz, G., Laurenti, E., Galle, P. R., Pession, A., Cavicchi, S. and Strand, D.** (2004). The human protein Hugl-1 substitutes for *Drosophila* lethal giant larvae tumour suppressor function in vivo. *Oncogene* **23**, 8688–8694.
- Grzeschik, N. A., Amin, N., Secombe, J., Brumby, A. M. and Richardson, H. E.** (2007). Abnormalities in cell proliferation and apico-basal cell polarity are separable in *Drosophila* lgl mutant clones in the developing eye. *Dev. Biol.* **311**, 106–123.

- Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H. M., Ananthakrishnan, R., Mitchell, D., et al.** (2005). Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence. *Biophys. J.* **88**, 3689–3698.
- Halbleib, J. M. and Nelson, W. J.** (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* **20**, 3199–3214.
- Hanahan, D.** (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.
- Harmansa, S., Alborelli, I., Bieli, D., Caussinus, E. and Affolter, M.** (2017). A nanobody-based toolset to investigate the role of protein localization and dispersal in *Drosophila*. *eLife* **6**, e22549.
- Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M. and Perrimon, N.** (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* **14**, 2857–2865.
- Harvey, K. F., Zhang, X. and Thomas, D. M.** (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 246–257.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* **120**, 2121–2129.
- Heisenberg, C.-P. and Bellaïche, Y.** (2013). Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning. *Cell* **153**, 948–962.
- Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., d’Agay, M.-F., Briere, J., Lavignac, C., Fillet, G., Salles, G., Marolleau, J.-P., Diebold, J., et al.** (1996). Prognostic Significance of bcl-2 Protein Expression in Aggressive Non-Hodgkin’s Lymphoma. *Blood* **87**, 265–272.
- Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V. M., Francí, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Di Croce, L., Helin, K., et al.** (2008). Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4772–4781.
- Herranz, H., Hong, X. and Cohen, S. M.** (2012). Mutual repression by bantam miRNA and Capicua links the EGFR/MAPK and Hippo pathways in growth control. *Curr. Biol. CB* **22**, 651–657.
- Herranz, H., Eichenlaub, T. and Cohen, S. M.** (2016). Cancer in *Drosophila*. Imaginal Discs as a Model for Epithelial Tumor Formation. In *Current Topics in Developmental Biology*, .
- Hohmann, T. and Dehghani, F.** (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **8**, 362.

- Houdusse, A. and Sweeney, H. L.** (2016). How Myosin Generates Force on Actin Filaments. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 989–997.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. and Pan, D.** (2005a). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of YAP. *Cell* **122**, 421–434.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. and Pan, D.** (2005b). The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* **122**, 421–434.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F. F., O’Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A. C., et al.** (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* **17**, 860–866.
- Humbert, P. O., Grzeschik, N. A., Brumby, A. M., Galea, R., Esum, I. and Richardson, H. E.** (2008). Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* **27**, 6888–6907.
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. and Schwartz, M. A.** (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 802–812.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. and Margolis, B.** (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**, 137–142.
- Igaki, T., Pagliarini, R. A. and Xu, T.** (2006). Loss of Cell Polarity Drives Tumor Growth and Invasion through JNK Activation in Drosophila. *Curr. Biol.* **16**, 1139–1146.
- Jain, R. K., Martin, J. D. and Stylianopoulos, T.** (2014). The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 321–46.
- Jung, H. Y., Fattet, L., Tsai, J. H., Kajimoto, T., Chang, Q., Newton, A. C. and Yang, J.** (2019). Apical–basal polarity inhibits epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis by PAR-complex-mediated SNAIL degradation. *Nat. Cell Biol.* **21**, 359–371.
- Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. and Bryant, P. J.** (1995). The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* **9**, 534–546.
- Kahlert, C., Lahes, S., Radhakrishnan, P., Dutta, S., Mogler, C., Herpel, E., Brand, K., Steinert, G., Schneider, M., Mollenhauer, M., et al.** (2011). Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 7654–7663.
- Kale, G. R., Yang, X., Philippe, J.-M., Mani, M., Lenne, P.-F. and Lecuit, T.** (2018). Distinct contributions of tensile and shear stress on E-cadherin levels during morphogenesis. *Nat. Commun.* **9**, 5021.



- Kalkavan, H., Chen, M. J., Crawford, J. C., Quarato, G., Fitzgerald, P., Tait, S. W. G., Goding, C. R. and Green, D. R.** (2022). Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells. *Cell* **185**, 3356-3374.e22.
- Kalluri, R. and Zeisberg, M.** (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401.
- Kamei, Y., Kito, K., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Ueda, N., Kobayashi, N. and Abe, Y.** (2007). Human scribble accumulates in colorectal neoplasia in association with an altered distribution of  $\beta$ -catenin. *Hum. Pathol.* **38**, 1273–1281.
- Karim, F. D. and Rubin, G. M.** (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Dev. Camb. Engl.* **125**, 1–9.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257.
- Khaled, W., Reichling, S., Bruhns, O. T., Boese, H., Baumann, M., Monkman, G., Egersdoerfer, S., Klein, D., Tunayar, A., Freimuth, H., et al.** (2004). Palpation imaging using a haptic system for virtual reality applications in medicine. *Stud. Health Technol. Inform.* **98**, 147–153.
- Khoo, P., Allan, K., Willoughby, L., Brumby, A. M. and Richardson, H. E.** (2013). In *Drosophila*, RhoGEF2 cooperates with activated Ras in tumorigenesis through a pathway involving Rho1-Rok-Myosin-II and JNK signalling. *Dis. Model. Mech.* **6**, 661–678.
- Kim, H. S., Lee, J. W., Soung, Y. H., Park, W. S., Kim, S. Y., Lee, J. H., Park, J. Y., Cho, Y. G., Kim, C. J., Jeong, S. W., et al.** (2003). Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* **125**, 708–715.
- Kinnander, H. and Gustafson, T.** (1960). Further studies on the cellular basis of gastrulation in the sea urchin larva. *Exp. Cell Res.* **19**, 278–290.
- Kirchner, J., Gross, S., Bennett, D. and Alphey, L.** (2007). The nonmuscle myosin phosphatase PP1beta (flapwing) negatively regulates Jun N-terminal kinase in wing imaginal discs of *Drosophila*. *Genetics* **175**, 1741–1749.
- Klapholz, B. and Brown, N. H.** (2017). Talin - the master of integrin adhesions. *J. Cell Sci.* **130**, 2435–2446.
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., et al.** (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.* **40**, 6009–6015.
- Korsmeyer, S. J.** (1992). Chromosomal Translocations in Lymphoid Malignancies Reveal Novel Proto-Oncogenes. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 785–807.
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Lasierra Losada, M., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, D., Reichardt, W., Bronsert, P., et al.** (2017). The

- EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat. Cell Biol.* **19**, 518–529.
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T. and Kawakami, Y.** (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* **15**, 195–206.
- Külshammer, E. and Uhlirova, M.** (2013). The actin cross-linker Filamin/Cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling. *J. Cell Sci.* **126**, 927–938.
- Külshammer, E., Kilinc, M., Csordás, G., Bresser, T., Nolte, H. and Uhlirova, M.** (2022). The mechanosensor Filamin A/Cheerio promotes tumourigenesis via specific interactions with components of the cell cortex. *FEBS J.* **289**, 4497–4517.
- Kuphal, S., Wallner, S., Schimanski, C. C., Bataille, F., Hofer, P., Strand, S., Strand, D. and Bosserhoff, A. K.** (2006). Expression of Hugel-1 is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* **25**, 103–110.
- Kurada, P. and White, K.** (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell* **95**, 319–329.
- Kwon, Y., Song, W., Droujinine, I. A., Hu, Y., Asara, J. M. and Perrimon, N.** (2015). Systemic organ wasting induced by localized expression of the secreted insulin/IGF antagonist ImpL2. *Dev. Cell* **33**, 36–46.
- La Marca, J. E. and Richardson, H. E.** (2020). Two-Faced: Roles of JNK Signalling During Tumourigenesis in the *Drosophila* Model. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 42.
- Laklai, H., Miroshnikova, Y. A., Pickup, M. W., Collisson, E. A., Kim, G. E., Barrett, A. S., Hill, R. C., Lakins, J. N., Schlaepfer, D. D., Mouw, J. K., et al.** (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat. Med.* **22**, 497–505.
- Lecuit, T. and Lenne, P.-F.** (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 633–644.
- Lecuit, T., Lenne, P.-F. and Munro, E.** (2011). Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 157–184.
- Lee, G., Sehgal, R., Wang, Z., Nair, S., Kikuno, K., Chen, C. H., Hay, B. and Park, J. H.** (2013). Essential role of grim-led programmed cell death for the establishment of corazonin-producing peptidergic nervous system during embryogenesis and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Open* **2**, 283–294.
- Leoncini, L., Vecchio, M. T. D., Megha, T., Barbini, P., Galieni, P., Pileri, S., Gherlinzoni, F., Tosi, P., Kraft, R. and Cottier, H.** (1993). Correlations Between Apoptotic and Proliferative Indices in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. **142**, 9.
- Leong, G. R., Goulding, K. R., Amin, N., Richardson, H. E. and Brumby, A. M.** (2009). Scribble mutants promote aPKC and JNK-dependent epithelial neoplasia independently of Crumbs. *BMC Biol.* **7**, 62.

- Lesko, A. C., Keller, R., Chen, P. and Sutherland, A.** (2021). Scribble mutation disrupts convergent extension and apical constriction during mammalian neural tube closure. *Dev. Biol.* **478**, 59–75.
- Letort, G., Ennomani, H., Gressin, L., Théry, M. and Blanchoin, L.** (2015). Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton.
- Levayer, R. and Moreno, E.** (2013). Mechanisms of cell competition: themes and variations. *J. Cell Biol.* **200**, 689–698.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A. and Lecuit, T.** (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **13**, 529–540.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F. T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al.** (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* **139**, 891–906.
- Lin, C.-H., Pelissier, F. A., Zhang, H., Lakins, J., Weaver, V. M., Park, C. and LaBarge, M. A.** (2015). Microenvironment rigidity modulates responses to the HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor lapatinib via YAP and TAZ transcription factors. *Mol. Biol. Cell* **26**, 3946–3953.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S. and Pan, D.** (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10532–7.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z. and Bissell, M. J.** (1997). Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 Triggers a Cascade of Molecular Alterations That Leads to Stable Epithelial-to-Mesenchymal Conversion and a Premalignant Phenotype in Mammary Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1861–1872.
- Lodge, W., Zavortink, M., Golenkina, S., Froidi, F., Dark, C., Cheung, S., Parker, B. L., Blazev, R., Bakopoulos, D., Christie, E. L., et al.** (2021). Tumor-derived MMPs regulate cachexia in a Drosophila cancer model. *Dev. Cell* **56**, 2664-2680.e6.
- Lopez, J. I., Kang, I., You, W.-K., McDonald, D. M. and Weaver, V. M.** (2011). In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **3**, 910–921.
- Lu, H. and Bilder, D.** (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1132–1139.
- Lu, P., Weaver, V. M. and Werb, Z.** (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **196**, 395–406.
- Ma, X., Chen, Y., Xu, W., Wu, N., Li, M., Cao, Y., Wu, S., Li, Q. and Xue, L.** (2015). Impaired Hippo signaling promotes Rho1–JNK-dependent growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1065–1070.

- Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J. and Goodman, C. S.** (1991). The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell* **67**, 853–868.
- Martin, A. C. and Goldstein, B.** (2014). Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **141**, 1987–1998.
- Martin, A. C., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F.** (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* **457**, 495–499.
- Martin, E., Theis, S., Gay, G., Monier, B., Rouvière, C. and Suzanne, M.** (2021). Arp2/3-dependent mechanical control of morphogenetic robustness in an inherently challenging environment. *Dev. Cell* **56**, 687-701.e7.
- Martinez, A. M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C. and Cavalli, G.** (2009). Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat. Genet.* **41**, 1076–1082.
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S. and Forte, G.** (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front. Physiol.* **9**,
- Matsumura, F.** (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* **15**, 371–377.
- Mekhdjian, A. H., Kai, F., Rubashkin, M. G., Prah, L. S., Przybyla, L. M., McGregor, A. L., Bell, E. S., Barnes, J. M., DuFort, C. C., Ou, G., et al.** (2017). Integrin-mediated traction force enhances paxillin molecular associations and adhesion dynamics that increase the invasiveness of tumor cells into a three-dimensional extracellular matrix. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1467–1488.
- Melcarne, C., Ramond, E., Dudzic, J., Bretscher, A. J., Kurucz, É., Andó, I. and Lemaitre, B.** (2019). Two Nimrod receptors, NimC1 and Eater, synergistically contribute to bacterial phagocytosis in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* **286**, febs.14857.
- Miller, B. W., Morton, J. P., Pinese, M., Saturno, G., Jamieson, N. B., McGhee, E., Timpson, P., Leach, J., McGarry, L., Shanks, E., et al.** (2015). Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1063–1076.
- Minn, A. J., Rudin, C. M., Boise, L. H. and Thompson, C. B.** (1995). Expression of Bcl-xL Can Confer a Multidrug Resistance Phenotype. *Blood* **86**, 1903–1910.
- Miroshnikova, Y. A., Mouw, J. K., Barnes, J. M., Pickup, M. W., Lakins, J. N., Kim, Y., Lobo, K., Persson, A. I., Reis, G. F., McKnight, T. R., et al.** (2016). Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1 $\alpha$ -tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1336–1345.
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D. and Bellosta, P.** (2019). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Front. Genet.* **10**, 51.

- Miyashita, T. and Reed, J. C.** (1993). Bcl-2 Oncoprotein Blocks Chemotherapy-Induced Apoptosis in a Human Leukemia Cell Line. *Blood* **81**, 151–157.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A. and Suzanne, M.** (2015). Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* **518**, 245–248.
- Munjal, A. and Lecuit, T.** (2014). Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development* **141**, 1789–1793.
- Murdoch, J. N., Henderson, D. J., Doudney, K., Gaston-Massuet, C., Phillips, H. M., Paternotte, C., Arkell, R., Stanier, P. and Copp, A. J.** (2003). Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 87–98.
- Nagata, R. and Igaki, T.** (2018). Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors. *Dev. Growth Differ.* **60**,.
- Nakajima, Y. and Burke, R. D.** (1996). The initial phase of gastrulation in sea urchins is accompanied by the formation of bottle cells. *Dev. Biol.* **179**, 436–446.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.-J., Arsanto, J.-P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., et al.** (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* **24**, 4330–4339.
- Neisch, A. L., Speck, O., Stronach, B. and Fehon, R. G.** (2010). Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **189**, 311–323.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A. and Thiery, J. P.** (2016). Review EMT : 2016. 21–45.
- Nolo, R., Morrison, C. M., Tao, C., Zhang, X. and Halder, G.** (2006). The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Curr. Biol. CB* **16**, 1895–1904.
- Northey, J. J., Przybyla, L. and Weaver, V. M.** (2017). Tissue force programs cell fate and tumor aggression. *Cancer Discov.* **7**, 1224–1237.
- Oh, H. and Irvine, K. D.** (2009). In vivo analysis of Yorkie phosphorylation sites. *Oncogene* **28**, 1916–1927.
- Oh, H. and Irvine, K. D.** (2010). Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol.* **20**, 410–417.
- Opferman, J. T. and Korsmeyer, S. J.** (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* **4**, 410–415.
- Orgaz, J. L., Herraiz, C. and Sanz-Moreno, V.** (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* **5**, e29019.

- Otani, T. and Furuse, M.** (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol.* **30**, 805–817.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Santé, J. M. and Rubin, G. M.** (2003). Drosophila Matrix Metalloproteinases Are Required for Tissue Remodeling, but Not Embryonic Development. *Dev. Cell* **4**, 95–106.
- Pagliarini, R. A. and Xu, T.** (2003). A Genetic Screen in Drosophila for Metastatic Behavior. *Science* **302**, 1227–1231.
- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. and Xu, T.** (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in Drosophila. *Dis. Model. Mech.* **1**, 144–154.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., et al.** (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241–254.
- Patel, S. D., Ciatto, C., Chen, C. P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., Schieren, I., Jessell, T. M., Honig, B., Price, S. R., et al.** (2006). Type II Cadherin Ectodomain Structures: Implications for Classical Cadherin Specificity. *Cell* **124**, 1255–1268.
- Pavlyukov, M. S., Yu, H., Bastola, S., Minata, M., Shender, V. O., Lee, Y., Zhang, S., Wang, J., Komarova, S., Wang, J., et al.** (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell* **34**, 119-135.e10.
- Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J., Falda, M., Giovanazzo, B., Emanuel, B. S., Rovera, G., Nowell, P. C. and Croce, C. M.** (1984). A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 7166–7170.
- Pérez-Garijo, A. and Steller, H.** (2015). Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development* **142**, 3253–3262.
- Pérez-Garijo, A., Martín, F. A., Struhl, G. and Morata, G.** (2005). Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17664–17669.
- Perez-Garijo, A., Shlevkov, E. and Morata, G.** (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the Drosophila wing disc. *Development* **136**, 1169–1177.
- Pfeffer, C. M. and Singh, A. T. K.** (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 448.
- Piacentino, M. L., Li, Y. and Bronner, M. E.** (2020). Epithelial-to-mesenchymal transition and different migration strategies as viewed from the neural crest. *Curr. Opin. Cell Biol.* **66**, 43–50.
- Pinal, N., Martín, M., Medina, I. and Morata, G.** (2018). Short-term activation of the Jun N-terminal kinase pathway in apoptosis-deficient cells of Drosophila induces tumorigenesis. *Nat. Commun.* **9**,



- Plastino, J. and Blanchoin, L.** (2018). Dynamic stability of the actin ecosystem. *J. Cell Sci.* **132**, jcs219832.
- Plodinec, M., Loparic, M., Monnier, C. A., Obermann, E. C., Zanetti-Dallenbach, R., Oertle, P., Hyotyla, J. T., Aebi, U., Bentires-Alj, M., Lim, R. Y. H., et al.** (2012). The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 757–765.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D.** (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 545–576.
- Potter, C. J. and Luo, L.** (2013). Using the Q system in *Drosophila*. *NIH Public Access* **18**, 1199–1216.
- Prudkin, L., Liu, D. D., Ozburn, N. C., Sun, M., Behrens, C., Tang, X., Brown, K. C., Bekele, B. N., Moran, C. and Wistuba, I. I.** (2009). Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **22**, 668–678.
- Quail, D. F. and Joyce, J. A.** (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437.
- Ramos-lewis, W. and Page-mccaw, A.** (2019). Basement membrane mechanics shape development : Lessons from the fly. *Matrix Biol.* **75–76**, 72–81.
- Rassidakis, G. Z., Jones, D., Lai, R., Ramalingam, P., Sarris, A. H., McDonnell, T. J. and Jeffrey Medeiros, L.** (2003). BCL-2 family proteins in peripheral T-cell lymphomas: correlation with tumour apoptosis and proliferation. *J. Pathol.* **200**, 240–248.
- Rath, N., Morton, J. P., Julian, L., Helbig, L., Kadir, S., McGhee, E. J., Anderson, K. I., Kalna, G., Mullin, M., Pinho, A. V., et al.** (2017). ROCK signaling promotes collagen remodeling to facilitate invasive pancreatic ductal adenocarcinoma tumor cell growth. *EMBO Mol. Med.* **9**, 198–218.
- Rauzi, M., Lenne, P.-F. and Lecuit, T.** (2010). Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling. *Nature* **468**, 1110–1114.
- Richmond, P. J., Karayiannakis, A. J., Nagafuchi, A., Kaisary, A. V. and Pignatelli, M.** (1997). Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res.* **57**, 3189–3193.
- Rodriguez-Hernandez, I., Cantelli, G., Bruce, F. and Sanz-Moreno, V.** (2016). Rho, ROCK and actomyosin contractility in metastasis as drug targets. *F1000Research* **5**, F1000 Faculty Rev-783.
- Roellig, D., Theis, S., Proag, A., Allio, G., Bénazéraf, B., Gros, J. and Suzanne, M.** (2022). Force-generating apoptotic cells orchestrate avian neural tube bending. *Dev. Cell.*
- Roh-Johnson, M., Shemer, G., Higgins, C. D., McClellan, J. H., Werts, A. D., Tulu, U. S., Gao, L., Betzig, E., Kiehart, D. P. and Goldstein, B.** (2012). Triggering a cell shape change by exploiting preexisting actomyosin contractions. *Science* **335**, 1232–1235.

- Ross, T. D., Coon, B. G., Yun, S., Baeyens, N., Tanaka, K., Ouyang, M. and Schwartz, M. A.** (2013). Integrins in mechanotransduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 613–618.
- Rudrapatna, V. A., Bangi, E. and Cagan, R. L.** (2014). A Jnk-Rho-Actin remodeling positive feedback network directs Src-driven invasion. *Oncogene* **33**, 2801–2806.
- Sadok, A., McCarthy, A., Caldwell, J., Collins, I., Garrett, M. D., Yeo, M., Hooper, S., Sahai, E., Kuemper, S., Mardakheh, F. K., et al.** (2015). Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis. *Cancer Res.* **75**, 2272–2284.
- Sakuragi, N., Salah-eldin, A., Watari, H., Itoh, T., Inoue, S., Moriuchi, T. and Fujimoto, S.** (2002). Bax, Bcl-2, and p53 Expression in Endometrial Cancer. *Gynecol. Oncol.* **86**, 288–296.
- Samuel, M. S., Lopez, J. I., Mcghee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Zhou, J., Brunton, V. G., Barker, N., et al.** (2011). Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and  $\beta$ -Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth. *Cell Press* 776–791.
- Sánchez-Tilló, E., Lázaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E. C., Castells, A., Engel, P. and Postigo, A.** (2010). ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* **29**, 3490–3500.
- Sawyer, J. M., Harrell, J. R., Shemer, G., Sullivan-Brown, J., Roh-Johnson, M. and Goldstein, B.** (2010). Apical constriction: A cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev. Biol.* **341**, 5–19.
- Schimanski, C. C., Schmitz, G., Kashyap, A., Bosserhoff, A. K., Bataille, F., Schäfer, S. C., Lehr, H. A., Berger, M. R., Galle, P. R., Strand, S., et al.** (2005). Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene* **24**, 3100–3109.
- Seo, B. R., Bhardwaj, P., Choi, S., Gonzalez, J., Andresen Eguiluz, R. C., Wang, K., Mohanan, S., Morris, P. G., Du, B., Zhou, X. K., et al.** (2015). Obesity-dependent changes in interstitial ECM mechanics promote breast tumorigenesis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 301ra130.
- Shibue, T. and Weinberg, R. A.** (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 611–629.
- Shintani, Y., Fujiwara, A., Kimura, T., Kawamura, T., Funaki, S., Minami, M. and Okumura, M.** (2016). IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **11**, 1482–1492.
- Shioiri, M., Shida, T., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Nishimura, M., Takano, S. and Miyazaki, M.** (2006). Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* **94**, 1816–1822.

- Singh, A. and Settleman, J.** (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**, 4741–4751.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J. and Ullrich, A.** (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707–712.
- Srivastava, A., Pastor-Pareja, J. C., Igaki, T., Pagliarini, R. A. and Xu, T.** (2007). Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 2721–2726.
- Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympon, C. J., Huey, B., Rougier, J.-P., Gray, J. W., Pinkel, D., Bissell, M. J. and Werb, Z.** (1999). The Stromal Proteinase MMP3/Stromelysin-1 Promotes Mammary Carcinogenesis. *Cell* **98**, 137–146.
- Suzanne, M. and Steller, H.** (2013). Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.* **20**, 669–675.
- Swaminathan, V., Mythreye, K., O'Brien, E. T., Berchuck, A., Blobe, G. C. and Superfine, R.** (2011). Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res.* **71**, 5075–5080.
- Taciak, B., Pruszyńska, I., Kiraga, L., Bialasek, M. and Krol, M.** (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **69**.
- Takeichi, M.** (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* **75**, 464–474.
- Tapon, N., Harvey, K. F., Bell, D. W., Wahrer, D. C. R., Schiripo, T. A., Haber, D. A. and Hariharan, I. K.** (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* **110**, 467–478.
- Tavares, S., Vieira, A. F., Taubenberger, A. V., Araújo, M., Martins, N. P., Brás-Pereira, C., Polónia, A., Herbig, M., Barreto, C., Otto, O., et al.** (2017). Actin stress fiber organization promotes cell stiffening and proliferation of pre-invasive breast cancer cells. *Nat. Commun.* **8**.
- Thompson, B. J. and Cohen, S. M.** (2006). The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell* **126**, 767–774.
- Tipping, M. and Perrimon, N.** (2014). *Drosophila* as a model for context-dependent tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **229**, 27–33.
- Trahtenberg, U. and Mevorach, D.** (2017). Apoptotic Cells Induced Signaling for Immune Homeostasis in Macrophages and Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **8**, 1356.
- Tripathi, B. K. and Irvine, K. D.** (2022). The wing imaginal disc. *Genetics* **220**, iyac020.
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., Debruyne, F. M. and Schalken, J. A.** (1994). Decreased E-cadherin expression

- is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.* **54**, 3929–3933.
- Valon, L., Davidović, A., Levillayer, F., Villars, A., Chouly, M., Cerqueira-Campos, F. and Levayer, R.** (2021). Robustness of epithelial sealing is an emerging property of local ERK feedback driven by cell elimination. *Dev. Cell* **56**, undefined-undefined.
- Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M.** (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440–442.
- Vennin, C., Chin, V. T., Warren, S. C., Lucas, M. C., Herrmann, D., Magenau, A., Melenc, P., Walters, S. N., Del Monte-Nieto, G., Conway, J. R. W., et al.** (2017). Transient tissue priming via ROCK inhibition uncouples pancreatic cancer progression, sensitivity to chemotherapy, and metastasis. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaai8504.
- Vogler, M., Walter, H. S. and Dyer, M. J. S.** (2017). Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies – from pathogenesis to treatment. *Br. J. Haematol.* **178**, 364–379.
- Voiculescu, O., Bodenstein, L., Lau, I.-J. and Stern, C. D.** (2014). Local cell interactions and self-amplifying individual cell ingression drive amniote gastrulation. *eLife* **3**, e01817.
- Vousden, K. H. and Lane, D. P.** (2007). p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 275–283.
- Waghmare, I. and Kango-Singh, M.** (2016). Loss of cell adhesion increases tumorigenic potential of polarity deficient scribble mutant cells. *PLoS ONE* **11**, 1–18.
- Warner, S. J., Yashiro, H. and Longmore, G. D.** (2010). The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. *Curr. Biol. CB* **20**, 677–686.
- Wei, S. C., Fattet, L., Tsai, J. H., Guo, Y., Pai, V. H., Majeski, H. E., Chen, A. C., Sah, R. L., Taylor, S. S., Engler, A. J., et al.** (2015a). Matrix stiffness drives epithelial – mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1 – G3BP2 mechanotransduction pathway. **17**,.
- Weng, M. and Wieschaus, E.** (2016). Myosin-dependent remodeling of adherens junctions protects junctions from Snail-dependent disassembly. *J. Cell Biol.* **212**, 219–229.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677–683.
- Winklbauer, R. and Müller, H.-A. J.** (2011). Mesoderm layer formation in *Xenopus* and *Drosophila* gastrulation. *Phys. Biol.* **8**, 045001.
- Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E. and Smith, J.** (1998). Principles Of Development.
- Wong, S. Y., Ulrich, T. A., Deleyrolle, L. P., MacKay, J. L., Lin, J.-M. G., Martuscello, R. T., Jundi, M. A., Reynolds, B. A. and Kumar, S.** (2015). Constitutive activation of

- myosin-dependent contractility sensitizes glioma tumor-initiating cells to mechanical inputs and reduces tissue invasion. *Cancer Res.* **75**, 1113–1122.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J. and Pan, D.** (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **114**, 445–456.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T.** (2010). Interaction between RasV12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* **463**, 545–548.
- Wu, P. H., Gambhir, S. S., Hale, C. M., Chen, W. C., Wirtz, D. and Smith, B. R.** (2020). Particle tracking microrheology of cancer cells in living subjects. *Mater. Today* **39**, 98–109.
- Yaacoub, K., Pedeux, R., Tarte, K. and Guillaudeux, T.** (2016). Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Lett.* **378**, 150–159.
- Yagi, R., Mayer, F. and Basler, K.** (2010). Refined LexA transactivators and their use in combination with the Drosophila Gal4 system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16166–16171.
- Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yosida, H. and Miura, M.** (2011). Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J. Cell Biol.* **195**, 1047–1060.
- Yamanaka, T. and Ohno, S.** (2008). Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front. Biosci.* **13**, 6693–6707.
- Yang, S.-A., Portilla, J.-M., Mihailovic, S., Huang, Y.-C. and Deng, W.-M.** (2019). Oncogenic Notch Triggers Neoplastic Tumorigenesis in a Transition-Zone-like Tissue Microenvironment. *Dev. Cell* **49**, 461-472.e5.
- Yao, M., Qiu, W., Liu, R., Efremov, A. K., Cong, P., Seddiki, R., Payre, M., Lim, C. T., Ladoux, B., Mège, R.-M., et al.** (2014). Force-dependent conformational switch of  $\alpha$ -catenin controls vinculin binding. *Nat. Commun.* **5**, 4525.
- Yap, A. S., Duszyc, K. and Viasnoff, V.** (2018). Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell–Cell Junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028761.
- Yarden, Y. and Ullrich, A.** (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 443–478.
- Yu, Y., Xiao, C.-H., Tan, L.-D., Wang, Q.-S., Li, X.-Q. and Feng, Y.-M.** (2014). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *Br. J. Cancer* **110**, 724–732.
- Yunis, J. J., Mayer, M. G., Arnesen, M. A., Aeppli, D. P., Oken, M. M. and Frizzera, G.** (1989). bcl-2 and Other Genomic Alterations in the Prognosis of Large-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1047–1054.

- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. and Weidong, C.** (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* **877**, 173090.
- Yurchenco, P. D.** (2011). Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004911.
- Zhan, L., Rosenberg, A., Bergami, K. C., Yu, M., Xuan, Z., Jaffe, A. B., Allred, C. and Muthuswamy, S. K.** (2008). Deregulation of Scribble Promotes Mammary Tumorigenesis and Reveals a Role for Cell Polarity in Carcinoma. *Cell* **135**, 865–878.
- Zhang, G., Long, M., Wu, Z.-Z. and Yu, W.-Q.** (2002). Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* **8**, 243–246.
- Zhang, K., Grither, W. R., Van Hove, S., Biswas, H., Ponik, S. M., Eliceiri, K. W., Keely, P. J. and Longmore, G. D.** (2016). Mechanical signals regulate and activate SNAIL1 protein to control the fibrogenic response of cancer-associated fibroblasts. *J. Cell Sci.* **129**, 1989–2002.
- Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K. and Chu, Q.** (2022). Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 95.





## Control of epithelial tumor evolution by mechanical properties and cell death

Cancer is a complex pathology, most of the time characterized by a tumor that can colonize others tissues. Cancers from epithelial cells, called carcinomas, are the most common. They evolve through three increasingly aggressive steps, each having their own properties: (1) the formation of a hyperplastic tumor corresponding to an overproliferation without epithelial properties modifications, (2) the evolution in a dysplastic tumor in which cells are mesenchymal, and (3), formation of metastasis where cells leave the primary tumor, migrate and invade others tissues to form secondary tumors.

During my PhD, I was focused on a specific step of tumor progression: the hyperplasia-dysplasia transition. Dysplastic tumors are known to be more resistant to therapeutic treatments and to induce metastasis formation. Understanding how this transition is regulated is a crucial issue in the fight against cancer.

My PhD objective was to identify factors responsible for the hyperplasia-dysplasia transition by using the *Drosophila* model.

I characterized in a detailed way, with high cellular and 12 hours temporal resolution, the evolution of two genetic contexts: the inhibition of the tumor suppressor gene *Syntaxin 7* ( $Syx7^{RNAi}$ ) and the expression of the proto-oncogene *Yorkie* ( $Yki^{Sax3}$ ). Thus, I observed that  $Syx7^{RNAi}$  tumors begin by being hyperplastic and then evolve in dysplastic tumors whereas the  $Yki^{Sax3}$  tumors strictly stay hyperplastic over time.

I observed that a modification of mechanical properties, especially an increase in the tension at the level of the adherens junctions, precedes the  $Syx7^{RNAi}$  tumors' development. So, the modification of the epithelium's mechanical properties is an early marker of aggressive tumors and could have a role in the tumor's aggressiveness.

Then, I tested the role of this increased junctional tension on the tumoral progression. By using two different strategies, I showed that increasing the junctional tension in a strictly hyperplastic context is sufficient to induce an epithelio-mesenchymal transition and so the conversion into a dysplastic tumor.

By trying to identify the mechanisms by which the increase in junctional tension induces the hyperplasia-dysplasia transition, I observed that (1) the increase in junctional tension induces apoptosis in proximity to dysplastic zones and (2) apoptosis is present specifically in tumors which evolve in dysplastic ones and before the hyperplasia-dysplasia transition. Moreover, apoptosis inhibition in  $Syx7^{RNAi}$  induces a strong delay of the hyperplasia-dysplasia transition whereas apoptosis induction in the  $Yki^{Sax3}$  tumors weakens the adherens and tight junctions, most probably the first step of the transition. I also showed that, even with an accelerator role, the apoptosis is not strictly necessary for the hyperplasia-dysplasia transition because an increase in junctional tension alone leads to the tumor's evolution.

In conclusion, all of my work has shown that in *Drosophila*, adherens junctions' mechanical properties of pre-tumoral tissues have a major role in the subsequent tumoral progression by favoring the hyperplasia-dysplasia transition. I showed that this mechanism can be direct or indirect *via* apoptosis induction.

In the end, this work will help to have a better understanding of the factors responsible for the tumoral progression and maybe will allow to adapt new therapeutic strategies.

## Contrôle de l'évolution des tumeurs épithéliales par les propriétés mécaniques et la mort cellulaire

Le cancer est une pathologie complexe caractérisée la plupart du temps par l'apparition d'une tumeur qui peut ensuite coloniser d'autres tissus. Les cancers issus de cellules épithéliales, appelés carcinomes, sont les cancers les plus répandus. Ils se développent au travers de trois étapes de plus en plus agressives, chacune ayant des propriétés particulières : (1) la formation d'une tumeur hyperplasique qui correspond à une surprolifération des cellules sans modifications des propriétés épithéliales, (2) l'évolution en tumeur dysplasique où les cellules deviennent mésenchymateuses, et (3) la formation de métastases où les cellules quittent la tumeur primaire, migrent et envahissent d'autres tissus et forment des tumeurs secondaires.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur une étape particulière de la progression tumorale : la transition hyperplasie-dysplasie. Les tumeurs dysplasiques sont connues pour être plus résistantes aux traitements thérapeutiques et à l'origine de la formation de métastases. Comprendre comment cette transition est régulée représente donc un enjeu crucial dans la lutte contre le cancer.

Aussi, l'objectif de ma thèse a été d'identifier des facteurs responsables de la transition hyperplasie-dysplasie en utilisant le modèle de la drosophile.

J'ai commencé par caractériser de façon détaillée au niveau cellulaire, l'évolution toutes les 12 heures de deux contextes génétiques : l'inhibition du gène suppresseur de tumeur *Syntaxine 7* ( $Syx7^{RNAi}$ ) et l'expression du proto-oncogène *Yorkie* ( $Yki^{SAX3}$ ). J'ai ainsi observé que les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  forment d'abord des tumeurs hyperplasiques puis évoluent en tumeurs dysplasiques tandis que les tumeurs  $Yki^{SAX3}$  restent strictement hyperplasiques au cours du temps.

J'ai observé qu'une modification des propriétés mécaniques, particulièrement une augmentation de tension au niveau des jonctions adhérentes, précède le développement des tumeurs  $Syx7^{RNAi}$ . Ainsi la modification des propriétés mécaniques de l'épithélium constitue un marqueur précoce de ces tumeurs agressives et pourrait jouer un rôle dans l'agressivité tumorale.

Par la suite, j'ai testé le rôle de cette augmentation de tension jonctionnelle sur la progression tumorale. En utilisant deux stratégies distinctes, j'ai ainsi pu montrer qu'augmenter la tension jonctionnelle dans un contexte strictement hyperplasique était suffisant pour induire une transition épithélio-mésenchymateuse et donc la conversion en tumeur dysplasique.

En cherchant à identifier le mécanisme par lequel l'augmentation de tension jonctionnelle induit la transition hyperplasie-dysplasie, j'ai constaté que (1) l'augmentation de tension jonctionnelle induit de l'apoptose à proximité des zones dysplasiques et (2) l'apoptose est présente spécifiquement dans les tumeurs qui évoluent en tumeurs dysplasiques et ce, avant la transition hyperplasie-dysplasie. De plus, l'inhibition d'apoptose dans les tumeurs  $Syx7^{RNAi}$  conduit à un important retard de la transition hyperplasie-dysplasie tandis que l'induction d'apoptose dans les tumeurs  $Yki^{SAX3}$  conduit à une fragilisation des jonctions adhérentes et serrées, probablement la première étape de la transition hyperplasie-dysplasie. J'ai également pu montrer que, bien qu'ayant un rôle accélérateur, l'apoptose n'est pas strictement nécessaire pour la transition hyperplasie-dysplasie puisque l'augmentation de tension jonctionnelle seule permet d'induire l'évolution de la tumeur.

Ainsi, l'ensemble de mes travaux a permis de montrer que chez la drosophile, les propriétés mécaniques des jonctions adhérentes des tissus pré-tumoraux ont un rôle majeur dans la progression tumorale ultérieure en favorisant la transition hyperplasie-dysplasie. J'ai montré que cela pouvait se faire directement ou indirectement *via* l'induction d'apoptose.

A terme, ces travaux aideront à avoir une meilleure compréhension des facteurs responsables de la progression tumorale et permettront peut-être d'adapter de nouvelles thérapies.