



Rôle de la membrane basale lors de la morphogenèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*

Julien Chlasta

► To cite this version:

Julien Chlasta. Rôle de la membrane basale lors de la morphogenèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1298 . tel-01445654

HAL Id: tel-01445654

<https://theses.hal.science/tel-01445654>

Submitted on 25 Jan 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1298

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N°340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Soutenue publiquement le 19/12/2016, par :
Julien CHLASTA

Rôle de la membrane basale lors de la morphogenèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*

Devant le jury composé de :

Crozatier-Borde Michèle DR2 – HDR Université Toulouse III – UMR5547
Couderc Jean-Louis DR – HDR Université d'Auvergne – GReD UMR6293
Valcourt Ulrich MDC-HDR Université Lyon 1 – CRCL UMR1052
Van-De-Bor Véronique CR1 Faculté des Sciences de Nice – iBV UMR7277
Traas Jan DR1 – HDR ENS Lyon – RDP
Grammont Muriel CR1 – HDR ENS Lyon – LBMC UMR5239

REMERCIEMENTS

Avant tout, je souhaiterais remercier mes deux rapporteurs, Michèle Crozatier-Borde et Jean-Louis Couderc d'avoir accepté de lire mon manuscrit, ainsi que les autres membres de mon jury qui ont accepté d'y participer.

J'aimerais remercier ma directrice de thèse, Muriel Grammont, de m'avoir suivi et encouragé tout au long de ces 3 années de travail de recherche, de m'avoir proposé ce sujet au cours duquel j'ai pu apprendre, échanger et devenir qui je suis aujourd'hui.

Je souhaiterais remercier Magali Suzanne et Florence Ruggiero d'avoir participé à mes différents comités de suivi de thèse au cours desquels nous avons pu échanger sur des aspects autant scientifiques qu'humains.

Je tiens particulièrement à remercier Pascale Milani qui a été présente tout au long de ce projet. Merci de m'avoir formé, conseillé et maintenant supporté dans notre futur avenir professionnel.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont aidé durant mon doctorat : Maggy (LJC), Jean-Luc Duteyrat (partie MEB et MET), Christophe Chamot et Élodie Chatre (membres du PLATIM), Pradeep Daas (partie MARS-ALT) ainsi que tous les membres de l'équipe de Muriel Grammont, et particulièrement Romaric Gauthier avec qui j'ai apprécié échanger et partir en congrès.

Merci à l'équipe pédagogique de génétique de l'Université de Lyon, de m'avoir donné la possibilité d'animer des TP et TDs. Je tenais particulièrement remercier Marc Lemaire, directeur du Master 2 Génétique, Biologie de la Cellule et Pathologies (GBCP), de m'avoir suivi et conseillé durant toutes ces années.

Un grand merci à mon épouse Hélène sans qui ces années de doctorat n'auraient pas été les mêmes. Merci de m'avoir soutenu et aidé dans les moments difficiles ainsi qu'encouragé à poursuivre.

Merci à mes parents de m'avoir soutenu tout au long de ces années ainsi qu'à ma belle famille pour leurs encouragements.

Une petite pensée également à mon chat Chaussette qui m'aura presque suivi tout au long de mon parcours universitaire.

AVANT-PROPOS

Les tissus épithéliaux ont pour rôle principal de maintenir l'homéostasie d'un organisme pluricellulaire. Ces tissus sont constitués de cellules épithéliales polarisées et solidement reliées en feuillets. Elles tapissent l'ensemble du corps, des cavités et des organes et reposent sur une Matrice Extra-Cellulaire (MEC) constituée d'une zone dense et organisée : la membrane basale (MB). Il existe une très grande quantité d'épithéliums qui diffèrent les uns des autres selon : la morphologie globale des cellules épithéliales ainsi que le nombre de strates de cellules du tissu. En effet, il y a des épithéliums stratifiés, des épithéliums pseudo-stratifiés et des épithéliums simples constitués d'une couche unique de cellules épithéliales. Au cours de mon doctorat, je traiterai seulement des épithéliums simples.

Les tissus épithéliaux ont un rôle de revêtement tout en assurant des échanges sélectifs et dirigés entre les différents compartiments de l'organisme. Cette caractéristique nécessite, entre autres, la présence de jonctions serrées chez les vertébrés et septées chez les invertébrés, localisées au niveau de points de contact cellule-cellule ou cellule-MB (Figure 1). L'organisation polarisée des cellules et des tissus permet de distinguer un pôle apical et un pôle basal, directement en contact avec la MB ainsi qu'un pôle basolatéral. Cette asymétrie est mise en place de façon progressive et s'accompagne d'un remodelage des membranes plasmiques (Hannezo et al., 2014). Ces changements de forme cellulaires sont étroitement couplés à la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine (Georgiou and Baum, 2010) ainsi que la mise en place du trafic vésiculaire polarisé (Van Ijzendoorn et al., 2003). Ces caractéristiques sont les ingrédients à la mise en place de la morphogenèse (« Morphê – forme » et « Génésis – origine ») ainsi qu'à l'homéostasie des organes.

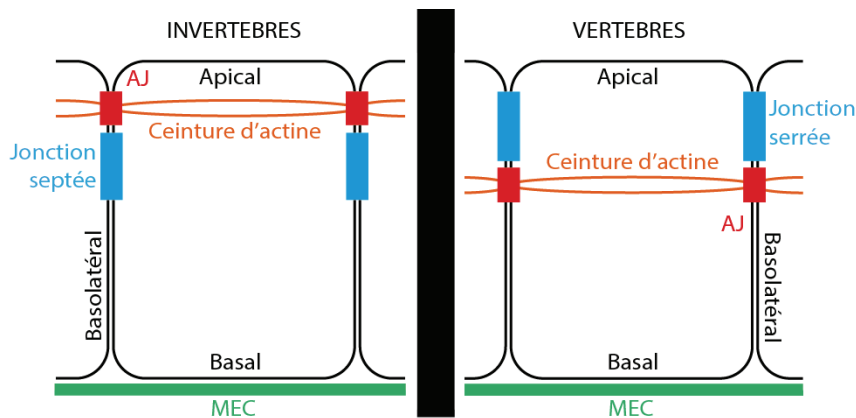


Figure 1 : Organisation spatiale de la cellule épithéliale

Les cellules épithéliales vertébrées et invertébrées forment des structures fonctionnelles latérales homologues (AJ –jonction adhérente) et analogues (Jonction serrée/septée) entre elles. Ces jonctions cellulaires sont formées de protéines transmembranaires qui s’associent à des adaptateurs cytoplasmiques connectés mécaniquement au cytosquelette d’actine.

Les processus morphogénétiques sont régulés par des facteurs, à la fois intrinsèques et extrinsèques, qui contrôlent le devenir morphologique des cellules épithéliales. Chez la *Drosophile*, la morphogenèse épithéliale du follicule ovarien représente un très bon modèle d’étude de la formation d’un organe multicouche. De nombreuses études chez cet organisme démontrent sans ambiguïté que la mise en place des patrons de développement des organes et des tissus réside en l’expression régionalisée de protéines : les morphogènes. En réponse à ces facteurs, les cellules activent des voies de signalisation contrôlant le devenir cellulaire. La plupart de ces études ne traitent pas la question de l’objet physique. En effet, les cellules sont des objets physiques et sont donc soumises aux mêmes lois de la physique que n’importe quel objet nous entourant. Ainsi la morphogenèse épithéliale est la somme des changements (physiques et moléculaires) d’une cellule, mais aussi d’un groupe collectif déformant les tissus.

« Comment les forces présentes dans une cellule se transmettent-elles au niveau tissulaire ? Quelles sont les réponses biochimiques à ces contraintes mécaniques ? »

Mes travaux de thèse portent sur le rôle mécanique et moléculaire de la MEC au cours de la morphogenèse épithéliale. Ces travaux s’inscrivent dans la thématique de l’équipe dirigée par M. Grammont, portant sur les processus moléculaires et cellulaires impliqués dans la morphogenèse épithéliale. Dans un premier temps, je présenterai une introduction sur l’ovogenèse chez la *Drosophile*, en expliquant l’organisation d’un follicule ovarien. Puis je décrirai de manière approfondie la morphogenèse épithéliale et le lien

entre les cellules épithéliales et la MB. Dans une seconde partie, j'aborderai la fonction, le rôle et la composition de la MB, à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés. Les résultats seront présentés à la fois sous la forme d'un article non publié complémenté par la description de données métriques sur la morphogenèse ainsi que d'un article publié. Enfin, je discuterai de mes travaux afin de proposer un modèle de morphogenèse intégrant au modèle connu i) des données acquises au sein de l'équipe ii) celles connues de la littérature iii) les données mécaniques de la MB et iv) les caractéristiques morphologiques des cellules du follicule ovarien.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
AVANT-PROPOS	5
TABLE DES MATIÈRES	8
TABLE DES FIGURES	11
<u>INTRODUCTION</u>	14
Partie I. L'ovogenèse chez la Drosophile.....	15
A. Généralités	15
B. L'ovogenèse	16
C. L'élongation du follicule ovarien	19
D. La morphogenèse épithéliale des CFs.....	21
1. Mise en place de cette morphogenèse.....	21
2. Les voies de signalisations contrôlant la morphogenèse des CFs	23
a) La voie Notch.....	24
b) La voie TGF β	24
c) Autres gènes et facteurs impliqués dans l'aplatissement des CFs	25
Partie II. La matrice extracellulaire.....	27
A. Généralités.....	27
B. Les principaux constituants des MBs : structures et rôles.....	29
1. Le Collagène de type IV	29
a) Généralités	29
b) La biosynthèse du Collagène de type IV	32
2. Les Laminines	33
3. Perlecan	35
4. Nidogènes	36
C. Assemblage des MBs	37

D.	Fonctions des MBs.....	38
1.	Rôle structural.....	38
2.	Rôle dans la signalisation cellulaire	40
3.	Fonctions mécaniques de la MB	43
E.	Remodelage de la MEC : les enzymes de dégradation des MBs	45
F.	Interaction entre les cellules épithéliales.....	46
1.	Les Intégrines	47
2.	Le Dystroglycan	48
Partie III. Les tissus producteurs des constituants de la MB.....		50
A.	Chez les vertébrés	50
B.	Chez la Drosophile.....	50
Partie IV. Microscope de Force Atomique (AFM) : outil de mesure des propriétés mécaniques		52
A.	Un peu d'histoire	52
B.	Principe général.....	52
C.	Le mode contact.....	54
1.	Topographie.....	54
2.	Spectroscopie.....	54
MATERIEL ET METHODES		55
RÉSULTATS		60
Partie I. Détermination des propriétés mécaniques de la MB au cours de la formation d'un organe		61
Partie II. MARS-ALT : méthode pour mesurer les valeurs métriques des cellules.....		105
A.	MARS-Alt : protocole et acquisitions multi-angles.....	106
B.	Extraction des valeurs métriques des CFs.....	108

1.	Au cours de l'ovogenèse : du stade 2 au stade 7	109
2.	Au cours de l'ovogenèse au stade 8	110
3.	Morpogenèse épithéliale au stade 9.....	111
4.	Changement de forme des CFs	113
C.	Données métriques sur la lignée germinale	114
1.	Les cellules nourricières.....	114
2.	Les cellules de bordures.....	115
D.	La dynamique de croissance et de morphogenèse folliculaire	116
Partie III. TGF β contrôle la transition des cellules cuboïdes à squameuses au stade 9		118
<u>DISCUSSION</u>		129
Partie I. Comment expliquer les différences régionales de la rigidité de la MB au cours de la morphogenèse ?		131
A.	Régulation de la rigidité par l'action des MMPs	132
B.	Quel est le rôle de l'interaction des CFs avec la MB ?	136
Partie II. Quel est le rôle de la croissance de la lignée germinale sur la rigidité de la MB ? ..		137
Partie III. Modèle de la morphogenèse des CFs au cours du stade 9		138
<u>CONCLUSION</u>		140
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		141

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation spatiale de la cellule épithéliale.....	6
Figure 2 : Le cycle de vie de la Drosophile.....	15
Figure 3 : Schéma de l'ovogenèse chez <i>Drosophila melanogaster</i>	16
Figure 4 : Formation d'une chambre d'œuf	17
Figure 5 : Morphogenèse et différenciation des CFs.....	18
Figure 6 : Élongation du follicule ovarien de Drosophile.	20
Figure 7 : Aplatissage des cellules squameuses en contexte sauvage.	22
Figure 8 : Dynamique d'aplatissage.....	23
Figure 9 : Organisation de deux grandes catégories de MEC: la membrane basale et la matrice interstitielle.	27
Figure 10 : Observation en microscopie électronique à transmission de la MB.	28
Figure 11 : Schéma des principaux constituants des MBs et de leurs interactions.....	29
Figure 12 : Structure du Collagène de type IV.....	30
Figure 13 : Organisation des deux chaînes du Collagène de type IV chez la Drosophile. ...	31
Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes de biosynthèse du Collagène de type IV sécrété par le corps gras.	33
Figure 15 : Structure de la Laminine.....	34
Figure 16 : Structure du Perlecan chez l'Homme.	36
Figure 17 : Structure du Nidogène.....	37
Figure 18 : Interactions entre les différents constituants de la MB.....	37
Figure 19 : Schéma de l'assemblage de la MB.....	38
Figure 20 : Différences régionales de l'accumulation des constituants de la MB, durant un processus de morphogenèse.....	39
Figure 21 : Fonction de la MB dans le processus de diffusion d'un morphogène.....	41
Figure 22 : Rôle de la MB dans la libération de TGFβ.....	42
Figure 23 : Principaux rôles des MBs.....	43
Figure 24 : Variation de la rigidité (Pa) des tissus.....	43
Figure 25 : Les MBs régulent le devenir des cellules souches.....	44

Figure 26 : L'organisation des Intégrines.	48
Figure 27 : Rôle du Dystroglycan.....	49
Figure 28 : Présentation du système d'expérimentation.	53
Figure 29 : Courbe de déflexion de la pointe en fonction de l'indentation.	54
Figure 30 : Le système Flp-FRT	57
Figure 31 : Le système UAS-Gal4	58
Figure 32 : Protocole d'acquisition multi-angles appliqué au follicule ovarien.....	107
Figure 33 : Valeurs métriques des CFs au cours de l'ovogenèse.....	109
Figure 34 : Mesures des valeurs métriques au stade 8	110
Figure 35 : Les CFs antérieures s'orientent en spirale et s'allongent au cours du stade 8.	110
Figure 36 : Mesure des valeurs métriques au cours de la morphogenèse épithéliale.....	112
Figure 37 : Forme des CFs selon le stade folliculaire	113
Figure 38 : Les cellules nourricières croient préférentiellement dans l'axe A/P	115
Figure 39 : Segmentation des cellules de bordures.....	116
Figure 40 : Variation du volume et de la surface basale des cellules.....	117
Figure 41 : Activité du promoteur et expression de MMP1 au cours de la morphogenèse des CFs.....	134
Figure 42 : MMP1 est requis pour la morphogenèse des CFs.	135
Figure 43 : La surexpression de TG augmente l'aplatissement des CFs.....	137
Figure 44 : Modèle de la morphogenèse des CFs.	139

ABRÉVIATIONS

MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MB : Membrane Basale
SEA : Sperm Enterokinase Agrin
SGD : Sérine-Glycine-Asparagine
FGF-2 : Fibroblast Growth Factor-2
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
FAK : Focal Adhesion Kinase
Dpp : Décapentaplégitic
Wg : Wingless
DG : Dystroglycan
TGF β : Transforming Growth Factor beta
MMP : Metalloprotéase
NC1 : Non-Collagenous domain 1
vkg : viking
mys : myspheroïd
CP : cellule polaire
CFs : Cellules Folliculaires
N : Notch
AJ : Jonction d'adhérence
GBB : Glass Bottom Boat
BMP : Bone Morphogenetic Protein
MAD : Mother Against Dpp
MED : Medea
Dad : Daughter Against Dpp
Tkv : Thickvein
Sax : Saxophone
Dlp : Dally like-protein
GP1 : Glycosyl-Phosphatidylinositol 1
JNK : Jun N-terminal Kinase

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Partie I. L'ovogenèse chez la Drosophile

A. Généralités

Chez la *Drosophile*, le cycle de vie peut être divisé en trois grands stades : le stade embryonnaire, le stade larvaire et le stade adulte (Figure 2). Nous pouvons observer de grands changements morphologiques entre ces stades, dont le plus connu est la métamorphose, permettant le passage du stade larvaire au stade adulte. Ces changements sont accompagnés de modifications morphologiques des tissus. En effet, les cellules épithéliales qui composent les tissus et organes doivent s'adapter à leur nouvel environnement (forme, localisation, fonction). Ces grands changements s'accompagnent aussi de modifications (moléculaire et physique) de la MB qui entoure les organes et les tissus.

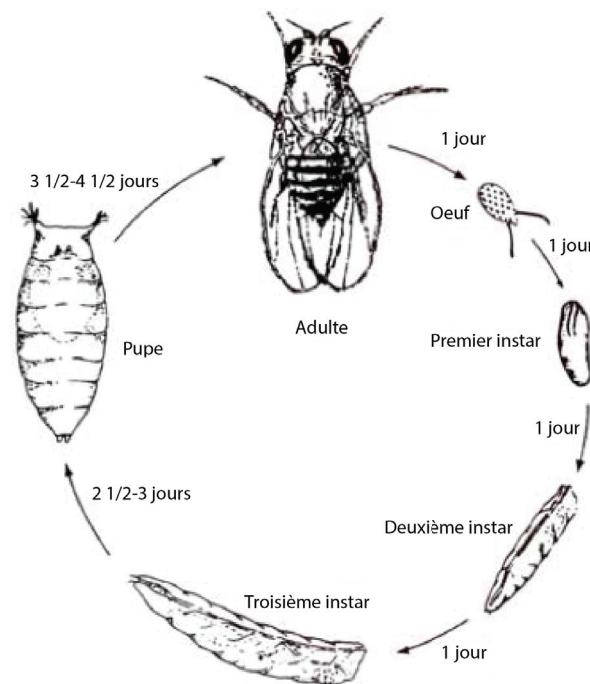


Figure 2 : Cycle de vie de la *Drosophile*.

Ce cycle se compose de 3 grandes étapes : 1- stade embryonnaire (24 h) ; 2- 3 stades larvaires (environ 5 jours à 25 °C) puis la métamorphose ou stade pupal pendant 5 à 6 jours à 25 °C ; 3- stade adulte (durée de vie d'environ 21 jours).

B. L'ovogenèse

Les deux ovaires des *Drosophiles* sont situés dans l'abdomen et sont composés de 16 à 20 ovarioles organisées en grappes (Figure 3). Les ovarioles sont des structures constituées de plusieurs unités fonctionnelles : les follicules à différents stades de leur développement (germarium au stade 12).

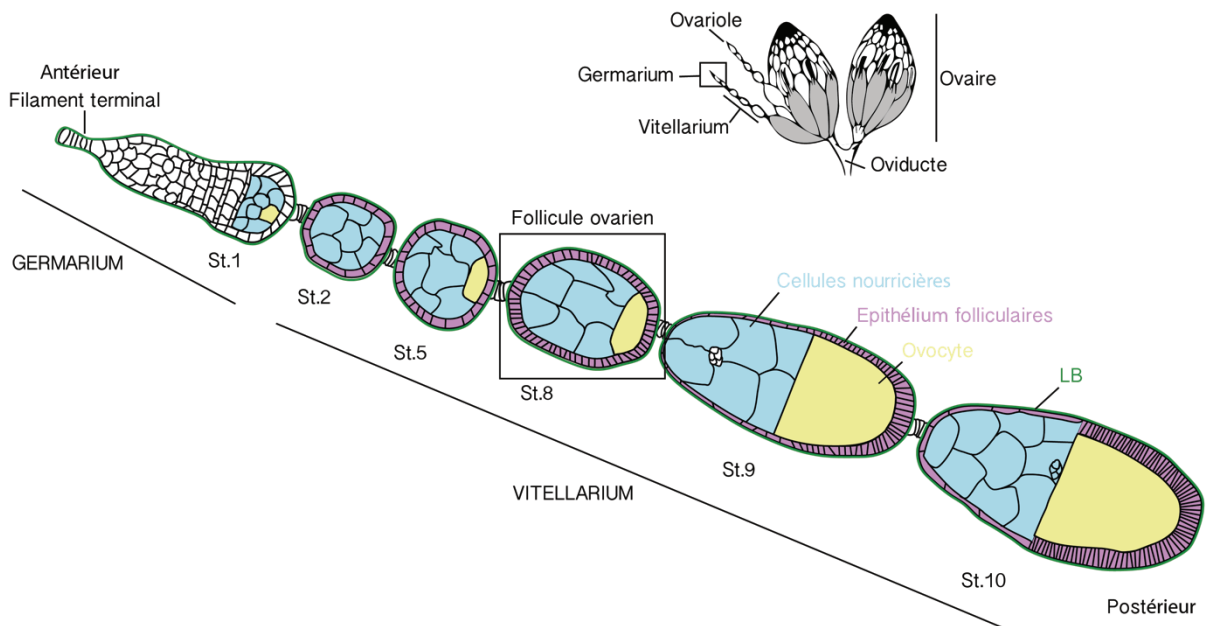


Figure 3 : Schéma de l'ovogenèse chez *Drosophila melanogaster*

Représentation d'un ovariole composé d'un germarium et d'un chapelet de follicule du stade 1 au stade 10. (D'après King et al., 1970)

Un ovariole est une structure organisée en deux parties : un germarium à l'extrémité antérieure et un vitellarium. Le germarium est une structure spécialisée contenant entre autres, les cellules souches adultes somatiques et germinales (Figure 4). Ces cellules souches sont responsables de la mise en place des différents types cellulaires nécessaires à la formation régulière et continue des follicules ovariens. Les cellules souches germinales se divisent de façon asymétrique et donnent naissance à un cystoblaste. Elles sont maintenues au contact de leur niche grâce au signal TGF β /Décapentaplegic (Dpp). Par la suite, le cystoblaste subit 4 cycles de divisions incomplètes pour produire un cyste de 16 cellules germinales interconnectées par des ponts cytoplasmiques. 15 de ces cellules seront des cellules nourricières synthétisant les ARNm et les protéines nécessaires à l'ovocyte

positionné en postérieur. Les cellules souches somatiques vont donner naissance à 3 sous-populations de cellules : les cellules interfolliculaires, 2 paires de cellules polaires (CPs) et les cellules folliculaires (CFs) recouvrant le cyste formant un épithélium polarisé et directement en contact avec la MB.

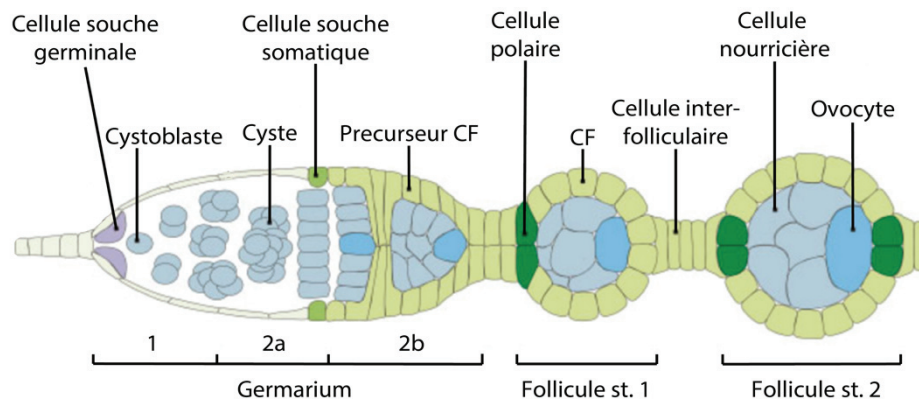


Figure 4 : Formation d'une chambre d'œuf

(D'après Horne-Badovinac and Bilder, 2005)

Lorsque le cyste quitte le germarium, il se développe dans le vitellarium. Il est composé d'un chapelet de follicules qui sont des structures multicouches que l'on peut catégoriser selon leur taille et leur localisation. Chaque follicule est entouré de sa propre MEC. Les stades les plus jeunes sont localisés dans la partie antérieure des ovarioles et sont suivis en postérieur par des stades graduellement plus âgés. L'âge approximatif des follicules peut être déterminé selon des critères morphologiques permettant de les distinguer en différents stades, de 1 à 14 (Spradling, 1993). Le stade 1 contient environ 80 CFs (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). Les CPs et les cellules interfolliculaires participent à l'orientation antéro-postérieur (A/P) du follicule et permettent de séparer les follicules les uns des autres. Au fur et à mesure que la chambre d'œuf se développe, les CFs prolifèrent jusqu'à atteindre environ 1000 cellules (Magrolis and Spradling, 1995) (Figure 5). Les divisions s'arrêtent au stade 6 de l'ovogenèse. Les CFs antérieures ont un devenir différent selon leur localisation : il y a les cellules polaires au pôle antérieur, puis les cellules de bordures (CB), entourées des cellules squameuses. Entre les cellules squameuses et les cellules postérieures, il y a les futures cellules centripètes. La majorité des cellules

postérieures forme un épithélium colonnaire recouvrant l'ovocyte. Au niveau postérieur, le même patron de différenciation est présent, mais le signal germinal (TGF- α Gurken, gène à effet maternel) provenant de l'ovocyte transforme les cellules en cellules postérieures. Les différentes populations de CFs peuvent être reconnues seulement aux stades 8, 9 et 10 par l'expression de gènes spécifiques.

Au stade 11 et 12, les cellules nourricières déversent leur contenu dans l'ovocyte par l'intermédiaire des ponts cytoplasmiques, ce qui provoque une augmentation brutale et drastique de la taille de l'ovocyte et une dégradation des cellules nourricières. Au stade 12, les cellules centripètes vont former le micropyle (point d'entrée du spermatozoïde) et l'opercule (point de sortie de la larve à la fin de l'embryogenèse) (Dobens and Raftery, 2000). Les CFs seront détruites par apoptose (Chao and Nagoshi, 1999) lorsque l'œuf mature sortira de l'ovaire. L'ovocyte mature mesurera environ 500 μm de long et contiendra les informations nécessaires à la mise en place des axes A/P et dorso-ventral (D/V) du futur embryon.

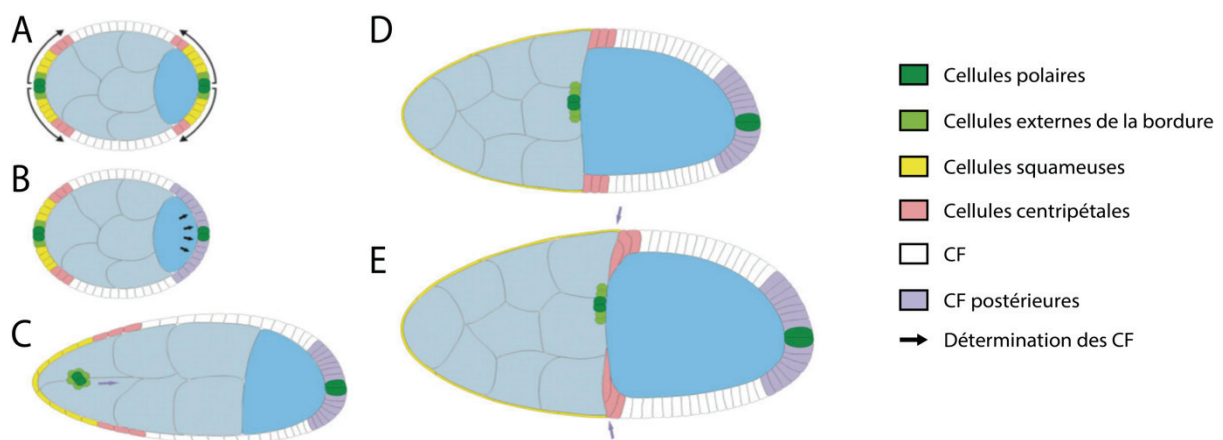


Figure 5 : Morphogenèse et différenciation des CFs

(A) Un signal provenant des CPs induit la spécification des CFs antérieures. (B) Un signal issu de l'ovocyte (TGF- α Gurken) permet aux CFs d'adopter une identité postérieure. (C) Lors du stade 9, les CFs antérieures s'aplatissent en direction du pôle postérieur et au même moment, le groupe de CB migre au travers du tissu nourricier en direction de l'ovocyte. (D) Au stade 10a, la morphogenèse des CFs est terminée, les cellules squameuses entourent les cellules nourricières et les cellules en colonne entourent l'ovocyte. (E) Au stade 10 b, les cellules centripétales migrent entre les cellules nourricières et l'ovocyte pour clôturer la partie antérieure de l'ovocyte. (D'après Horne-Badovinac and Bilder, 2005)

C. L'élongation du follicule ovarien

Le développement de la chambre d'œuf est sûrement un excellent exemple de la compréhension des processus conduisant à la morphogenèse épithéliale. En effet, il allie élongation, rotation, changement de structure de la MB et d'activité des cellules (Horne-Badovinac, 2014). Initialement petites et sphériques, les chambres d'œuf passent par 14 stades morphologiques distincts au cours desquels elles se développent et leur volume final est environ 1000 fois supérieur au volume initial (King, 1970). Entre les stades 5 et 10, la croissance est anisotrope le long de l'axe A/P, donnant une forme elliptique au follicule (Figure 6). Au cours de ce développement, la MB a été analysée, et des changements dans son organisation ont été révélés coïncidant avec le début de l'élongation de la chambre d'œuf (Haigo and Bilder, 2011).

Au début du stade 5, les constituants des MBs commencent à être incorporés, sous forme d'agrégats et de fibres non structurées : Collagène de type IV, Laminine et Perlecan (Cetera et al., 2014 ; Gutzeit et al, 1991 ; Haigo and Bilder, 2011 ; Schneider et al., 2006). Ces fibres vont toutes s'aligner perpendiculairement à l'axe A/P et former une MB polarisée et fonctionnelle. En parallèle, le réseau d'actine des CFs s'oriente dans le même sens que les fibres des MBs par l'intermédiaire des Intégrines (Bateman et al, 2001 ; Delon and Brown, 2009 ; Gutzeit, 1990). Ainsi, les fibres de la MB et le réseau d'actine vont agir comme un corset moléculaire limitant la croissance de la chambre d'œuf de façon anisotrope (Gutzeit et al, 1991 ; Wang et al., 2010). Cette hypothèse d'allongement anisotrope est étayée par des observations perturbant la composition des MBs, des Intégrines et des CFs formant des œufs ronds (Bateman et al., 2001 ; Cetera et al., 2014 ; Frydman and Spradling, 2001 ; Gutzeit et al., 1991 ; Haigo and Bilder, 2011 ; Horne-Badovinac et al., 2012 ; Lewellyn et al., 2013 ; Viktorina et al., 2009).

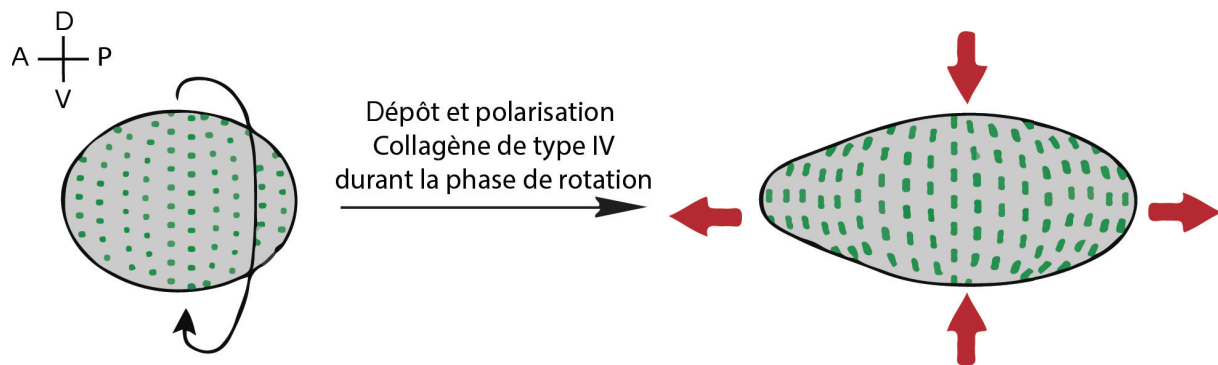


Figure 6 : Élongation du follicule ovarien de *Drosophile*.

L'élongation du follicule permet le dépôt et l'orientation des molécules de Collagène de type IV dans la MEC. Les molécules de Collagène de type IV s'orientent perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur. A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral. (Adapté de Morrissey et al., 2015)

De plus, La formation du corset moléculaire dépend également d'un mouvement de rotation de la chambre d'œuf. Entre les stades 1 à 8, les surfaces basales des CFs se déforment et migrent perpendiculairement à l'axe A/P (Cetera et al., 2014 ; Haigo and Bilder, 2011), alors que leurs surfaces apicales restent physiquement attachées aux cellules de la lignée germinale, ce mouvement collectif dans un même sens, provoque la rotation de la chambre d'œuf à l'intérieur du corset de MB qui reste stationnaire tout au long de la rotation. Un défaut de migration perturbe la polarisation du réseau d'actine avec la MB empêchant l'allongement de la chambre d'œuf (Cetera et al., 2014 ; Haigo and Bilder, 2011 ; Lerner et al., 2013 ; Viktorinova and Dahmann, 2013). Entre les stades 5 à 8, les niveaux du Collagène de type IV ainsi que la vitesse de migration des CFs sont augmentés dans la MB (Haigo and Bilder, 2011).

En plus de la polarisation des constituants des MBs, d'autres changements structuraux contribuent également à la fonction de corset moléculaire : l'augmentation de l'incorporation du Collagène de type IV entre les stades 5 et 8 (Haigo and Bilder, 2011) et la réticulation du Collagène de type IV (McCall et al., 2014). La MB influe également sur l'orientation du réseau d'actine présent aux pôles basaux des CFs au cours de l'élongation. Bien que la rotation cesse au stade 8, le maintien de cet alignement est conservé au stade 9. A ce stade, nous observons une contraction périodique du réseau d'acto-myosine contribuant à l'allongement de la chambre d'œuf (He et al., 2010). Ainsi, l'interaction avec la MB influe également sur l'activité contractile des CFs. Une diminution de la protéine

d'adhésion Taline diminue la contraction du réseau d'acto-myosine, alors que la surexpression de Paxiline augmente la période de contraction (He et al., 2010). De façon surprenante, le traitement des chambres d'œuf avec de la collagénase, prolonge la période de contraction du réseau d'acto-myosine (Koride et al., 2014). Ainsi, les contractions de la myosine sont par conséquent sensibles aux interactions avec la MB par l'intermédiaire des Intégrines par exemple.

Une fois que la croissance et l'allongement sont terminés, la MB joue un rôle important dans le maintien de la forme elliptique de la chambre d'œuf. Au stade 13, lorsque les chambres d'œuf sont traitées avec de la collagénase, pour perturber le réseau de la MB, elles deviennent rondes, avec une diminution de l'axe A/P et une augmentation de l'axe D/V (Haigo and Bilder, 2011). Ces résultats montrent que la MB est nécessaire afin de soutenir la morphogenèse de la chambre d'œuf, permettant ainsi son développement au cours de l'ovogenèse.

Il existe un mécanisme semblable chez les vertébrés. En effet, trois études récentes réalisées *in vitro* indiquent qu'un mouvement de rotation est nécessaire à la morphogenèse correcte de l'épithélium de l'acinus de la glande mammaire (Tanner 2012, Wang et al., 2013). De plus, cette rotation est directement liée à l'assemblage des MBs. En effet, quand les acini sont incapables de tourner, ils ne peuvent pas organiser une MB de Laminine exogène. À l'inverse, si on détruit la MB présente autour des acini matures qui ont cessé de tourner, ils recommencent leur mouvement de rotation et peuvent réassembler une matrice de Laminine (Wang et al., 2013). Ces études suggèrent que les phénomènes de rotation épithéliale pourraient représenter un mécanisme conservé de réorganisation de la MEC nécessaire pour la morphogenèse correcte des tissus.

D. La morphogenèse épithéliale des CFs

1. Mise en place de cette morphogenèse

À partir du stade 9 de l'ovogenèse, chaque sous-population de cellules épithéliales change de forme ou démarre un processus migratoire. Les cellules squameuses

s'aplatissent autour des cellules nourricières et les cellules postérieures changent de formes au contact de l'ovocyte. Les cellules de bordure quittent l'épithélium folliculaire et migrent entre les cellules nourricières pour rejoindre le pôle antérieur de l'ovocyte. Au stade 10B, les CFs à proximité de la frontière entre l'ovocyte et les cellules nourricières, les cellules centripètes, migrent entre ces deux compartiments pour rejoindre les CBs clôturant ainsi l'ovocyte (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). La migration des CBs est un modèle d'étude de migration cellulaire et est un processus très bien détaillé aujourd'hui. Au contraire, l'aplatissement des cellules squameuses, la migration des cellules centripètes et la différenciation en cellules postérieures sont des processus très mal définis et les gènes impliqués sont pratiquement tous inconnus.

Dans un follicule sauvage, le changement de forme des futures cellules squameuses s'effectue progressivement du pôle antérieur vers le pôle postérieur, de manière coordonnée au cours du stade 9 : le rang de cellules le plus antérieur commence à s'aplatir, puis le rang suivant et ainsi de suite jusqu'au quatrième rang inclus (Figure 7). En général, on compte une cinquantaine de cellules squameuses. Au stade 10A, ces cellules recouvrent la moitié antérieure du follicule alors que l'autre moitié est recouverte par 850 à 950 cellules en colonnes.

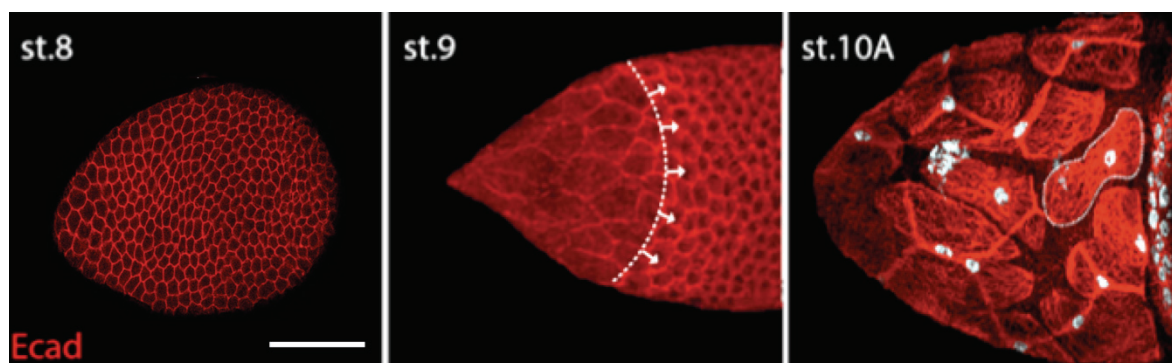


Figure 7 : Aplatissement des cellules squameuses en contexte sauvage.

Au st. 8 les CFs sont cuboïdes et commencent à s'aplatir au st. 9 du pôle antérieur jusqu'à la moitié du follicule. Au stade 10a, 3 à 4 rangs de cellules dans l'axe A/P sont nécessaires afin de recouvrir les cellules nourricières. À ce stade, le volume de l'ovocyte est identique au volume des cellules nourricières (Echelle : 20 μ m).

Les cellules squameuses s'allongent préférentiellement dans l'axe antéro-postérieur (A-P) que dans l'axe médio-latéral (M-L) (Grammont, 2007 ; Kolahi et al., 2009). Dans un

follicule sauvage, on observe que ce remodelage se produit de manière stéréotypée (Figure 8) :

- Les jonctions d'adhérence situées au point de contact entre plusieurs cellules (vertices) du rang n et du rang $n+1$ se désassemblent en premier ;
- Les jonctions situées entre deux cellules adjacentes et qui sont perpendiculaires à l'axe A-P se désassemblent ;
- Les jonctions situées entre deux cellules adjacentes et qui sont parallèles à l'axe A-P s'allongent.

Cette dynamique se poursuit entre les cellules du rang $n+1$ et $n+2$. Les autres CFs deviennent des cellules en colonne et entourent l'ovocyte en croissance. À la fin de l'aplatissement, les jonctions parallèles à l'axe A-P se désassemblent également. Le maintien temporaire de ces jonctions pendant le processus morphogénétique pourrait expliquer, au moins en partie, pourquoi les cellules s'allongent plus selon l'axe A-P que selon l'axe M-L.

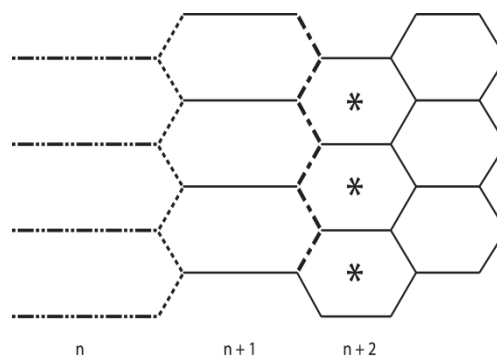


Figure 8 : Dynamique d'aplatissement

Représentation schématique du désassemblage des AJ dans les cellules squameuses. Les jonctions situées aux vertices des cellules plus antérieures sont désassemblées ainsi que les jonctions M-L

2. Les voies de signalisation contrôlant la morphogenèse des CFs

Les voies Notch (N) et TGF β sont particulièrement conservées au cours de l'évolution. Elles sont fondamentales dans le développement général des organismes car elles régulent des processus de différenciation, de croissance et de division cellulaire. Par

exemple, il a été montré chez l'Homme que des mutations de la voie N conduisaient à des pathologies tumorales (Ellisen et al., 1991).

a) La voie Notch

Chez la Drosophile, la voie N est constituée par un récepteur transmembranaire (N) et deux ligands, Delta et Serrate (Six et al., 2004). La liaison du récepteur à un ligand permet le clivage de la partie intracellulaire du récepteur qui devient alors nucléaire et interagit avec la protéine Su (H) (« Suppressor of Hairless ») pour activer la transcription de gènes cibles. En absence de la partie intracellulaire de N, Su (H) est fixée à H (Hairless) et réprime la transcription de ces mêmes gènes (Grammont, 2007).

La voie de signalisation N contrôle l'aplatissement des CFs en agissant sur la localisation de la Myosine II non-musculaire (Zipper (Zip) et Spaghetti squash (Sqh)) au cours du remodelage des JAs (Grammont, 2007).

b) La voie TGF β

La voie TGF β est une voie répondant aux facteurs de croissance de la famille des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). Chez la Drosophile, les ligands Dpp (Decapentaplegic) et GBB (Glass Bottom Boat) se fixent au récepteur TGF β constitué par les protéines Punt, Tkv (Thickvein) et Sax (Saxophone). Cette liaison permet la phosphorylation de la protéine MAD (Mothe Against Dpp) qui devient libre dans le cytoplasme. MAD phosphorylée interagit avec la protéine MED (Medea) (Miyazawa et al., 2002 ; Wharton, 1995). Ce complexe transloque dans le noyau permettant ainsi l'initiation de la transcription de gènes tels que DAD (Daughter Against Dpp) qui agit comme un régulateur négatif de la voie TGF β . Une autre protéine importante pour la régulation des cibles de la voie TGF β est la protéine Brinker, qui agit négativement sur leur expression. Des phénotypes de non-aplatissement des cellules squameuses ont été observés en cas de mutation dans les gènes tkv, sax, punt, Mad et Medea. Dans ce contexte, les cellules squameuses remodelent leurs jonctions d'adhérence plus tardivement et/ou moins rapidement que les cellules sauvages et sont en moyenne plus petites (surface apicale) que

les cellules sauvages au stade 10 (Guichet et al., 2001 ; Muzzopappa and Wappner, 2005 ; Twombly et al., 1996). À l'inverse, des phénotypes opposés ont été obtenus dans des cellules réprimant le gène *dad* ou dans les clones de cellules surexprimant une forme constitutivement active du récepteur Tkv, indiquant que l'activation prématurée de la voie TGFβ est suffisante pour induire la morphogenèse. Il a été également montré que l'accumulation de deux composants de la myosine II non musculaire, Zip et Sqh, aux JAs en cours de remodelage était retardée dans les cellules squameuses mutantes pour la voie TGFβ (Grammont, 2007). En parallèle, la formation des filaments d'actine et l'orientation du réseau de microtubules sont affectées. L'ensemble des effecteurs cellulaires impliqués dans la morphogenèse des CFs est donc contrôlé par la voie TGFβ.

c) Autres gènes et facteurs impliqués dans l'aplatissement des CFs

En plus des voies N et TGFβ, deux gènes ont été identifiés comme acteurs de la morphogenèse épithéliale : *hindsight (hind)*, codant pour un facteur de transcription, qui régule le niveau de E-cadhérine et de Armadillo (Melani et al., 2008) ainsi que le gène *tao* qui régule l'endocytose des molécules Fasciclin 2, impliqué dans la formation des jonctions latérales de type septées (Gomez et al., 2012).

En 2009, Kolahi et al., ont montré que la croissance de la lignée germinale exerçait une pression sur les CFs. Leurs analyses ont montré la présence d'une force présente dans les CFs afin de contrebalancer la pression exercée par la lignée germinale : le réseau d'acto-myosine des CFs (Wang and Riechmann, 2007). Le degré d'aplatissement des cellules squameuses ainsi que leur nombre dépendent de la croissance de la lignée germinale, démontrant que ce processus morphogénétique dépend des propriétés physiques d'un tissu interne.

L'équipe a récemment identifié un autre gène dont l'expression est uniquement retrouvée au niveau des cellules squameuses au stade 9 : le gène *Gica*. L'utilisation de deux lignées RNAi dirigées contre ce gène a montré que la diminution de transcrits produits par ce gène dans les cellules squameuses au stade 9 entraîne un retard de remodelage des JAs en régulant la myosine II, un aplatissement moindre et isotropique ainsi qu'une diminution

du nombre de cellules squameuses. Une délétion partielle et une délétion totale de ce gène ont été générées par recombinaison entre des éléments P. La délétion partielle diminue de 50 % la quantité de transcrits. La réalisation de clones somatiques mutants pour cette délétion montre que les cellules squameuses mutantes sont en moyenne plus petites que les cellules sauvages confirmant que ce gène est bien requis pour l'aplatissement des cellules squameuses. De plus, ce gène code pour une protéine contenant 15 doigts de zinc. Deux de ces doigts de zinc sont conservés au cours de l'évolution, de plus un site métalloprotéase a également été identifié, laissant sous entendre une activité dans la régulation de la MB.

Partie II. La matrice extracellulaire (MEC)

A. Généralités

Les épithéliums sont constitués de cellules qui sécrètent et s'entourent d'un maillage assurant entre autres leur cohésion, facilitant leur communication et protégeant l'organe des agressions extérieures. La MEC est le ciment permettant de maintenir cette cohésion cellulaire. Il existe différents types de MECs dont l'organisation et la composition diffèrent (Figure 9). Ces MECs sont régulées de manière spécifique selon leur localisation au sein de l'organisme. Ainsi, les MECs s'adaptent spécifiquement aux contraintes mécaniques et fonctionnelles de chaque tissu.

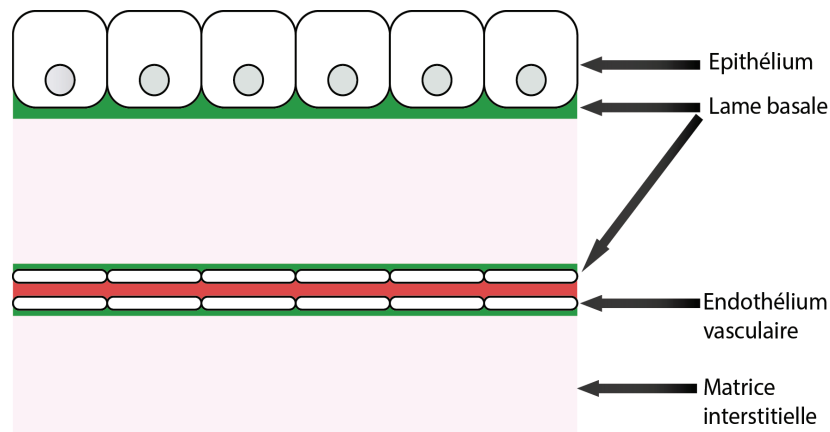


Figure 9 : Organisation de deux grandes catégories de MECs : la membrane basale et la matrice interstitielle.

Les membranes basales (MBs) sont des MECs spécialisées dans les interactions cellulaires. Il s'agit de fines couches amorphes et denses composées de molécules insolubles de grande taille. En microscopie électronique à transmission, elles présentent une épaisseur moyenne de 120 nm. Cette taille dépend de plusieurs facteurs tels que : la localisation et l'organisme étudié.

De manière systématique les MBs sont retrouvées à l'interface entre le stroma et les épithéliums/endothéliums. On retrouve des MBs aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés, leurs compositions et leurs mécanismes d'assemblage étant extrêmement bien conservés. Elles ont un rôle prépondérant dans la jonction épiderme-derme et permettent l'attachement spécifique entre différents tissus tels que les synapses neuro-musculaires et

les jonctions myo-tendineuses. Elles permettent aussi la polarisation des cellules épithéliales et des cellules gliales. Les MBs jouent un rôle crucial dans la survie des cellules épithéliales : si leur ancrage aux MBs est rompu, les cellules entrent en apoptose (Frisch and Screaton, 2001).

En microscopie électronique, les MBs apparaissent organisées en deux feuillets : une couche dense aux électrons qu'on appelle « lamina densa » qui est séparée de la surface cellulaire par une couche claire aux électrons appelée « lamina lucida » (Figure 10).

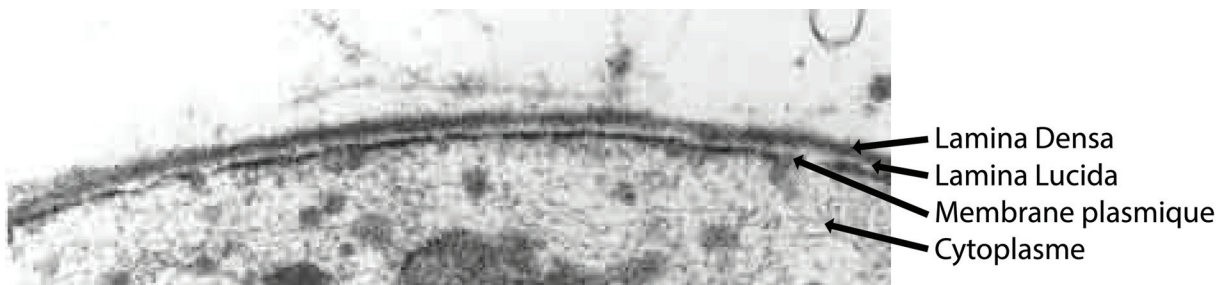


Figure 10 : Observation en microscopie électronique à transmission de la MB.

MB d'un embryon de souris au stade E10, 5. Deux régions composent la MB : la Lamina Densa et la Lamina Lucida.

Certaines techniques de fixation dénaturent cette organisation. La séparation entre ces deux couches n'est alors plus visible (Chan et al., 1993). En effet, la lamina lucida pourrait être un artéfact dû à la rétractation de la MB de la surface cellulaire en raison de la fixation chimique. Il existe certaines techniques qui permettent de visualiser l'organisation supramoléculaire des MBs (Yurchenko and Ruben, 1987 ; Ruben et al., 1994). Ces techniques ont révélé notamment la présence de deux réseaux interconnectés : un premier réseau formé par les Laminines et un deuxième formé par le Collagène de type IV. L'organisation de ce dernier ressemble à un réseau ramifié de fines fibrilles associées bout à bout ou de façon parallèle.

B. Les principaux constituants des MBs : structures et rôles

Les MBs sont principalement constituées de Collagène de type IV, de Laminines, de Perlecan (protéoglycanes à chaîne héparane sulfate) et de Nidogènes. Ces quatre principaux constituants interagissent entre eux afin de constituer des MBs fonctionnelles au pôle basal des cellules. De nombreux récepteurs cellulaires, tels que les Intégrines et le Dystroglycan peuvent interagir avec ces principaux constituants des MBs (Figure 11).

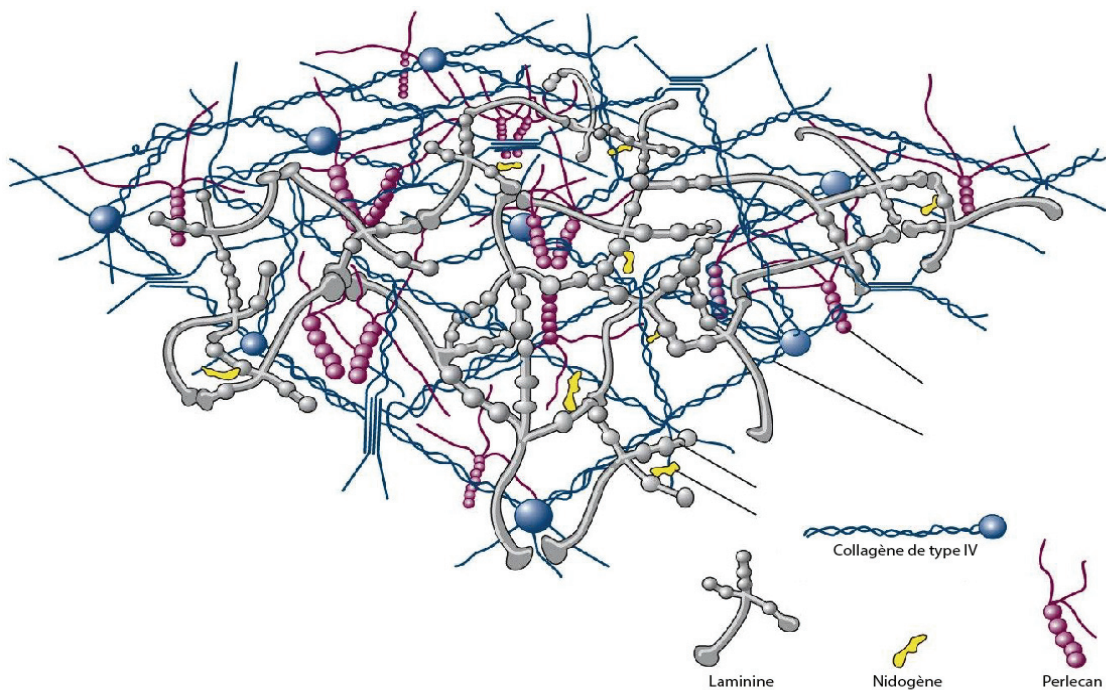


Figure 11 : Schéma des principaux constituants des MBs et de leurs interactions.

Le réseau de Collagène de type IV ainsi que celui des Laminines s'assemblent en une structure organisée via le Perlecan. Les constituants des MBs interagissent entre eux afin de former une MB fonctionnelle. (Adapté de *Molecular Cell Biology, Sixth Edition, 2008*).

1. Le Collagène de type IV

a) Généralités

Le Collagène de type IV est le constituant principal des MBs et constitue une véritable charpente, stabilisée par des liaisons covalentes, conjointement avec le réseau de Laminines sous-jacent. Il peut représenter jusqu'à plus de 50 % des constituants des MBs (Kalluri, 2003).

Chez les vertébrés, il existe 6 gènes différents codant pour le Collagène de IV. Chaque chaîne est composée d'un domaine N-terminal 7S riche en cystéines, d'un domaine triple hélice central caractérisé par des répétitions Gly-X-Y (X étant souvent la proline et Y, l'hydroxyproline) et d'un domaine C-terminal globulaire appelé NC1 (Non-Collagenous domain 1) possédant 12 cystéines (Figure 12).

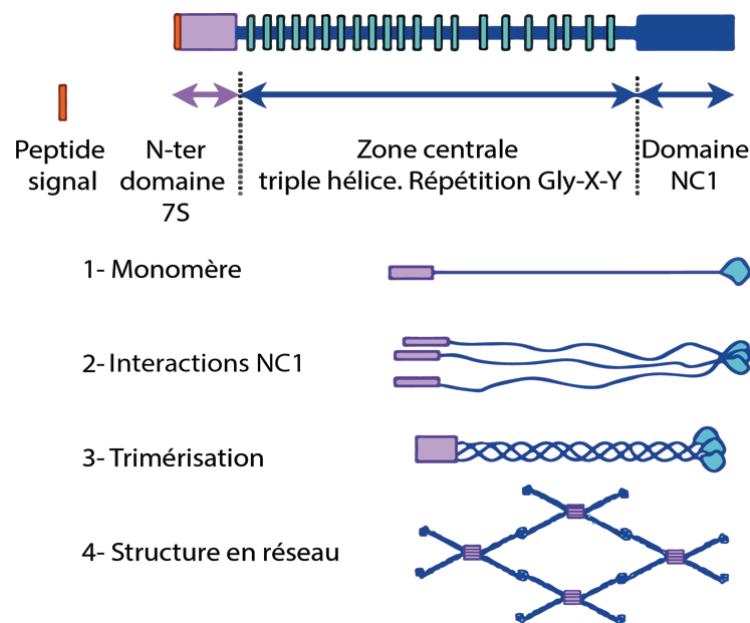


Figure 12 : Structure du Collagène de type IV. (Adapté de Ortega et al., 2002)

Les molécules de Collagène de type IV sont capables de former un réseau dense appelé structure « supramoléculaire » qui vient stabiliser les MBs (Timpl et al., 1981). La présence des cystéines, ainsi que les interactions entre les 3 domaines NC1 lors de la trimérisation des monomères de Collagène de type IV, lui confère une conformation tridimensionnelle particulière (triple hélice d'environ 400 nm de long). Cette trimérisation se poursuit par l'interaction de leurs domaines N-terminal et leur assemblage par leur domaine central pour former un réseau unique propre au Collagène de type IV.

Chez la Drosophile, il existe deux chaînes α de Collagène de type IV : $\alpha 1$ appelé CG25c (DCg1) (Blumberg et al., 1988 ; Lunstrum et al., 1988 ; Monson et al., 1982) et $\alpha 2$, Viking (vkg) (Yasothornsrikul et al., 1997) (Figure 13). Les gènes codants pour ces deux chaînes sont organisés tête-bêche. Ils sont situés sur le chromosome 2L et partagent une région régulatrice commune. Les chaînes α s'organisent en hétérotrimères : 2 chaînes $\alpha 1$ et

une chaîne $\alpha 2$. Cependant, une analyse montre que l'assemblage $\alpha 1$ et $\alpha 2$ n'est pas systématique (Fessler and Fessler, 1989). Des mutations touchant les deux ou seulement une des chaînes α du Collagène de type IV entraînent une létalité embryonnaire chez la *Drosophile*.

CG25c et Viking possèdent chacun un domaine 7S, un domaine triple hélice centrale et un domaine NC1 permettant l'association des chaînes α en trimères, tétramères et réseaux. Les domaines triples hélice centraux de CG25c et Viking sont constitués d'environ 1400 et 1500 acides aminés. Le motif Gly-X-Y leur donne une grande flexibilité et pourrait avoir un rôle dans l'assemblage supramoléculaire des triples hélices (Blumberg et al., 1988). Ce domaine central possède une vingtaine de ces répétitions du motif Gly-X-Y. La structure du Collagène de type IV est globalement bien conservée. En effet, on retrouve les 12 cystéines essentielles à la conformation tridimensionnelle et à l'association des domaines NC1 ainsi qu'une duplication des séquences à l'intérieur même des domaines NC1. Cependant, en analysant la structure des deux chaînes de Collagène de type IV, on remarque que l'organisation des domaines centraux de Viking et de CG25c n'est pas identique suggérant que ces deux chaînes pourraient remplir des fonctions biologiques différentes.

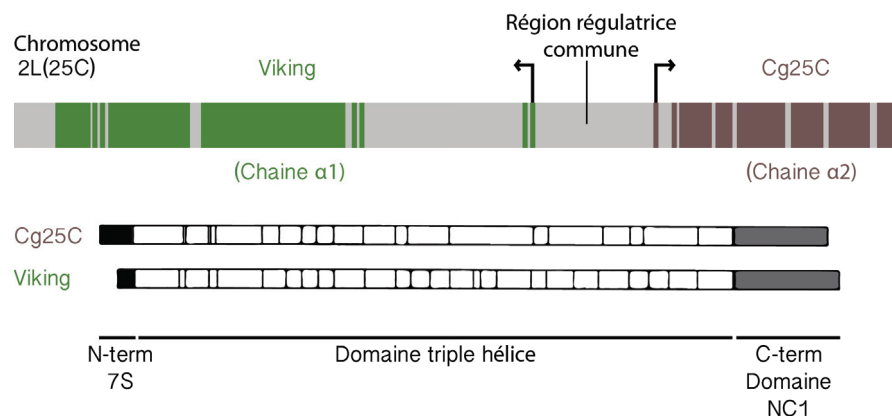


Figure 13 : Organisation des deux chaînes du Collagène de type IV chez la *Drosophile*.

Les deux gènes CG25c et Viking sont organisés tête-bêche. La région régulatrice est la même. Les deux chaînes possèdent une région 7S en N-terminal (en noir) et une région NC1 en C-terminal (en gris). Ces deux régions sont séparées par une hélice centrale avec des répétitions Gly-X-Y (traits). (Adapté de Yasothornsrikul et al., 1997)

b) La biosynthèse du Collagène de type IV

Sa biosynthèse est un processus complexe nécessitant l'intervention de nombreux partenaires protéiques et enzymatiques (Figure 14). Cette biosynthèse est finement régulée et des mutations dans les enzymes de modification du Collagène de type IV peuvent entraîner des défauts dans sa production et/ou sa sécrétion qui sont à l'origine de syndromes graves et complexes (Myllyharju and Kivirikko, 2004 ; Kuo et al., 2012).

Chez la Drosophile, les chaînes α subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique. De nombreuses protéines chaperonnes et d'enzymes participent à la trimérisation et au repliement du Collagène de type IV. La protéine disulfide isomérase (PDI) intervient dans la stabilité des domaines NC1 (Boutaud et al., 2000 ; Khoshnoodi et al., 2006). Les enzymes lysyl- et prolyl-hydroxylases (PH4 α -EFB) (Lamandé and Bateman, 1999) interviennent dans la trimérisation et la stabilité des chaînes α . Le trimère de Collagène de type IV est alors sécrété du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Cette sécrétion n'est pas effectuée par le système CopII mais plutôt par l'intermédiaire de la protéine transmembranaire Tango1 (Saito et al., 2009 ; Venditti et al., 2012 ; Wilson et al., 2011). Les cellules du corps gras et des hémocytes produisent du Collagène de type IV (Pastor-Pareja et al., 2011). Dans ces deux lieux de production, la protéine SPARC est nécessaire à l'incorporation correcte du Collagène de type IV au sein des MBs (Martinek et al., 2008). Dans les cellules épithéliales, à la suite du passage dans le Golgi, les protéines de la MB doivent être adressées spécifiquement vers le domaine basal de ces cellules. Il a été montré par plusieurs études, que l'adressage spécifique vers ce domaine ainsi que la sécrétion des constituants des MBs empruntait un mécanisme distinct de celui appliqué classiquement (Boll et al., 1991 ; Caplan et al., 1987 ; Cohen et al., 2001 ; De Almeida and Stow, 1991). Les protéines Crag et Scarface sont impliquées dans la régulation de la polarisation de la sécrétion de la MB puisque la perte de l'une ou de l'autre entraîne l'accumulation des composants basaux aux niveaux basal et apical (Denef et al., 2008 ; Eastburn and Bostov, 2010). De plus, il a été montré en 2013 que le réticulum endoplasmique, dans lequel les constituants des MBs sont synthétisés, était polarisé et orienté dans le sens du pôle basal (Lerner et al., 2013). A également été montré que la

protéine Tango1 était localisée au pôle basal. Rab10 et Crag agissent également pour orienter les vésicules de sécrétion vers le pôle basal des cellules épithéliales.

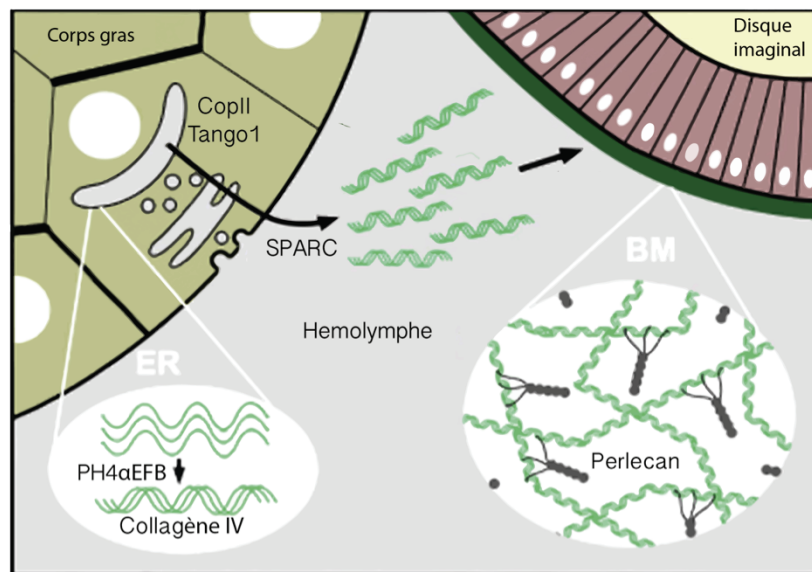


Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes de biosynthèse du Collagène de type IV sécrété par le corps gras.

Après la transcription et la traduction, les chaînes de Collagène de type IV sont exportées dans le réticulum où les lysyl- et prolyl-hydroxylases (PH4αEFB) catalysent le repliement des domaines NC1 pour permettre la trimérisation des chaînes α . Les trimères sont ensuite transportés dans le Golgi grâce à CopII/Tango1. De nombreuses glycosylations sont faites dans le réticulum endoplasmique et le Golgi. Les vésicules de sécrétion contenant le collagène de type IV sont orientées vers le pôle basal des cellules par l'action de Rab10 et de Crag. SPARC sera sécrété et permettra la bonne intégration du Collagène de type IV dans la MB. (Adapté de Pastor-Pareja et al., 2011)

2. Les Laminines

Les Laminines sont une famille de glycoprotéines extracellulaires qui participent à la formation des MBs. Elles sont caractérisées par leur organisation en hétérotrimères de chaîne α , β et γ (Figure 15). La sous-unité α est principalement impliquée dans l'adhésion aux cellules sous-jacentes et interagit principalement avec les récepteurs aux Intégrines. Les sous-unités β et γ ont un rôle structural et permettent la polymérisation du réseau ainsi que les interactions avec les Nidogènes. Chez les vertébrés, on retrouve 16 hétérotrimères de Laminine différents, qui suggère une très grande variété de structure et donc des propriétés différentes des MBs (Aumailley et al., 2005 ; Macdonald et al., 2010).

Chez la *Drosophile*, les Laminines s'assemblent également en hétérotrimères. Cependant, il existe uniquement 2 types qui diffèrent par leur chaîne α . Ces chaînes α sont codées par les gènes *Laminin A* (CG10236) et *wingblister* (CG42677) (Fessler et al., 1987 ; Martin et al., 1999), la chaîne β par le gène *LanB1* (CG7123) et la chaîne γ par le gène *Laminin B2* (CG3322).

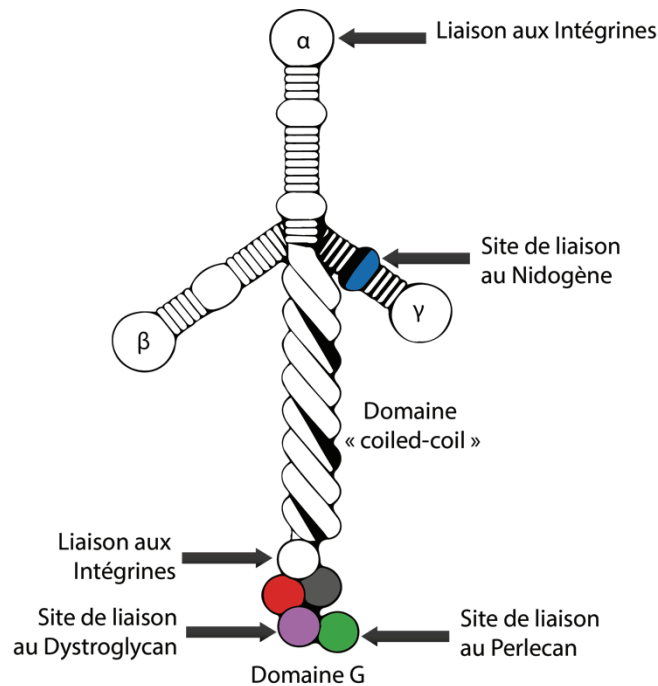


Figure 15 : Structure de la Laminine.

Assemblage des chaînes α , β et γ en trimère. Cet enroulement forme un domaine « coiled-coil ». Les sites de liaison aux Intégrines sont spécifiques de couples α , β particuliers (chez l'Humain). Le site de liaison au Nidogène est représenté en bleu, le site de liaison au Dystroglycan est représenté en violet et celui spécifique au Perlecan est en vert.

Tout comme chez les vertébrés, la Laminin A est exprimée chez la *Drosophile* en grande quantité dans les MBs de l'épiderme, des muscles, du système nerveux et des organes sensoriels (Fessler and Fessler, 1989 ; Montell and Goodman, 1989). Des mutations nulles pour la *Laminin A* entraînent une létalité lors des dernières phases de développement embryonnaire (Yarnitsky and Volk, 1995), ainsi que des problèmes dans la morphogénèse du cœur, des muscles somatiques et de l'intestin moyen. Il convient de remarquer que dans le cas de ce type de mutation, on observe un décollement des MBs des tissus sous-jacents, laissant présager un rôle central de la Laminin A dans l'organisation

des MBs. De plus, une mutation dans la sous-unité γ entraîne la perte des trimères α et β , ainsi les MBs ne sont plus formées (Urbano et al., 2009). De part leurs liaisons avec les Intégrines, les Laminines peuvent avoir un rôle dans la transmission des signaux de maintenance de la prolifération (Lin et al., 2013).

3. Perlecan

Le Perlecan est le principal protéoglycane à chaînes héparanes sulfates des MBs (Figure 16). La protéine se divise en 5 domaines identifiés par homologie de séquences avec d'autres protéines connues. Ainsi, il peut interagir avec d'autres constituants de la MEC, mais aussi avec des molécules de signalisation (Hassell et al., 1980; Hopf et al., 1999).

Chez les vertébrés, le Perlecan est organisé en domaines. Le domaine I contient un module SEA (Sperm Enterokinase Agrin), ainsi que 3 séquences Sérine-Glycine-Asparagine (SGD) présentant différents sites d'attachement de glycosaminoglycanes. Ces sites permettent la liaison du Perlecan à la Laminine et au Collagène de type IV. Ce domaine contient aussi des sites de liaison aux facteurs de croissance FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Le domaine II possède une homologie avec les récepteurs de classe A qui sont des lipoprotéines de faible densité (LA). Cette caractéristique laisse sous-entendre une liaison avec les bicouches lipidiques ou des lipides solubles. Un des rôles pour le domaine II serait de promouvoir la croissance des cellules durant le développement et surtout lors de la cicatrisation (Murdoch et al., 1992). Le domaine III est homologue aux bras courts des chaînes α des Laminines. Le domaine IV est le plus grand domaine. Il contient une longue série de répétitions de type immunoglobuline (Ig) et représente la moitié de la molécule de Perlecan. Ces sites Igs pourraient avoir un rôle dans la dimérisation du Perlecan ainsi que dans la promotion de l'adhésion cellulaire sur les MBs. Ce domaine conservé présente aussi des liaisons au Collagène de type IV ainsi qu'aux Nidogènes. Le domaine V est responsable de l'autoassemblage du Perlecan. Il contient des sites d'attachements aux glycosaminoglycanes, des sites de liaisons aux Nidogènes, une interaction avec la sous-unité β des Intégrines ainsi qu'avec le Dystroglycan.

Chez la *Drosophile*, seul le domaine I n'est pas présent.

Ainsi, le Perlecan peut se lier à différents acteurs moléculaires des MBs, participant ainsi à l'architecture du maillage, au maintien et à la transmission de signaux primordiaux à la cohésion des cellules sous-jacentes.

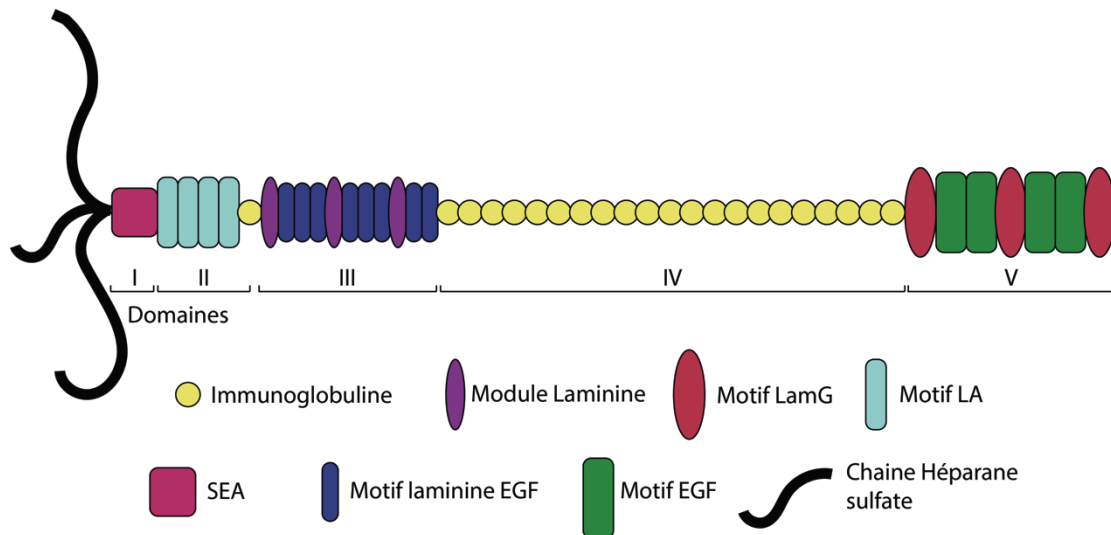


Figure 16 : Structure du Perlecan chez l'Homme.

4. Nidogènes

Les Nidogènes 1 et 2 sont des composants principaux de toutes les MBs (Carlin et al., 1981 ; Paulsson et al., 1986 ; Tmpl et al., 1983) (Figure 17). Ils sont formés de 3 grands domaines glomérulaires (G1-3). L'hélice α contient les 6 domaines EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi que le domaine de type Tyroglobuline (TY). Les domaines G2 et G3 contiennent un site de liaison au Collagène de type IV. Le domaine G2 possède en plus, un site de liaison au Perlecan et le domaine G3, un site de liaison aux Laminines.

Les Nidogènes 1 et 2 interviennent dans l'adhésion cellulaire (Chakravarti et al., 1990), participent au chimiotactisme des neutrophiles (Senior et al., 1992), sont impliqués dans la croissance de la couche superficielle du placenta (Yelian et al., 1993) et jouent un rôle dans l'angiogenèse (Nicosia et al., 1994). Chez la souris, des mutants pour le Nidogène présentent une létalité embryonnaire relativement tardive suggérant une implication dans la stabilisation des MBs lors de l'apparition de stress mécaniques (Willem et al., 2002 ; Bader et al., 2005 ; Böse et al., 2006).

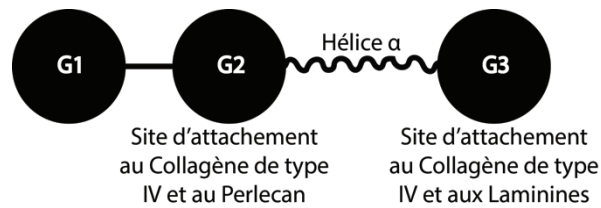


Figure 17 : Structure du Nidogène.

C. Assemblage des MBs

L'assemblage des MBs est un enchaînement de plusieurs étapes. Il s'agit principalement d'un autoassemblage des différents constituants des MBs : Collagène de type IV, Perlecan, Laminines et Nidogènes (Kalluri, 2003) (Figure 18).

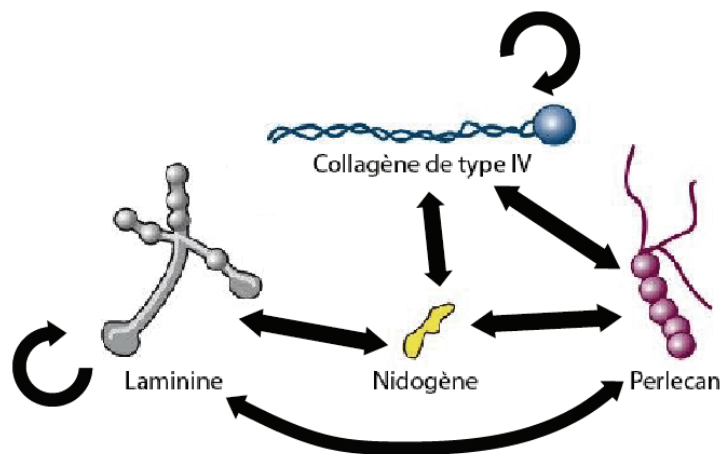


Figure 18 : Interactions entre les différents constituants de la MB.

Le Collagène de type IV ainsi que les Laminines s'autoassemblent. La liaison entre les deux réseaux de Collagène de type IV et de Laminines est permise via les Nidogènes et le Perlecan.

Les cellules synthétisant les constituants des MBs, les assemblent en unités fonctionnelles (protomères pour le Collagène de type IV et trimères pour les Laminines) puis les sécrètent dans le compartiment extracellulaire (Figure 19). Les Laminines se regroupent ensuite via un processus d'autoassemblage pour former un réseau polymérisé constituant les « fondations » des MBs. Les Laminines, par l'intermédiaire de leur domaine de liaisons aux Intégrines et Dystroglycan, pourront ancrer le réseau néoformé au pôle basal des cellules (Smyth et al., 1998 ; Li et al., 2002 ; Li et al., 2005 ; McKee et al., 2007 ; McKee et al., 2009). Cet ancrage initial permet ensuite un regroupement des autres constituants des MBs au pôle basal des cellules (en l'absence de Laminine, il ne semble pas

y avoir suffisamment d'accumulation de constituants pour un assemblage correct des MBs). Ainsi, ce signal permettra au second réseau, formé de Collagène de type IV, de s'organiser et de s'associer au réseau existant. Le Nidogène va ensuite faire le lien en formant des ponts entre ces deux réseaux, stabilisant et renforçant la structure des MBs.

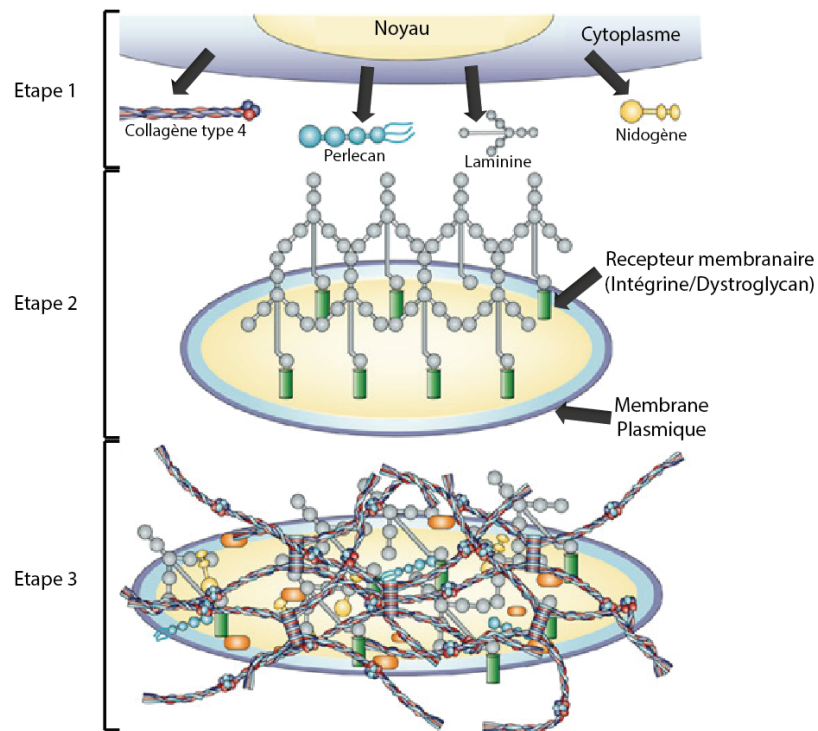


Figure 19 : Schéma de l'assemblage de la MB.

Étape 1 : production et sécrétion des constituants de la MB par le pôle basal des cellules. Étape 2 : fixation de la Laminine aux récepteurs membranaires. Étape 3 : formation de la MB avec l'assemblage des autres constituants. (Adapté de Kalluri R., 2003)

D. Fonctions des MBs

1. Rôle structural

Les MBs sont les fondations des tissus et des organes. Elles maintiennent l'intégrité de l'unité fonctionnelle des tissus. Elles vont orienter la morphogenèse, protéger les cellules et sculpter les tissus épithéliaux en agissant comme un corset moléculaire. Ainsi, les caractéristiques physiques des MBs telles que leur rigidité ou leur organisation sont essentielles à leur rôle de support physique. Des changements dans l'organisation de leur

structure pourront ou non restreindre l'expansion épithéliale. Plusieurs études menées sur la glande salivaire de souris, ont montré que les fibres de Collagène de type IV s'accumulent préférentiellement au niveau des sillons de ramification alors qu'elles sont quasiment absentes au niveau des bourgeons en croissance (Grobstein et al., 1965 ; Nakanishi et al., 1988) (Figure 20). De plus, l'accumulation locale de certains facteurs spécifiques des MBs pourra jouer sur la densité ou sur l'épaisseur de ces dernières, favorisant ainsi la stabilité ou la formation de ramifications sous pression des cellules ou fluides (sang) sous-jacents.

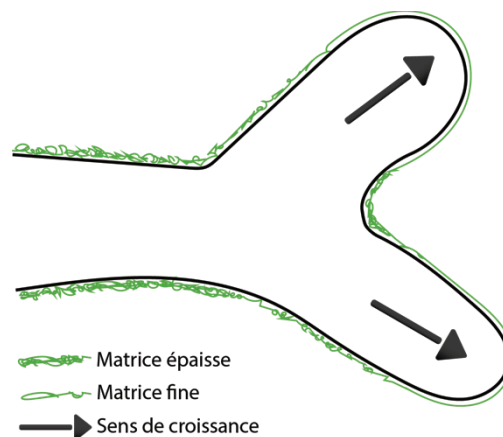


Figure 20 : Différences régionales de l'accumulation des constituants de la MB, durant un processus de morphogénèse.

Les constituants de la MB sont déposés de manière hétérogène directement par les cellules épithéliales. Cette variation dans le dépôt des constituants de la matrice « guide » le sens de l'extension tissulaire (flèche noire). (Adapté de Daley et Yamada, 2013)

Cette accumulation au niveau des bourgeons semble être importante puisqu'un traitement à la Collagénase stoppe de manière significative la morphogénèse de ces ramifications, entraînant ainsi une régression du tissu (Daley et Yamada, 2013). Ainsi, le réarrangement de l'architecture des MBs peut, dans certaines conditions, favoriser ou défavoriser la morphogénèse. De plus, ces MBs ont un véritable rôle d'ancrage des cellules et jouent également un rôle crucial dans les processus de migration cellulaire. En effet, elles peuvent stimuler ou inhiber ces migrations selon l'environnement extérieur.

2. Rôle dans la signalisation cellulaire

Les MBs interviennent de manière active dans la régulation de certaines voies de signalisation, suggérant un rôle de l'interaction cellules-MBs. Elles présentent de nombreuses glycosylations leur permettant de lier une très grande variété de molécules de signalisation. Ainsi, les MBs peuvent influencer sur la polarité cellulaire, en agissant directement sur les récepteurs transmembranaires (intégrines et dystroglycan). En effet, la perte d'interactions entre les cellules et les MBs entraînent une perte de la polarité cellulaire.

Les MBs sont également à l'origine de molécules actives, les Matrikines, qui peuvent influencer directement sur la signalisation cellulaire. Les matrikines sont le plus souvent de petits peptides qui sont formés par protéolyse de protéines ou de glycoprotéines, fibrillaires (comme les collagènes) ou non (comme la fibronectine ou les protéoglycanes). Les enzymes responsables de ces protéolyses sont généralement des métalloprotéinases matricielles (matrix-métalloprotéinases MMP). Les matrikines exercent des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur les fonctions ou le développement des cellules du voisinage (effets paracrines) (Maquart et al., 2005).

De nombreuses études, notamment chez la Drosophile, ont mis en évidence un rôle des MBs dans le contrôle du gradient de morphogène. En effet, la diffusion des morphogènes ne peut pas être attribuée à de la simple diffusion. Chez la Drosophile, on retrouve les morphogènes suivants : Hedgehog, Wnt (Wingless, wg) ou BMP (Décapentaplégitic, Dpp) (Hynes, 2009 ; Rozario and DeSimone, 2010). La fixation des morphogènes aux protéoglycanes des MBs restreint leur diffusion à la surface des cellules receveuses et évite ainsi leur échappement dans le milieu extracellulaire ou leur expression anormale sur d'autres types cellulaires (Callejo et al., 2006 ; Gallet et al., 2006) (Figure 21).

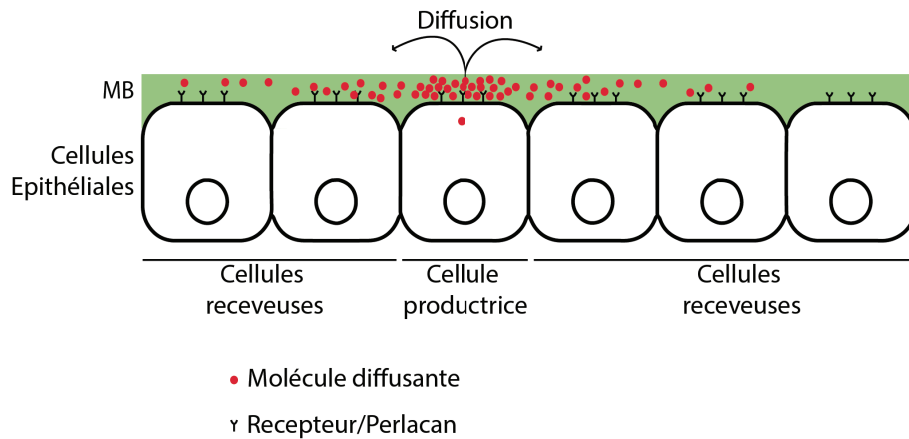


Figure 21 : Fonction de la MB dans le processus de diffusion d'un morphogène.

La cellule produit un morphogène qui sera sécrété par le pôle basal dans la MB. La MB joue un rôle dans le maintien du morphogène, évitant sa diffusion au-delà de son champ d'action.

Le morphogène Dpp semble également diffuser selon le modèle de diffusion restreint. Deux protéoglycanes, Dally et Dlp, jouent un rôle dans la diffusion de Dpp (Bellenkaya et al., 2004). Des études récentes indiquent que Dally permet de stabiliser Dpp à la surface cellulaire limitant la diffusion massive de Dpp. Le Collagène de type IV peut lier directement Dpp et donc restreindre sa diffusion dans l'embryon de *Drosophila* (Sawala et al., 2012, Wang et al., 2008). De plus, cette séquestration locale permettrait d'orienter la morphogénèse vers le pôle antérieur de l'embryon (Bunt et al., 2010).

Les MBs peuvent participer à la maturation de ligands tels que TGF β (Transforming Growth Factor beta), ce ligand se retrouve stocké dans ces MBs. Ainsi, le clivage protéolytique des MBs par différentes enzymes, dont les MMPs, est capable de lever cette inhibition du TGF β . De plus, une étude montre que la rigidité des MBs pourrait aussi enlever l'inhibition du TGF β . En effet, la contractilité des cellules en contact avec une MB rigide génère des forces entre les composants de la MB et leurs récepteurs cellulaires qui permettent de libérer le TGF β . Ces forces impliquent l'interaction entre les Intégrines et la MB ainsi que la petite GTPase RhoA (Jenkins et al., 2006) (Figure 22).

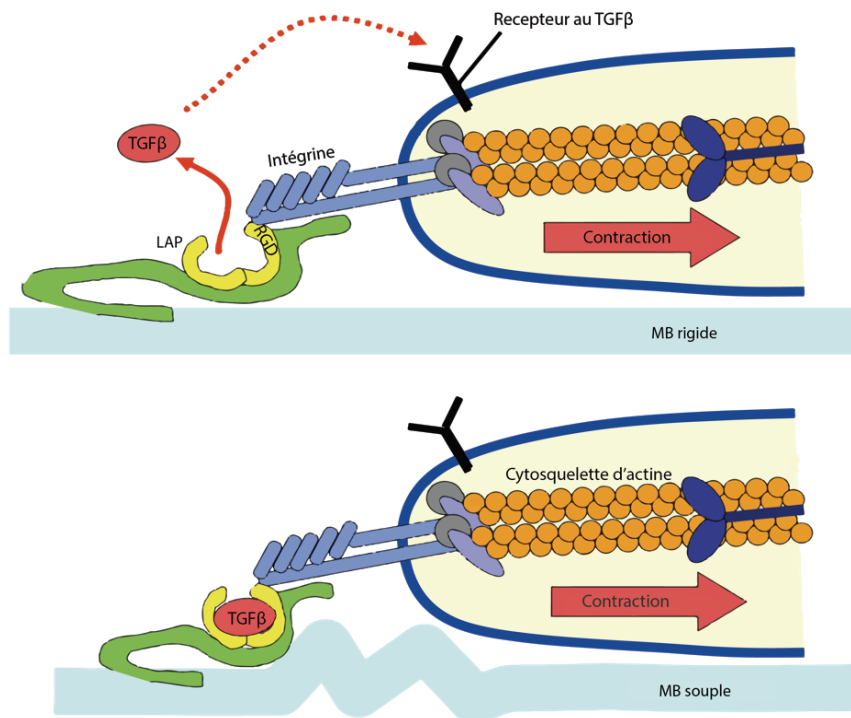


Figure 22 : Rôle de la MB dans la libération de TGFβ.

L'état souple ou rigide de la MB agit de manière directe sur la libération de TGFβ. Lorsque la MB est souple, le TGFβ est séquestré au niveau du site RGD de la protéine LAP (Latency-Associated Peptide). Lorsque la MB devient rigide, les sites RGD et LAP libèrent le TGFβ qui se fixera alors sur un récepteur au TGFβ à la surface des cellules. (Adapté de Wipff et al., 2007)

Les MBs peuvent agir directement sur la forme cellulaire via les liaisons aux protéines transmembranaires telles que les Intégrines et le Dystroglycan. Chez la *Drosophile*, il a été montré que le Dystroglycan est requis de façon cellulaire autonome pour le maintien de la polarité apico-basale dans les cellules épithéliales (Deng et al., 2003). La présence de Perlecan dans les MBs maintient la localisation basale du Dystroglycan, évitant l'invasion du domaine latéral des cellules par des marqueurs apicaux et laissant Disc-large en latéral (Schneider et al., 2006) (Figure 23).

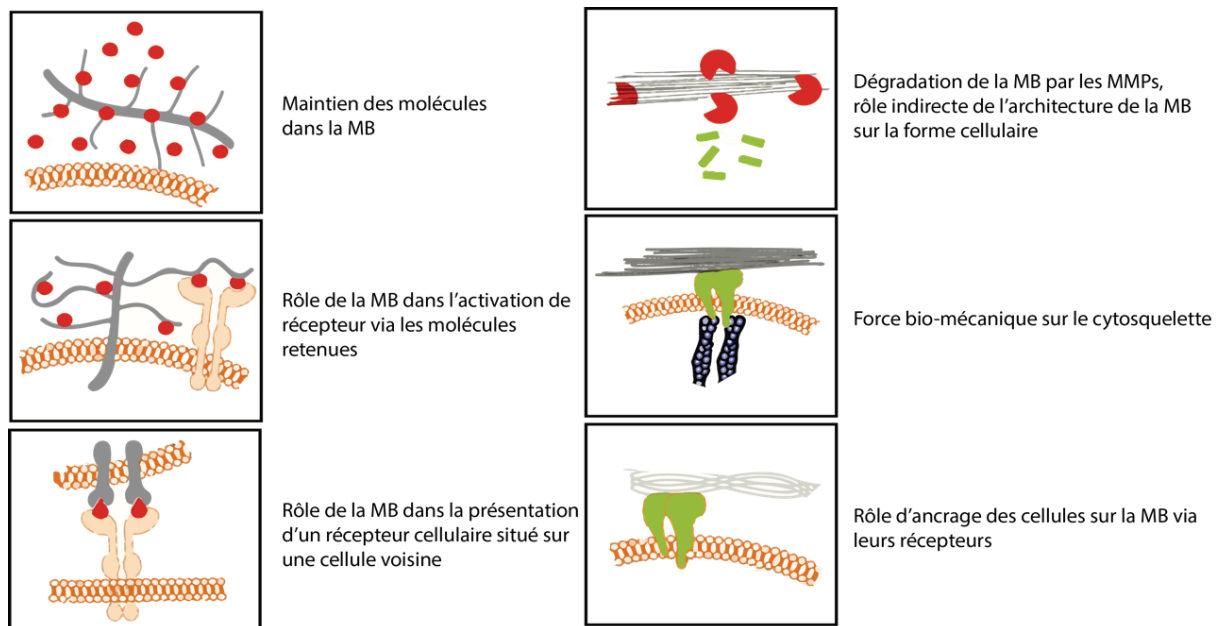


Figure 23 : Principaux rôles des MBs.

3. Fonctions mécaniques de la MB

Les propriétés biomécaniques des tissus sont mesurées en pascal (Pa) (Figure 24). Ces propriétés sont différentes selon l'organe et surtout la fonction des organes. En effet, le cerveau est beaucoup moins rigide que les muscles squelettiques. Ces derniers sont beaucoup plus contraints par l'environnement. Lors de la formation des tumeurs (tumorigenèse), la rigidité des cellules ainsi que celle de la MB est augmentée (Butcher et al., 2009).

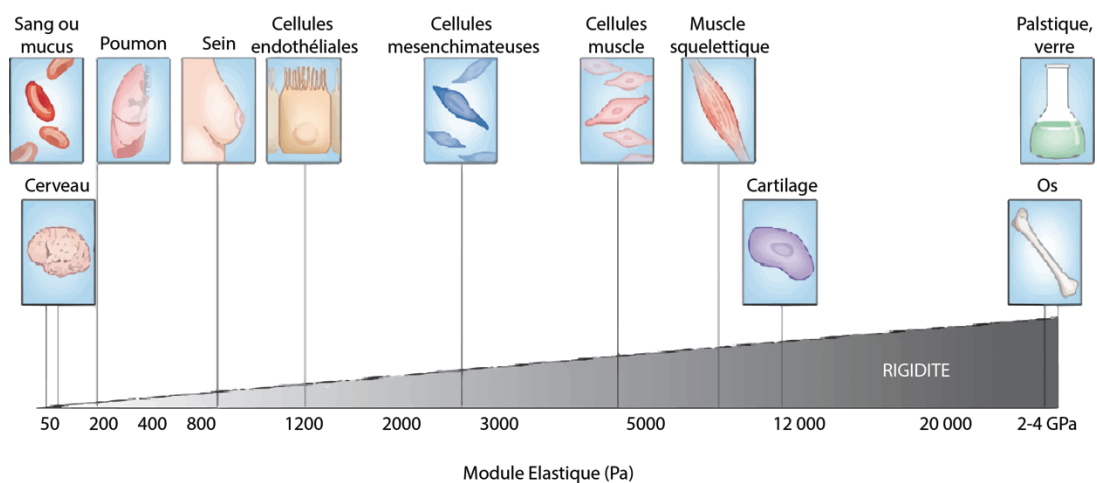


Figure 24 : Variation de la rigidité (Pa) des tissus.

Les propriétés mécaniques des MBs peuvent influencer la différenciation, l'auto renouvellement et l'aplatissement des cellules. En effet, plusieurs études ont montré que la rigidité des MECs artificielles sur lesquelles des cellules souches mésenchymateuses ont été cultivées, influençaient leur destin (Figure 25).

En effet, lorsque les cellules mésenchymateuses sont cultivées sur un gel d'élasticité assez élevée, comparable à l'élasticité retrouvée dans le cerveau, elles vont alors exprimer des marqueurs neuronaux et adopter une morphologie neuronale. Ainsi, le destin des cellules est directement dépendant du milieu dans lequel elles évoluent. Il en va de même pour les cellules mésenchymateuses cultivées sur des MECs rigides dont les propriétés sont proches de l'os, elles vont alors adopter un destin ostéogénique (Engler et al. 2006). Les cellules souches musculaires cultivées sur des MECs trop rigides ne sont pas capables de s'autorenouveler ni de se différencier en cellules musculaires. Au contraire, sur une MEC reproduisant les conditions d'élasticité du muscle, ces cellules sont capables de s'autorenouveler et de se différencier en cellules fonctionnelles capables d'avoir une action de régénération musculaire après transplantation chez la souris (Gilbert et al., 2010).

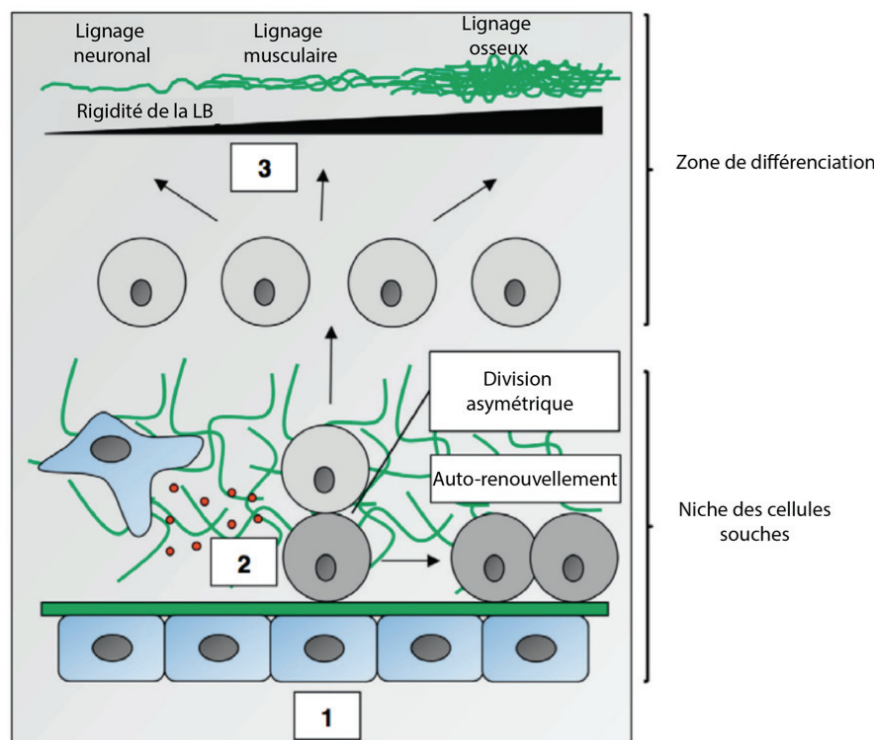


Figure 25 : Les MBs régulent le devenir des cellules souches.

Les cellules souches sont liées à la MB, formant ainsi une niche (1). La niche et les facteurs solubles (points rouges) vont orienter les cellules souches soit vers une division asymétrique, soit vers un

autorenouvellement (2). Les propriétés mécaniques de la MB déterminent le devenir des cellules souches. En effet, une rigidité importante de la MB orientera la cellule vers un lignage osseux, alors qu'une rigidité faible, vers un lignage neuronal. (Adapté de Daley and Yamada, 2013)

Des études in vitro montrent que la rigidité des MBs est un facteur déterminant dans la différenciation des cellules souches (Engler et al., 2006 ; Tse and Engler, 2011 ; Wang et al., 2012 ; Gershlak et al., 2013).

Lorsque les cellules détectent un signal mécanique externe, elles le convertissent en un stimulus chimique, lequel active une réponse cellulaire au travers d'une multitude d'activations de voies de signalisation. Ce processus est appelé mécano-transduction. Les réponses à un stimulus externe entraînent un changement dans la forme de la cellule en jouant sur la réorganisation du cytosquelette et sur la formation du complexe d'adhésion focale (FAK). La déformation de la membrane cellulaire par des forces mécaniques va entraîner l'activation de canaux et/ou de récepteurs mécanos-sensitifs.

Les MBs sont à ce jour caractérisées par leur structure, leur fonction et leur biomécanique (Gattazzo et al. 2014). Cependant, la connaissance de leurs propriétés mécaniques pendant les processus morphogénétiques sera également primordiale à la compréhension de ceux-ci.

E. Remodelage de la MEC : les enzymes de dégradation des MBs

Au cours du développement, le remodelage de la MB est capital pour de nombreux processus biologiques. En effet, la MB est une structure relativement dynamique. Les composants des MBs peuvent être déposés, dégradés ou encore modifiés directement dans le milieu matriciel.

Les MMPs de la MEC sont les principales enzymes requises pour dégrader les molécules des MBs. Il s'agit de molécules dépendantes du microenvironnement (Zn^{2+}). En dégradant les composants des MBs, elles entraînent un changement de comportement des cellules reposant sur ces MBs (Vu and Werb, 2000). Les MMPs appartiennent à la superfamille des Metzincin qui comprend les Astacines et les protéases ADAMs (Strernlich and Werb, 2001). La dégradation d'un ou de plusieurs de ses composants permet de remodeler de façon efficace l'ensemble de la MB. C'est un mécanisme nécessaire lors du

remodelage massif de tissus entiers, par exemple au cours de la métamorphose des insectes ou des amphibiens ou lors de l'involution de la glande mammaire (Sternlicht and Werb, 2001). Cependant, dans la majorité des autres cas, le remodelage est beaucoup plus discret. Le clivage, le dépôt ou le réarrangement des composants de la MB est très restreint (Egelblad & Werb, 2002).

Chez les vertébrés, il existe une vingtaine de MMPs capables de cliver une multitude de composants des MBs. La majorité des MMPs sont des molécules sécrétées directement par les cellules dans le milieu interstitiel. Certaines peuvent être retrouvées associées à la membrane plasmique par l'intermédiaire de leur domaine transmembranaire d'ancrage (GP1 = Glycosyl-Phosphatidylinositol 1) (Page-McCaw et al., 2007). Chez la Drosophile, il existe un gène codant pour DTIMP (Pohar et al., 1999) et 2 gènes codant pour Dm1MMP (Llano et al., 2000) et Dm2MMP (Llano et al., 2002). Le système MMP/TIMP est donc extrêmement simplifié par rapport à celui des vertébrés.

La modification de l'organisation des MBs par remodelage entraîne des modifications directes de son architecture, mais aussi sur le tissu environnant. De plus, on remarque que les propriétés mécaniques des MBs peuvent varier selon leur état de remodelage. En effet, les lysyl-oxidase et lysyl-hydroxylases déterminent le taux de liaisons covalentes entre les molécules de Collagène de type IV. Libérées de leur encombrement stérique, ces molécules peuvent moduler la rigidité des MBs, entraînant un changement de comportement cellulaire (Levental et al., 2009 ; Frantz et al., 2010).

F. Interaction entre les cellules épithéliales

La membrane basale est en lien avec l'architecture cellulaire grâce à la présence de récepteurs transmembranaires qui lient les composants de la MB avec le cytosquelette. On peut citer : les intégrines ainsi que le récepteur Dystroglycan qui reconnaît différents composants de la membrane basale, notamment la Laminine et le Perlecan.

1. Les Intégrines

Ces protéines sont des récepteurs pour les composants de la MEC et sont présentes à la surface cellulaire de tous les animaux, vertébrés et invertébrés. Ces récepteurs jouent un rôle déterminant au cours du développement en tant que régulateur de la morphogenèse (Yamada et al., 1995). Elles ont été principalement décrites pour leur fonction d'adhésion et de remodelage du cytosquelette d'actine (Ginsberg et al., 1992 ; Howe et al., 1998 ; Humphries, 1996) (Figure 26).

Chez la *Drosophile*, il existe cinq sous-unités α (α PS1-5) et deux sous-unités β (β PS et β v) (Brown, 1993 ; Gotwals et al., 1994). La sous-unité β PS, codée par le gène *myspheroid* (*mys*), est capable de former des hétérodimères avec les cinq sous-unités α PS. La sous-unité β v apparaît être restreinte aux cellules endodermiques de l'intestin (Yee and Hynes, 1993). La sous-unité α PS1 est codée par le gène *mew* (*multiple edematous wing*). α PS2 est codée par le gène *inflated* (*if*) et α PS3 est codée par le gène *scabrous* (*scab*). PS1 (α PS1 β PS) et PS2 (α PS2 β PS) sont capables de lier plusieurs composants de la MB (Fogerty et al., 1994).

Les mutants de ces deux clusters d'Intégrines présentent des boursoufflures au niveau des ailes indiquant une perte de l'adhésion entre les deux surfaces de l'aile de la *Drosophile*, espace où le liquide interstitiel peut s'accumuler (Longley and Ready, 1995 ; Zusman et al., 1990).

À ce rôle d'adhésion vient s'ajouter un rôle dans la migration cellulaire en potentialisant la dégradation de la MEC en régulant l'activité des MMPs (Hood and Cheresch, 2002 ; Kreidberg, 2000).

L'activation du récepteur aux Intégrines induit la phosphorylation de petites GTPases, dont l'une des cibles est la voie JNK (Jun N-terminal Kinase). Elle joue un rôle majeur dans la morphogenèse épithéliale ainsi que dans l'immunité, la mort cellulaire, la cicatrisation, la régénération et plusieurs cancers chez l'Homme. Chez la *Drosophile*, la voie JNK est notamment requise pour la fermeture dorsale des embryons grâce à son action sur la voie TGF β , mais aussi au cours de l'ovogenèse, du stade 10B au stade 14, au niveau des cellules en colonne pour la formation du chorion (Suzanne et al., 2001).

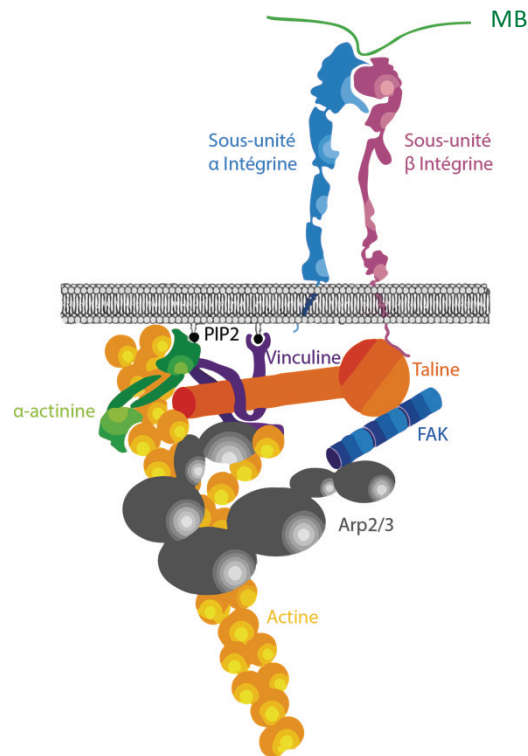


Figure 26 : L'organisation des Intégrines.

Les Intégrines peuvent transmettre un message mécanique aux cellules et influencer via le complexe Taline/Fak sur le cytosquelette d'actine. (Adapté de Vicente-Manzanares et al., 2009)

2. Le Dystroglycan

Le gène du *Dystroglycan* (DG) code pour un précurseur unique qui va être rapidement clivé en deux sous unités α et β (Holt et al., 2000 ; Sgambato and Brancaccio, 2005) (Figure 27). La protéine transmembranaire DG des insectes est beaucoup plus longue que celle des vertébrés (1277 aa contre 895 aa), mais elle possède les mêmes fonctions que celle retrouvée chez les vertébrés (Deng et al., 2003). Le DG est retrouvé dans une grande variété de tissus (muscles squelettiques et cardiaques, épithéliums, système nerveux central et périphérique) (Durbeej et al., 1998). Une mutation de ce gène entraîne le développement de pathologies telles que les dystrophies.

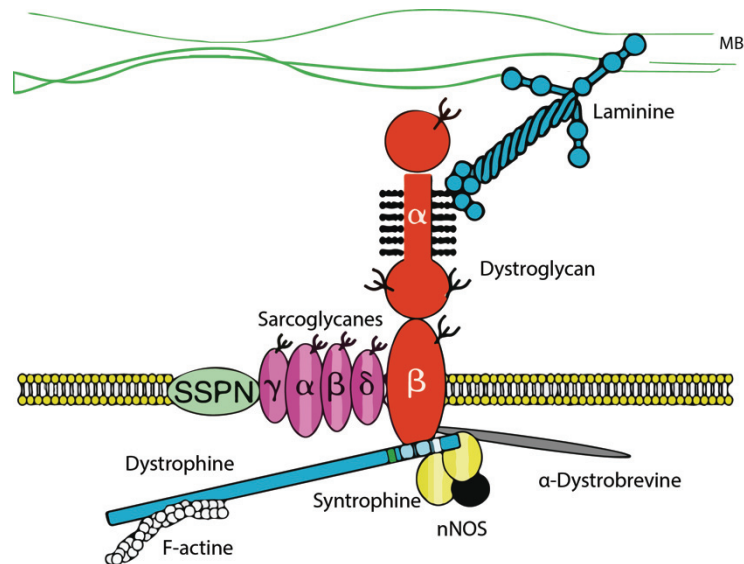


Figure 27 : Rôle du Dystroglycan.

Les sous-unités α et β du Dystroglycan permettent de connecter la MB au réseau du cytosquelette d'actine. La sous-unité α lie la Laminine. SSPN : sarcospan ; nNOS : neuronal nitric oxide synthase (Adapté de Barresi et al., 2006)

De nombreuses autres fonctions sont attribuées au DG, telles que la formation des MBs, la régulation de l'organisation du cytosquelette, la polarisation et la croissance des cellules épithéliales (Durbeej et al., 1998 ; Durbeej et al., 2001 ; Henry et al., 1998). Son expression au pôle basal des cellules épithéliales renforce son rôle dans l'assemblage des MBs. Lors du processus de cicatrisation, une concentration de DG est observée suggérant son rôle dans ce processus (White et al., 2001).

Partie III. Les tissus producteurs des constituants de la MB

A. Chez les vertébrés

La production des MBs n'est pas seulement le fait d'un seul type de cellule mais résulte de la collaboration entre différents types cellulaires. La coopération entre les fibroblastes du derme et les kératinocytes de l'épiderme permet la formation de la MB qui joint le derme à l'épiderme (Benny et al., 2015). Ces auteurs suggèrent que la MB provenant des fibroblastes permet de stimuler la production de la MB par les kératinocytes. Cette communication est aussi retrouvée entre les podocytes et les cellules endothéliales (Byron et al., 2014). Il existe différents types cellulaires participant à la production des MBs des vaisseaux sanguins : les péricytes (Jeon et al., 1996 ; Stratman et al., 2012), les cellules musculaires lisses associées aux vaisseaux (Gong et al., 2008), les fibroblastes (Sansilvestri-Morel et al., 2002 ; Pickering et al., 1997), mais également les cellules endothéliales (Vartanian et al., 2009 ; Kusuma et al., 2012).

B. Chez la Drosophile

En 1988, Lunstrum et ses collègues détectent par hybridation in situ la présence de l'ARN de la chaîne Cg25C du Collagène de type IV à partir de 8 h de développement de l'embryon, dans les cellules adjacentes aux membranes basales notamment au niveau de l'intestin et dans des cellules individualisées dispersées dans l'embryon (Lunstrum et al., 1988). Ces cellules, dérivées du mésoderme et qui expriment fortement les composants de la matrice extracellulaire, sont des hémocytes, l'équivalent des cellules sanguines chez la Drosophile. Les cellules précurseurs du corps gras expriment aussi les composants de la matrice extracellulaire (Le Parco et al., 1986 ; Mirre et al., 1988 ; Rodriguez et al., 1996). La Laminin A est également exprimée par le mésoderme et les hémocytes (Kusche-Gullberg et al., 1992). Une étude réalisée en 2000 par Friedrich et ses collègues indiquent que, dans l'embryon, Perlecan est exprimé dans les cellules cardiaques et le mésoderme viscéral ainsi que dans les précurseurs du corps gras, mais il n'est pas détecté dans les hémocytes (Friedrich et al., 2000). Dans la larve, les hémocytes et le corps gras expriment aussi

fortement le Collagène de type IV (LeParco et al., 1986 ; Kniebiehler et al., 1987 ; Fessler and Fessler, 1988 ; Fessler et al., 1993). L'expression de Perlecan est détectée notamment dans certaines cellules du disque œil-antenne et des disques des patte (Friedrich et al., 2000). Cependant, des expériences récentes d'invalidation tissu-spécifique de la production de Collagène de type IV par RNAi montrent que le corps gras est la source principale de collagène de type IV pour les membranes basales larvaires. L'analyse de l'invalidation de sa production, contrôlée de façon spatio-temporelle, indique que la chaîne Viking du Collagène de type IV est continuellement exprimée par le corps gras, sécrétée dans l'hémolymphe sous forme de trimère et incorporée dans les membranes basales tout au long du développement larvaire (Pastor-Pareja et al., 2011). Même si peu d'études ont été réalisées chez la *Drosophile* adulte, il a été montré qu'il existe à ce stade deux sources majeures de production : les hémocytes et le corps gras (Fessler and Fessler, 1989 ; Fessler et al., 1993). Récemment, il a été montré que les composants de la membrane basale Perlecan, Laminine et Collagène de type IV peuvent aussi être produits localement par les CFs (Denef et al., 2008 ; Lerner et al., 2013 ; Van De Bor et al., 2015). Il apparaît donc que, chez la *Drosophile*, les protéines de la matrice extracellulaire peuvent à la fois être produites localement et/ou recrutées à partir de sources distantes du lieu de leur déposition finale.

Partie IV. Microscope de Force Atomique (AFM) : outil de mesure des propriétés mécaniques

A. Un peu d'histoire

La Microscopie de Force Atomique (AFM) est une technique de microscopie à sonde locale. Inventée en 1986 par BINNIG (Binnig et al., 1986), l'AFM s'inscrit aujourd'hui comme un outil indispensable à l'échelle de la molécule. Cette technique permet d'observer les forces d'interaction qui existent entre la pointe de l'AFM et l'échantillon. Depuis sa création, l'AFM a connu de nombreuses adaptations à des domaines d'application divers et variés. L'objectif de cette partie est de présenter l'AFM appliquée à la Biologie puis appliquée à ma thématique.

B. Principe général

Le principe général de l'AFM repose sur le contrôle des déplacements d'une sonde ou d'une pointe de taille nanométrique dans le champ proche de l'échantillon, de manière à collecter des informations relatives à des caractéristiques de l'échantillon à l'échelle de la taille de la pointe.

La pointe est montée sur un levier (cantilever) qui va se déformer élastiquement en présence des aspérités de surface ou de profondeur : c'est l'indentation (Figure 28). En régime quasi statique, la force de rappel du levier compense à tout instant les forces d'interaction pointe-échantillon. Si on ne s'intéresse qu'à la composante verticale, on a donc :

$$F_{\text{pte-ech}} = k. z$$

Où k est la constante de raideur effective du système surface-levier du levier, $F_{\text{pte-ech}}$ représente la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon, z la distance pointe-

échantillon. Ainsi, la déflexion du levier rend compte des variations des forces d'interaction pointe-échantillon et donc de la topographie de l'échantillon.

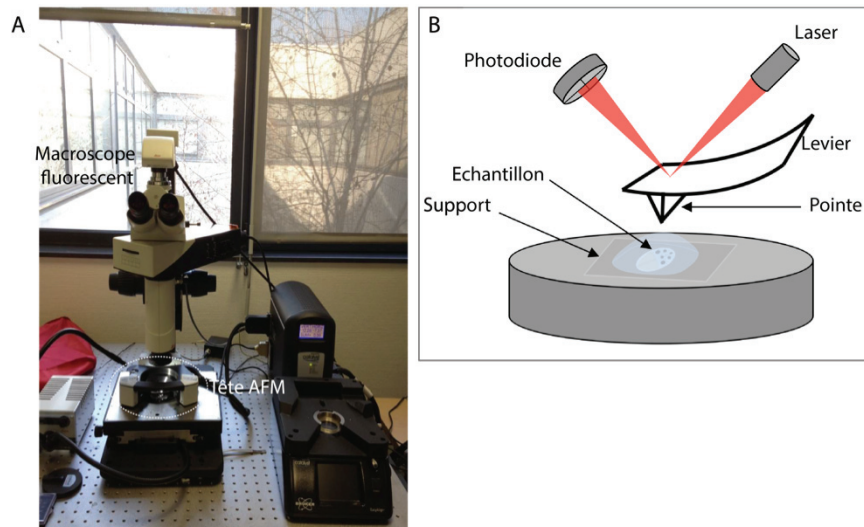


Figure 28 : Présentation du système d'expérimentation.

(A) Photographie du montage AFM. Catalyste Bruker additionné d'un macroscopie fluorescent (Leica).
(B) Schéma de principe du fonctionnement d'un AFM.

La déflexion du levier est mesurée par l'intermédiaire d'un système optique. Un laser focalisé sur l'extrémité du levier se réfléchit en direction d'une photodiode. La photodiode est constituée de quatre cadrans qui permettent de définir précisément la position du spot du laser sur celle-ci, par mesure de différences d'intensité. La déflexion est la soustraction entre la position initiale t de la pointe et la position $t+1$ de cette même pointe. Le levier se déforme élastiquement en enregistrant les déflexions. On a alors accès à la topographie de surface ainsi qu'au module élastique de l'échantillon. Le principe de fonctionnement de l'AFM repose sur la mesure de forces d'interaction entre la pointe et la surface. En l'absence de champ externe, les forces dominantes sont les interactions de Van der Waals, les interactions répulsives à courtes portées ainsi que les forces d'adhésion et de capillarité.

C. Le mode contact

1. Topographie

Dans ce mode topographie, la pointe balaye la surface de l'échantillon, elle est en permanence en contact avec la surface. Le levier se déforme élastiquement : les déflexions sont directement reliées aux variations de la hauteur de la position de la pointe. C'est une image de surface à force constante.

2. Spectroscopie

L'AFM permet aussi d'obtenir des renseignements sur la nature chimique d'un échantillon ainsi que sur ses propriétés mécaniques. On positionne la pointe à l'aplomb d'un point et on enregistre les variations des forces d'interaction en fonction de la distance pointe-échantillon. Ces courbes sont appelées des courbes de force (approche-retrait) (Figure 29). C'est à partir de ces courbes de force que le module élastique sera extrait. On pourra alors connaître les propriétés mécaniques de notre échantillon.

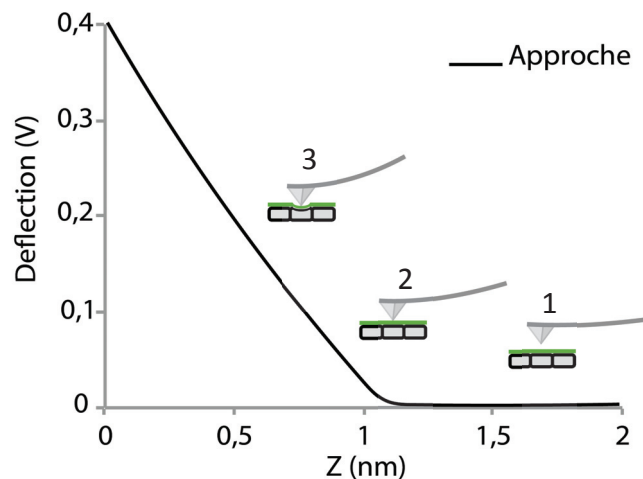


Figure 29 : Courbe de déflexion de la pointe en fonction de l'indentation

(1) La distance pointe-échantillon est grande, la pointe ne sent pas le potentiel électrique de l'échantillon. La force détectée est nulle et la déflexion enregistrée renvoie à la valeur de déflexion initiale. (2) En rapprochant la pointe de la surface, la pointe rentre dans le potentiel électrique de l'échantillon. Si la nature de la pointe et de l'échantillon donne lieu à une interaction attractive, la pointe subit un saut brutal et la force détectée est alors négative (attractivité de l'échantillon). (3) La force imposée par la pointe augmente. Elle rentre dans l'échantillon et la courbe s'écarte de la valeur 0.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Lignées de *Drosophila* utilisées

Les lignées sont conservées et mises en culture à 25°C sur un milieu à base de maïs, de sucre, d'agar et de lavures. Les lignées suivantes ont été utilisées au cours de mon doctorat, la lignée W118 comme contrôle :

UAS :: PH-PLC δ -GFP (Gervais et al., 2008) ; *UAS :: TG* (Shibata et al., 2010).

Les autres lignées utilisées sont présentées dans la partie résultats (cf. p.80).

Le système FLP/FRT

Le système FLP/FRT permet de générer des clones homozygotes mutants au sein d'un animal hétérozygote et ainsi d'analyser, au niveau tissulaire et/ou cellulaire, le phénotype de mutations récessives létales. L'induction de la recombinase appelée Flipase (FLP) va entraîner une recombinaison site-spécifique à haute fréquence au niveau du site FRT qui est à la fois son site de reconnaissance et de recombinaison (Figure 30).

Au départ, l'organisme est hétérozygote pour une mutation. La recombinase Flipase (FLP) catalyse la recombinaison site-spécifique entre les sites FRT (« FLP recognition target ») pendant la mitose chez la *Drosophila*. Si la recombinaison site-spécifique entre les chromosomes homologues a eu lieu après la réplication de l'ADN et que les chromatides filles se ségrègent de façon appropriée, alors la région du bras du chromosome qui est distal au site FRT deviendra homozygote. La cellule fille hérite donc de deux copies de cette région provenant d'un seul chromosome parental. De cette manière, des clones de cellules homozygotes mutantes sont générés. Ces cellules sont visualisées par l'absence de GFP, les cellules sauvages sont GFP+.

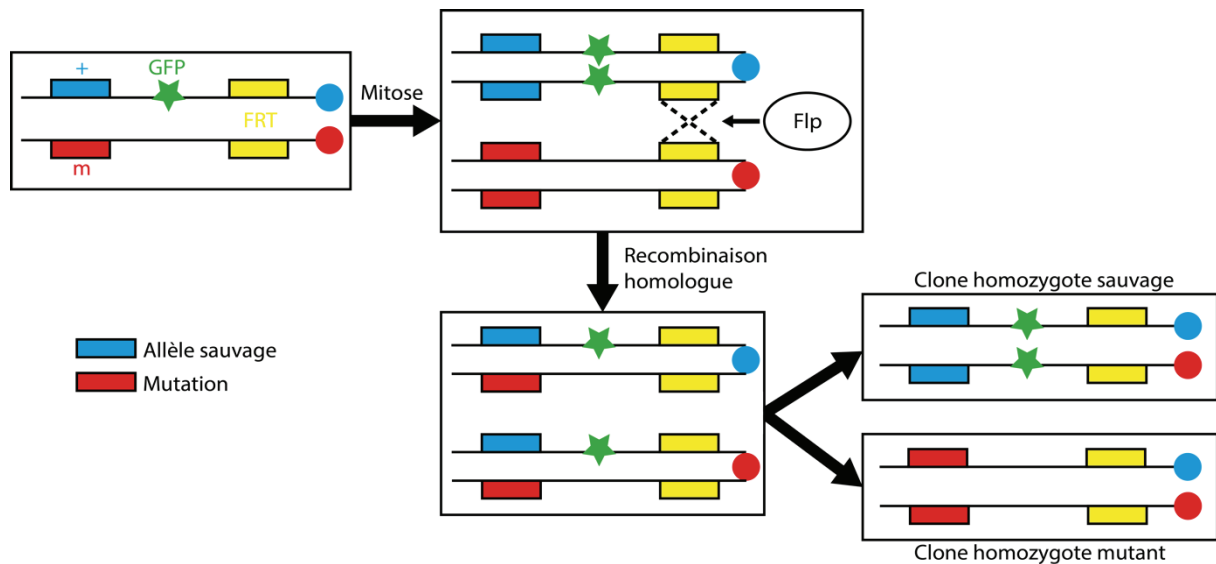


Figure 30 : Le système FLP/FRT

Système de clones « Flip-out »

Le système de clones « Flip-out », permet de générer des clones dans des cellules non mitotiques ou mitotiques (Figure 31) (Golic and Lindquist, 1989). En effet, les sites FRT sont en « cis » c'est-à-dire sur le même chromosome où ils flanquent une séquence interrompant la transcription de la séquence d'intérêt. Ici, j'ai utilisé la lignée suivante : *actin :: <FRT> STOP-yellow <FRT> Gal4, UAS :: GFP*. L'expression de Flp permet la recombinaison de séquence FRT et donc la suppression de la séquence d'interruption STOP-yellow, rapprochant le promoteur ubiquitaire de l'actine de la séquence de l'activateur de Gal4. Les cellules dans lesquelles a eu lieu la recombinaison, et qui expriment donc la séquence d'intérêt en aval des sites UAS (RNAi...) sont visualisées par l'expression du rapporteur UAS :: GFP.

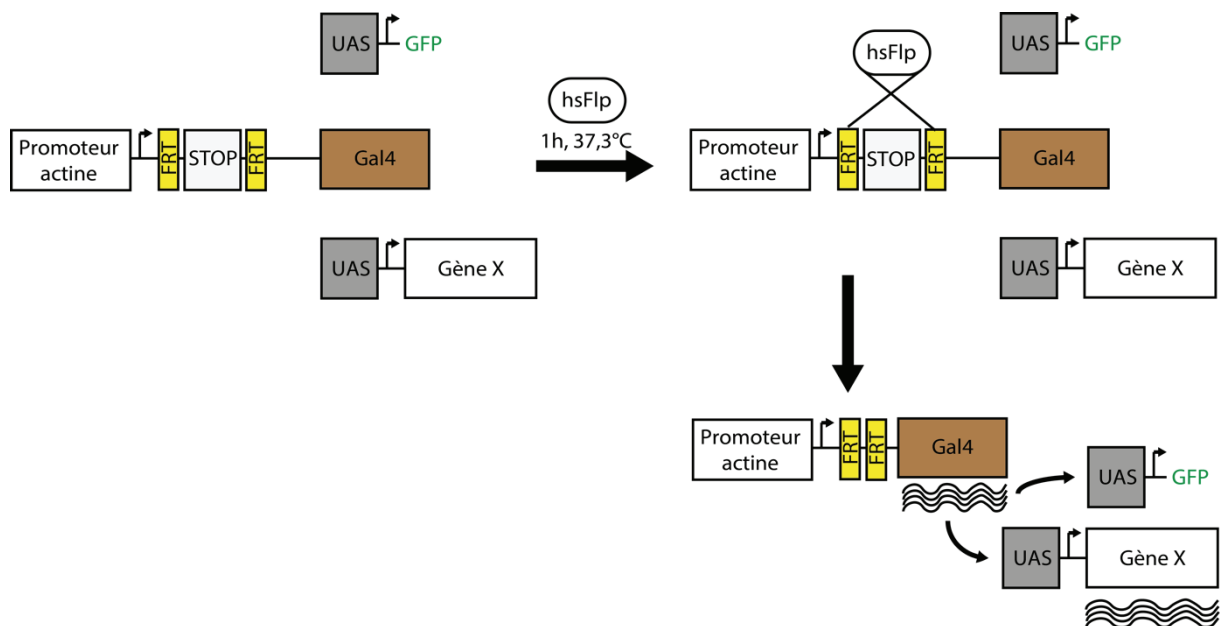


Figure 31 : Le système UAS-Gal4

Le facteur de transcription de levure Gal4 contrôle l'expression de gènes en aval des séquences activatrices UAS. Gal4 est sous contrôle d'un « enhancer » génomique. Une fois synthétisé, Gal4 va venir se fixer sur les séquences UAS, ce qui va activer la transcription du gène X suivant le patron d'expression défini par la « pilote ».

Pour induire la Flipase et donc la génération de clones, les *Drosophiles* subissent un choc thermique de 1 heure à 37,3 °C. Puis elles sont conservées à 25 °C durant trois jours avant d'être disséquées.

Immunohistochimie

Les *Drosophiles* sont disséquées dans du PBS et les ovaires sont fixées dans une solution de formaldéhyde à 4 % durant 15 min. Après 3 lavages dans du PBS 1X, les ovaires sont placés dans du PBT (PBS 0,1 % 0,1 % Triton X-100, 0,5 % BSA) durant 1 heure à 4 °C sur roue puis incubés en présence des anticorps primaires une nuit à 4°C. 3 rinçages de 30 min dans du PBT sont effectués avant l'ajout de l'anticorps secondaire (2 h à température ambiante sur roue). 3 rinçages de 15 min sont réalisés dans du PBT avant dissection. Les follicules sont disséqués puis montés entre lames et lamelles dans du PBS/Glycérol (V/V=25/75).

Les anticorps primaires utilisés : anti-DECAD (DHSB, 1/200, rat), lapin anti-JNK (Santa-Cruz, 1/250), anti- β PS (DHSB, 1/100, souris), anti- α PS1 (DHSB, 1/40, souris), anti- α PS2 (DHSB, 1/150, souris), anti-GFP (Sigma, 1/1000, chèvre), anti-C-Myc (Sigma, 1/250, chèvre), anti-PKC ζ (Santa-cruz, 1/1000, hamster), anti-Eya (DHSB, 1/50, souris), anti-MMP1 (DHSB, 1/20, souris), anti-dTGA (Shibata et al., 2010), anti-CG25c (Van De Bor (Nice), 1/1000, lapin), anti-vkg (Van De Bor (Nice), 1/1000, lapin).

Préparation du milieu de culture

Composition (Prasad et al., 2007) : milieu Schneider filtré (Invitrogen) avec 15 % vol/vol de FBS et 0,6 x streptomycin/penicillin (Invitrogen – 10 000 U/ml de penicillin G-sodium, 10,000 μ g/ml de streptomycin sulfate). Le pH est ajusté 6,9-7,0. Ajout d'insuline (Sigma – 10 mg/mL) à une concentration finale de 9 μ M avant utilisation.

RÉSULTATS

RESULTATS

Partie I. Détermination des propriétés mécaniques de la MB au cours de la formation d'un organe

ARTICLE

TGF β -dependant epithelial cell morphogenesis controls basement membrane stiffness

Julien Chlasta¹, Pascale Milani¹, Jean-Luc Duteyrat², Letitia Arias¹, Arezki Boudaoud³ and Muriel Grammont¹

¹Univ Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Laboratory of Biology and Modeling of the Cell, 15, Parvis Rene Descartes, F-69007, Lyon, France.

² Institut NeuroMyoGene, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, 16 rue R. Dubois, Villeurbanne Cedex F-69622, France.

³ Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA, 15, Parvis Rene Descartes, F-69007, Lyon, France.

Phone : 33 4 72 72 88 73

Fax : 33 4 73 27 61 32

Email: muriel.grammont@ens-lyon.fr

Short Title: Basement membrane stiffness during morphogenesis

Key Words: Basement membrane, stiffness, atomic force microscopy, epithelial cell morphogenesis, biomechanics, *Drosophila*

INTRODUCTION

Extracellular matrices (ECM) are essential for the development and the life of multicellular eukaryotic organisms. The proteins that belong to this tissue form a network that fills the spaces between organs and mechanically supports them (Hynes and Naba, 2012). ECM are specialized in function of the organs or tissues they surround. For instance, epithelial sheets are found to be associated with basement membranes (BMs) and importantly, epithelial morphogenetic processes that occur during development, are known to be partly regulated by BM. BM control epithelial morphogenesis by providing a physical scaffold to oppose the contractile forces generated by cell shape changes, by directing growth factor delivery and by regulating cell adhesion (Hynes, 2014). All these roles depend on BM composition and structure, which in turn determine BM mechanical properties. BM mechanical properties have been shown to control cell migration in vitro and BM structure is clearly altered by proteases during branching morphogenesis (Daley and Yamada, 2013; Kai et al., 2016). Thus, one of the key issues to understand epithelial morphogenesis, and therefore development, is to find how BM mechanical properties vary in vivo during organ formation and to decipher the link between these properties and morphogenesis. Although ECM mechanical properties have been previously measured and manipulated in many in vitro experiments to address its role during single cell migration (Paszek and Weaver, 2004), measurements have never been performed during the course of the development of an organ or a tissue.

The development of *Drosophila* ovarian follicle is a valuable model to analyse the mechanical properties of the BM along with tissue morphogenesis (Horne-Badovinac and

Bilder, 2005). *Drosophila* follicle consists of an internal cluster of 16 germline cells, composed of 15 nurse cells and one oocyte, surrounded by a monolayer of epithelial cells, called follicle cells, that are in contact with an external BM (Figure 1A, B). Follicles are linearly and chronologically arranged in ovarioles. Follicles are formed in the most anterior structure of the ovariole, called the germarium. Germaria enclose germline and somatic stem cells and produce follicles during the entire lifetime of the fly. Follicles mature progressively toward the posterior. Their maturation has been divided in 14 stages with stage 1 corresponding to a fully formed follicle leaving the germarium and the stage 14 to a mature egg (King, 1970). The BM that surround the germarium and the follicles is composed of the core BM proteins and, so, typically consists of Collagen IV (Col IV) helical trimers of three α chains, of Laminin trimers, of the glycoprotein Nidogen and the heparan sulphate proteoglycan Perlecan (Yurchenco, 2011). BM components interact with the epithelial cells through Integrin and Dystroglycan receptors. BM components are produced by the follicular cells, by the fat body, which is the metabolic organ in insects, and by some companion-blood cells, called hemocytes that lie closed to the germarium (Van De Bor et al., 2015). At present, it is established that BM plays a role for germline stem cell division, epithelial polarity establishment and follicle elongation. While the first two processes occur in the germarium, the third one occurs during follicle development. Follicle elongation has been extensively studied over the last five years (Isabella and Horne-Badovinac, 2015). It consists, first, of the rotation of the follicle around the A/P axis within the static BM from stage 1 to late stage 8 (Figure 1C) and, second, of BM-regulated Acto-Myosin contractions from mid-stage 9 onwards (Cetera et al., 2015; He et al., 2010); Haigo and Bilder, 2011). During the rotation, the follicular cells deposit BM components in linear "fibril-like

structures" that are perpendicular to the A/P axis (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). This likely establishes an anisotropic stiffed corset, which forces the follicles that are spheroid up to stage 5, to elongate progressively along the A/P axis after this stage (Bilder and Haigo, 2012). Links between BM components and follicle elongation have been shown through analyses of the role of the $\alpha 2$ -chain of Collagen IV, encoded by *viking* (*vk*g), and of the β PS subunit of Integrin, encoded by *myspheroid* (*mys*). In case of mutations in these genes or after collagenase treatments, rounded eggs are produced (Haigo and Bilder, 2011). From these data, a model that proposes that BM stiffness increases during the rotation has emerged, but measurements to validate this model have never been carried out. Soon after the rotation stops, follicle cells change their shape: about 50 anterior follicle cells flatten around the nurse cells while all the others become columnar around the oocyte (Figure 1A) (King, 1970). Previous data have shown that TGF β controls this morphogenetic process (Brigaud et al., 2015). Although no link between cell flattening and BM has been demonstrated yet, multiple studies in vertebrates have described the role of the BM in TGF β activity (Saika et al., 2001). Thus, measuring local BM mechanical properties during cell flattening and throughout oogenesis should provide valuable information to decipher the link between BM and epithelial morphogenesis.

To investigate the link between BM mechanical properties and epithelial morphogenesis, we designed an Atomic Force Microscopy (AFM) approach to determine the elastic modulus of the ECM in living ovarian follicles at different stages of development in WT and in several mutant conditions that disrupt BM structure. Our results show that ECM stiffness increases while the follicle rotates and reveal fibril-like structures that are stiffer than the BM surrounding the fibrils. We then used this approach, in combination with

classical genetic analyses to demonstrate the link between BM stiffness and epithelial cell flattening. We found that BM becomes soft around the cells that flatten and that this morphogenetic process is responsible of this softening.

RESULTS

BM fibril-like structures are remodelled during epithelial cell shape changes.

During follicle rotation, it has been shown that the deposition of Coll IV around the follicles increases and that the density, the length and the orientation of the fibril-like structures evolve from stage 4 to 12 (Haigo and Bilder, 2011) (Figure S1A). However, no analysis has been carried out specifically at stage 9, when follicle cells change their shape from cuboidal to either squamous or columnar. We analysed the density and the orientation of the fibril-like structures from stage 2 to stage 10, with a focus at stage 9. We first confirmed that Vkg::GFP (P{PTT-GC}vkg^{CC00791}) expression levels increase between stage 4 and 7 (Figure S1A) and that fibril-like structures are oriented perpendicular to the A/P axis at stage 8 and at stage 10. In addition, we observed that the size and the density of the fibrils are different between the anterior or the posterior half of the follicles (Figure S1B). The fibrils are shorter and denser in anterior than in posterior. This is also observed throughout the stage 9. In addition, our analyses show that fibrils are less transverse in the whole follicle from stage 9 onwards. (Figure 1D, E). Thus, our data reveals that BM undergoes major modifications when the rotation stops and that these modifications are different depending on epithelial cell shape localized underneath. This suggests that BM mechanical properties are likely to be temporally and spatially regulated during follicle development.

Method to measure BM stiffness in live ovarian follicles with AFM

A standard approach to measure mechanical properties of biological samples is the use of an Atomic Force Microscope (AFM) (Figure 2A). We established a method to measure the elastic modulus of the BM on live follicles. Follicles are dissected in live imaging medium and the muscular sheet is manually removed. Follicles are put on poly-L-lysine coated coverslip and placed in Petri's dishes filled with the live imaging medium at room temperature. To obtain quantifications of the BM mechanical properties, we analysed the raw force curves given by the AFM with the protocol developed by Milani et al. (Milani et al., 2011; Milani et al., 2014) (see Materials and Methods for details) (Figure 2B). The stiffness of the cantilever was chosen to enable indentation of the BM with little deformation of the underlying tissues (Figure 2C). To determine which range of indentation depths gives the elastic modulus of the BM, we first measured the thickness of the BM at different stages of oogenesis using TEM. The BM depth varies from 80 nm at stage 6 to 150 nm at stage 10 (Figure 2D, E). We note that at stage 10 the BM above the columnar cells is thicker than that above the squamous cells. Second, we obtained topographic images of decellularized BM lying on a slide by using the tapping mode of the AFM and we measured a difference of height between the glass and the BM of $120 \text{ nm} \pm 16 \text{ nm}$ at stage 10 (Figure 2F), consistently with TEM data. Third, we determined the stiffness of the follicle as a function of the indentation depth, because the apparent elastic modulus may change due to the deformation of the successive layers. To do so, the measurement was performed by taking into account 100 raw force curves from a 10×10 matrice, with each indentation point spaced 150 nm apart (Figure 2G). BM stiffness has been calculated along a 600 nm indentation in stage 8 follicles. We observed that the values of elqastic modulus are

independent of depth, when the depth is smaller than 100nm. (Figure 2H). From all these results, we decided to perform all measurements of BM stiffness with an indentation depth of 40 to 50 nm, which is less than BM thickness. Importantly, these measurements are realized on WT living follicles, meaning that the BM is likely under the tension of the follicular and germline cells. To probe this tension, three different conditions were tested. First, the live imaging medium is replaced with a hypertonic solution, which leads to an inside-out flow of water that renders the follicles flaccid. Second, we mechanically wounded the follicle to decrease the osmotic pressure of the germline cells. Third, the follicles were incubated with a drug that interferes with Myosin activity (Y-27632). In the first two conditions, the BM becomes softer than that measured in WT condition (Figure S2). In presence of Myosin inhibitor, the raw force curves were not interpretable (data not shown). Thus, these results indicate that the BM is under tension due to the germline and the follicular cells, and that the elastic modulus that we measure represents an apparent elastic modulus.

BM stiffness increases while the follicles rotate

To determine the apparent elastic modulus during follicle development, we analysed the raw force curves from an area located in the middle of the follicle for the stages 2 to 10. We observed that the stiffness increases gradually until stage 7, before it rises rapidly to $800 \pm 200\text{KPa}$ at stage 8. While we observe a steady increase of stiffness globally between the different stages, stiffness was spatially heterogeneous at each stage. This heterogeneity is also detected within the 10x10 matrix, suggesting that the BM structure is non-uniform. This is consistent with fibril-like structures being incorporated

within the BM from stage 6 onwards (Figure 3A-B, S3). We then analysed the stiffness in different mutant conditions that alter the structure and/or the composition of the BM. First, we incubated the follicle with collagenase, which disrupts the links between the 3 chains of Coll IV and observed an immediate decrease in stiffness, at all stages of follicle development, indicating that the structure of Coll IV trimers is important for the mechanical properties of the BM (Figure 3A-C, S3). Second, we reduced the levels of Coll IV within the BM by analysing follicles expressing RNAi against viking or against the procollagen prolyl-4-hydroxylase- α EFB (PH4a-EFB) gene under the specific follicle cell Traffic Jam-Gal4 driver. PH4a-EFB is required for Coll IV trimer assembly and stability and thus, knockdown of this enzyme prevents Coll IV from being secreted (Figure S3). Before AFM measurement, we determined by electron microscopy the thickness of the BM. *vkg* follicles present a BM less dense but thicker than in WT follicles whereas BM around PH4a-EFB follicles has a normal thickness (Figure S3). Analyses of raw force curves showed a reduction of BM stiffness for small indentations (<10nm) for PH4a-EFB follicles and for deeper indentations (>20 nm) for *vkg* follicles (Figure 3B, C, S3). Third, we measured the stiffness of follicles expressing RNAi against Perlecan and also observed a reduction in stiffness (Figure 3B, C, S3). This reduction is detectable for indentations depths that are less than 25 nm, which correlates with electron microscopy observations that show that BM around perlecan follicles is extremely fine with signs of degradation (Figure S3). Finally, we also analysed the change in BM stiffness after generating clones of cells expressing RNAi against PH4a-EFB. Due to the rotation of the follicle from stage 2 to 8, we expected to observe a reduction in BM stiffness all around the follicle and not specifically just above the mutant cells. In such follicles, the BM is, indeed, less stiff than that of WT follicles (Compare 3D avec 3E). But,

the BM above the mutant clone is also softer than that above the neighbouring WT cells, indicating that BM remodelling is dynamic as local differences of stiffness can be detected soon after the rotation stops (Figure 3D). Altogether, these results show that BM mechanical properties depend on BM composition and structure and demonstrate that BM stiffness increases while the follicles rotate.

The fibril-like structures stiffen the BM

The BM structure of the ovarian follicle contains fibril-like structures that are produced by the follicular cells and that are progressively embedded in the BM during the rotation. As these structures are supposed to rigidify the corset around the follicles, we use the AFM to obtain topographical images of the BM and to determine the mechanical properties of these structures compared to regions with no fibrils. We first used the tapping mode of the AFM and observed fibril-like structures with similar length, width and orientation than those seen in fluorescent microscopy, suggesting that fibril-like structures can be identified based on their structure and rigidity (Figure 4A, B). By using the QNM mode on decellularized BM, we also observed that the fibrils cause uneven BM surface (Figure 4C). On decellularized BM, we further found that fibrils are stiffer than regions with no fibrils (Figure 4D). Second, on live follicles, the analyses of the forces curves from 10x10 matrices with indentations points spaced 150 nm apart reveals stiff structures that have a size and orientation similar to the fibrils-like structures observed by confocal microscopy (Figure 4D). Altogether, these results show that BM with fibril-like structures is stiffer than BM without fibrils. Thus, BM fibrils present the expected mechanical properties for establishing a corset around the follicle.

Local BM mechanical properties are controlled by cell flattening

At stage 9, about 50 anterior epithelial follicle cells flatten progressively from anterior to the middle of the follicle whereas the others become columnar around the oocyte. We analysed BM mechanical properties during these morphogenetic processes (Figure 5A). 10x10 matrices with indentation points spaced 100 nm apart were performed for each area. The analyses of the raw force curves showed that the stiffness decreases in anterior during cell flattening whereas it remains constant or increases in posterior, indicating that a gradient of stiffness from anterior to posterior is established during epithelial cell morphogenesis. At stage 10, the BM stiffness above the stretched cells is on average 10 times lower than above the columnar cells (Figure 5B, S4). This stiffness is also dramatically reduced when follicles are mutant for Viking, perlecan or undergo a collagenase treatment (Figure S4). We also analysed the BM stiffness above the junction of the nurse cell and the oocyte compartments. An abrupt variation of stiffness is observed at the junction, suggesting a link between changes in BM mechanical properties and cell shape (Figure 5C). To test whether cell flattening could be responsible for BM softening, we analysed the stiffness in two mutant conditions that disrupt this morphogenesis. We have previously shown that cell flattening is controlled by the TGF β pathway. So, we analysed BM in follicles that over-express either Daughter against dpp (Dad) or a constitutive active form of the Thick Vein (Tkv) receptor under Traffic Jam-Gal4. In the first mutant condition, cell flattening is delayed whereas in the second condition, cell flattening occurs prematurely. In follicles over-expressing Dad, we performed the experiment at mid stage 9 according to the progression of the flattening for each genetic condition. The BM above the stretched cells is stiffer than in WT, indicating that cell flattening is required for

BM softening at stage 9 (Figure 5D, S4). No modification is observed above the columnar cells. In TKVA-expressing follicles, we detected that the BM above the stretched cells is softer than in WT at stage 8, indicating that premature cell flattening is sufficient to induce BM softening. (Figure 5E, S4). To further investigate BM mechanical properties, we treated follicles with collagenase and observed them with SEM. The major tears at the boundary between stretched cells and columnar cells are consistent with the large difference in stiffness between the two sides (Figure 5F). Furthermore, some tears are also present above the stretched cells and halfway through the oocyte compartment. This result confirms that the BM mechanical properties are locally different at stage 9. To conclude, all these data demonstrate that TGF β controls BM mechanical properties.

Cell flattening depends on interactions between the BM and basal adhesion molecules.

We then wondered whether, in turn, the BM interactions between the stretched cells and the BM are important for cell flattening. Analyses of follicles with clones for a null allele for *vkg* or expressing RNAi against PH4a-EFB show that the adherens junction remodelling is delayed compare to WT, and that the mutant cells are not elongated along the A/P axis (Compare Figure 6A with B, C). These data show that production of Coll IV is important to control cell flattening. Importantly, the detection of an abnormal flattening when Coll IV production or secretion is impaired shows again that BM remodelling is dynamic during stage 9.

We also analysed follicles mutant for a null allele of *myspheroid* (*mys*), which encodes the sole β subunit of Integrins (subunit β PS) required during follicle development. Mutant cells have reduced apical surface, present a delay in adherens junction remodelling

and are not oriented along the A/P axis. WT cells that are next to mutant cells also present an abnormal orientation. (Figure 6D). Mutant cells expressing RNAi against Fak have a reduced apical surface, are rounder and less oriented along the A/P axis than WT (Figure 6E, 7). Quantifications show that mutant cell metrics become more abnormal throughout the stage 9 (Figure 7). Thus, we conclude from these experiments that cell flattening depends on interactions between the basal side of the epithelial cells and the BM and show that BM structure is essential for cell flattening.

DISCUSSION

BM are known to assist epithelial cells during morphogenetic processes by providing a mechanical support to resist the contractile forces emanating from the epithelial cells, by constraining locally or globally the expansion of growing tissues, by regulating growth factor delivery and by regulating cell adhesion and signalling of BM receptors, such as Integrin (Daley and Yamada, 2013; Hynes, 2014; Kai et al., 2016). A growing body of evidence shows that BM structure is remodelled during development and in vitro analyses clearly demonstrate that BM remodelling changes BM mechanical properties and is a mechanism used to tune epithelial morphogenesis (Tse and Engler, 2011; Wei et al., 2015). During development, BM remodelling occurs through synthesis and incorporation of new BM components, through BM degradation by proteases or through changes in BM receptor levels and activities at the basal side of the epithelial cells. However, BM mechanical properties during the course of development of a tissue in animals have never been measured and validation of the role of the BM mechanical properties to shape epithelial cells was still waiting. In our study, we measured the mechanical properties during the course of follicle development, which features two epithelial morphogenetic processes, collective cell migration from stage 1 to 8 and the cuboidal-to-squamous transition or cuboidal-to-columnar transition at stage 9. We first developed an AFM-based protocol to determine BM mechanical properties. We observed that BM stiffness increases progressively during the rotation of the follicle before rising abruptly at stage 7/8. Our data show that BM structure is important for its stiffness and we demonstrate that BM with fibril-like structures is stiffer than BM without fibrils, validating

the model that collective cell migration allows formation of an anisotropic stiff corset. Our study also shows that BM stiffness is later locally modulated around the cells undergoing the cuboidal-to-squamous transition and that this softening depends on the TGF β signal.

AFM is an efficient technique to measure local stiffness in living tissue. This has been successfully used to probe hypocotyls seedlings and shoot apical meristems in *Arabidopsis*, BM in glial migration or the corneal lens in *Drosophila* (Lavanya Devi et al., 2016; Milani et al., 2011; Milani et al., 2014). One challenge for this technique is to determine the correct indentation to measure the mechanical properties of a layer in multiple layered tissues. In our system, the BM is the most external layer. To define the correct indentation to get BM mechanical properties without the layers underneath interfering, we first measured the thickness of the BM, second we measured stiffness changes in function of the indentation and third we tested mechanical, chemical and genetic conditions known to alter BM or follicle structure. The variation of the stiffness in function of indentation depth clearly shows that the mechanical properties depend on depth. Our analyses thus confirm that determination of this parameter is crucial to get correct values of stiffness. From our results, we established that measures at 50 nm indentation gives the “apparent elastic modulus” of the BM. This elastic modulus corresponds of BM mechanical properties when BM is under the tension of the growing follicle. These results are in accordance with previous analyses showing that indentions of about 1/3 of the depth of the layer give the mechanical properties of this layer (Milani et al., 2011). A recent analysis presented AFM-measures on germarium and early stages of oogenesis. However, comparisons of the values between the two methods is problematic as the authors used an indentation depth of 200 nm, which is

slightly more than the thickness of the BM, and also used a spherical probe, which has a much larger contact area with the BM than in our case (Pearson et al., 2016).

An important aspect of this technique is that it is a non-invasive method, which allows the visualisation of the heterogeneity at the measured areas and between several areas on the same sample. Obtaining of matrices with multiple measurement points is of importance when the studied layer is likely to present heterogeneous structures. This was especially interesting in our model, as it has been described that BM incorporates fibril-like structures made of BM components during follicle development. By combining confocal microscopy with the topographic and the tapping mode of the AFM, we were able to determine that these fibrils are stiffer than the BM surrounding the fibrils. It has been recently shown that fibril-like structures are formed in between the lateral sides of epithelial cells and then are laid on the BM. This indicates that the fibril-like structures are not on top of the BM but are embedded into it. It remains then possible that the AFM does not detect all the fibrils when measures are taken with a 50 nm indentation. Finally, the possibility to probe the same sample at different positions is crucial to detect variations that can be correlated with the biology of the sample. This possibility opens up the exploration of the relationship between epithelial morphogenesis and BM stiffness. This also makes this technique extremely powerful to establish the link between BM structure and stiffness. For instance, when the AFM is coupled to a macro-fluorescent microscope, this allowed the detection of variation in BM stiffness above WT cells or above cells impaired to secrete any BM components. Finally, this possibility also provides valuable information about the dynamics of BM remodelling.

Although it has been shown that BM remodelling occurs while tissues develop, like during branching morphogenesis, it remains to clarify how its mechanical properties evolve in function of epithelial morphogenesis (Daley et al., 2008; Kai and Spradling, 2003). Over the last five years, *Drosophila* ovarian follicle development has become a major model to study the role of the BM during epithelial morphogenesis for two main reasons (Bilder and Haigo, 2012; Isabella and Horne-Badovinac, 2015). First, the BM is the most external layer in this model, which makes it easy to observe it. Second, observation of ex-vivo follicles show that the follicle rotates inside the BM from stage 1 to stage 8 and follicular cells deposits BM fibrils-like structure perpendicular to the elongation axis (Haigo and Bilder, 2011). From all the analyses, a model of a BM corset constraining the elongation of the follicles has emerged. Our data validate this model as we show that BM stiffness is increasing during the rotation and that fibril-like structures are stiffer than the BM surrounding the fibrils. However, the increase of rigidity during the rotation is not only due to the incorporation of the fibrils as analyses of the 10x10 matrix show that the increase also concerns the BM without fibrils. This indicates that BM structure is changing during the rotation and that these modifications do not only correspond to the incorporation of newly formed fibrils (Isabella and Horne-Badovinac, 2016). One possibility is that the increase of stiffness is due to a better incorporation of BM materials from the epithelial cells than those from the fat body (Van De Bor et al., 2015). Realizing similar experiments after blocking secretion of BM materials from the fat body or from the oenocytes will be informative to this regard.

In vitro analyses have pointed out a role of BM mechanical properties and of BM structure to control the speed and the direction of the migrating cells. Migrating cells move

toward stiffer surface and orient their migration when facing matrices that present riddles (Ehrbar et al., 2011). From these in vitro observations and our data, it suggests that follicular cells may speed up their migration from stage 6 onwards because the increase of the BM stiffness and because of the deposition of the fibrils that could help the cells to orientate their migration.

Our analyses also encompass the stage 9, which corresponds to the cuboidal-to-squamous and cuboidal-to-columnar transitions. Based on fibril orientation analyses and on the stiffness measurements, we show first that BM structure is locally remodelled during this stage, second, that this remodelling leads to the generation of a gradient of stiffness with a softer BM above the epithelial cells that are instructed to undergo a cuboidal-to-squamous transition. Our data also show that this softening depends on TGF β expression. Future analyses should address the mechanisms by which TGF β soften the BM. One possibility would be through induction of protease expression, such as MMPs that are known to alter BM structure (Page-McCaw et al., 2007). Interestingly, we show that BM remodelling and subsequent interactions with the basal side of the follicular cells through Integrin are also required for cell flattening. This suggests that Integrin signalling is likely to be involved in increasing basal surface area. Understanding the role of Integrin signalling will notably require to determine whether the proteolytic cleavage of ECM components by MMPs influences this signalling or whether it plays a role to release TGF β molecules embedded in the matrix, to modify BM mechanical properties and/or to convert structural molecules into signalling molecules.

To conclude, although an increasing number of studies points out that epithelial morphogenesis depends on external forces, our analysis show that understanding the constraint providing by the BM is equally important to shape cells. Deciphering the mechanical properties of the BM on which epithelial cells rest on, will provide valuable information to understand epithelial morphogenesis in growing organs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fly stock

W¹¹¹⁸ ; *VikingGFP* (*vkg⁴⁵⁴*) ; *UAS :: Vkg RNAi* ; *UAS :: FBPH α EFBi RNAi* ; *UAS :: Fak RNAi* ; *UAS :: MMP1 RNAi* ; *UAS :: MMP2 RNAi* ; *UAS :: Pecan RNAi* ; *vkg^{ICO} FRT40A/CyO* was gift from D. Bilder (Rodriguez et al.1996) ; *mys^{XG43} FRT101/FM7* (Bunch et al., 1992) ; *UAS :: PH-PLC δ -GFP* (Gervais et al., 2008).

Fly stocks were cultured at 25°C on standard food. The mutant stocks used are *vkg^{ICO} FRT40A* was gift from D. Bilder (Haigo and Bilder, 2011). Canton-S and *vkg*-GFP were used as WT. Permanent clones were generated by Flipase-mediated mitotic recombination on *FRT40A* chromosome (Golic and Lindquist, 1989)(Xu and Rubin, 1993). All crosses were performed at 25°C and adult females were fed on abundant yeast diet for 3 days prior to dissection. Ovaries from females were dissected directly into fixative 3 to 4 days after Flipase induction and stained following the protocol described in Grammont and Irvine (2001). The following antibodies were used: mouse anti-GFP (1:500; Sigma-Aldrich), goat anti-GFP (1:1000; Abcam), mouse anti-Eya (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)), rat anti-ECad (1:200; DSHB). Once stained, the follicles were staged by calculating the ratio between the length of oocyte (lo) and the follicle (lf) and according to Spradling (Spradling, 1993). To avoid fluctuations of the depth of the follicles that are squeezed by the coverslip, each slide contains 15 ovaries, from which stage 11 to 14 are removed. After dissection of the follicles, most of the PBS is removed and 20 μ l of the Imaging medium (PBS/Glycerol (25/75) (v/v)) is added before being covered by a 22/32 mm coverslip.

Collagenase treatments

Collagenase (1000 Units/ml CLSP; Worthington Biochemical Corp) was added to a final volume of 200 μ l of culturing medium, the reactions were stopped with 10mM L-cysteine.

Microscopy

Preparations were examined using confocal microscope (LSM 710 or LSM 700 for live-imaging ; Carl Zeiss MicroImagin, Inc.) with 40x/NA 1.3 plan-Neofluar and 63x/NA 1.4 plan-Apochromat or 40x/NA A1.1 water immersion lens. All imaging was performed at RT. Images were examined using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). For all included images, a projection of all the z sections in which the StC are visible is presented.

FCs morphometric analysis

Image segmentation and quantification on early or mid stage 9 follicles was performed using ImageJ macro described in the previous paper (Brigaud et al., 2015).

Col IV quantifications

The measurements were performed on top of each follicle at different stages of development. Staging of *D. melanogaster* egg chambers, the A/P maximal length was measured from each follicle and classify according to the guide provided in Spradling, 1993. Data quantification for Col IV fibrils was performed on 50 x 50 μ m squares. Images were acquired at 300 nm steps at 1.0 airy unit. Following cropping of representative areas for further analysis, image z-stacks were identified using intensity threshold algorithm for each sample. Objects touching the edges of images were excluded from further analysis.

ImageJ software was used to analyse each crops and quantify collagen IV by averaging intensity. Noise was removed from analysis using a minimal volume threshold. Objects were recognized (circularity and number of pixel²) and analysed (area, angle and number) using "Analyze Particles...". The angle of the major axis of each object is reported in degrees relative to the x-axis of each image (A-P axis of each follicle) at 0 degrees using Rozeta 2.0 (Pazera-Software).

Atomic force microscopy (AFM)

AFM indentation experiments were carried out with a Catalyst Bioscope (Bruker Nano Surface, Santa Barbara, CA), that was mounted on an optical microscope (MacroFluo, Leica) using an objective (10x objective, Mitutuyo). A Nanoscope V controller and Nanoscope software versions 8.15 were utilized. All quantitative measurements were performed using standard pyramidal tips (DNP-10, Bruker AFM probes, Inc.). The tip radius is given by the manufacturer to be 20 nm. The spring constant of cantilevers was measured using the thermal tuning method (Hutter and Bechhoefer, 1993; Levy and Maaloum, 2002) and was ranged from 0.03–0.12 N/m. The deflection sensitivity of cantilevers was calibrated against a clean silicon wafer. All experiments were made under Schneider medium at room temperature and the standard cantilever holder for operation in liquid was used. Follicles were dissected from the ovaries. The upper side of the sample was adhered to a Petri dish using a L-polylysine. Then the Petri dish was positioned on an XY motorized stage and held by a magnetic clamp. Then, the AFM head was mounted on the stage and an approximated positioning with respect to the cantilever was done using the optical microscope.

To record surface topology and to create an elastic modulus map, PeakForce QNM AFM mode is used. The foundation of material property mapping with PeakForce QNM is the ability of the system to acquire and analyze the individual force curves from each tap that occurs during the imaging process. In this mode, the probe is oscillated at a low frequency (0.5 kHz), capturing a force curve each time the AFM tip taps on the sample's surface. The maximum force during imaging was 3 nN. For each sample, the topology and elastic modulus images were collected from different places of the sample over sizes of 10×10 to $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ and at a digital resolution of $128 \text{ pixels} \times 128 \text{ pixels}$. The 0.3 Hz scanning rate was used.

To record force curve the contact mode is used. The foundation of material property mapping with contact mode is the ability of the system to acquire and analyze the individual force curves from each tap that occurs during the acquisition. Each AFM measurements consists of the analysis of 100 force curves extracted from 10×10 matrices with indentation points spaced 150 nm apart.

In this both technique, the elastic modulus is derived from the force-indentation curves by using the Hertz-Sneddon model (Sneddon, 1965). It assumed a rigid cone indenting a flat surface:

$$F = (2/\pi) \cdot (E_s / (1 - \nu_s^2)) \cdot \tan(\alpha) \cdot \delta^2$$

F is the force from force curve, E_s is the Young's modulus, ν is the Poisson's ratio, α is the half-angle of the indenter and δ is the indentation.

Here, we assumed our sample is perfectly incompressible so that the Poisson's ratio used is 0.5. However, since neither the Poisson's ratio nor the tip shape is accurately known, we report in this work only an 'apparent modulus' (E_a).

Electron microscopy (SEM)

Ovaries were dissected to separate follicles from germarium to stage 11 in a fixative solution of 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M pH 7.4, and leave for several days at 4°C. After extensive washing in 0.1 M sodium cacodylate buffer with 0.003M CaCl₂ and 0.2M glucose samples were postfixed in 0.1M sodium cacodylate buffer with 0.003M CaCl₂, 0.15M Glucose and 1% OsO₄ for 30 minutes at room temperature, briefly rinsed in distilled water and dehydrated through a graded series of ethanol solutions (from 30° to 100°) and two baths of acetone 10 min for each. Then samples were dessicated in a Critical Point Dryer (CPD) and put in a sputter coater for 3 minutes for covering with gold-palladium before observation on a SEM Hitachi S-800 FEG at an accelerating voltage of 5 KV.

Electron microscopy (TEM)

Ovaries were dissected in a fixative solution (2% glutaraldehyde, 0.5% paraformaldehyde in 0.1M cacodylate buffer) to separate follicles at different stages and fixed for at least 4 hours at room temperature. Samples were washed four times in 0.15M cacodylate buffer and leave overnight at 4°C. Then incubated for 1 hour in 0.15M cacodylate buffer (pH7.4) containing 1% OsO₄, washed for 5 minutes in distilled water and dehydrated through a graded series of ethanol solutions from 30° to 100°, 20 minutes for each bath and two baths of propylene oxide for 15 min each. After substitution and impregnation, follicles were embedded in epoxy resin in flat silicon molds and polymerized at 56°C for 48h. Ultrathin sections were cut parallel or perpendicular to the AP axes of follicles with a UC7 Leica ultramicrotome. Ultrathin sections were contrasted in aqueous uranyl-acetate and

lead citrate solutions using a Leica ultrastainer. Sections were observed with a Philips CM12 transmission electron microscope at 120Kv.

Data analysis

All data graphs are reported as mean $\pm$ standard deviation. Images were processed and assembled using PowerPoint 2011 (Microsoft) and ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Statistical analysis was performed using R software (RStudio, Inc), with alpha levels for all statistical tests set to 5%. Graphs were produced using Excel 2011 (Microsoft).

REFERENCES

- Bilder, D. and Haigo, S. L. (2012). Expanding the Morphogenetic Repertoire: Perspectives from the *Drosophila* Egg. *Dev. Cell* 22, 12–23.
- Brigaud, I., Duteyrat, J.-L., Chlasta, J., Le Bail, S., Couderc, J.-L. and Grammont, M. Transforming Growth Factor β /activin signalling induces epithelial cell flattening during *Drosophila* oogenesis.
- Cetera, M., Juan, G. R. R., Oakes, P. W., Fairchild, M. J., Tanentzapf, G., Gardel, M. L. and Horne-, S. (2015). actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation.
- Daley, W. P. and Yamada, K. M. (2013). ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 408–414.
- Daley, W. P., Peters, S. B. and Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.* 121, 255–64.
- Ehrbar, M., Sala, A., Lienemann, P., Ranga, A., Mosiewicz, K., Bittermann, A., Rizzi, S. C., Weber, F. E. and Lutolf, M. P. (2011). Elucidating the role of matrix stiffness in 3D cell migration and remodeling. *Biophys. J.*
- Golic, K. G. and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499–509.
- Haigo, S. L. and Bilder, D. (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science* 331, 1071–1074.
- He, L., Wang, X., Tang, H. L. and Montell, D. J. (2010). Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat. Cell Biol.* 12, 1133–1142.
- Horne-Badovinac, S. and Bilder, D. (2005). Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev Dyn* 232, 559–574.
- Hynes, R. O. (2014). Stretching the boundaries of extracellular matrix research. *Nat. Publ. Gr.* 15, 761–763.
- Hynes, R. O. and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a004903.
- Isabella, A. J. and Horne-Badovinac, S. (2015). Building from the Ground up: Basement Membranes in *Drosophila* Development. *Curr. Top. Membr.* 76, 305–336.
- Isabella, A. J. and Horne-Badovinac, S. (2016). Rab10-Mediated Secretion Synergizes with Tissue Movement to Build a Polarized Basement Membrane Architecture for Organ Morphogenesis. *Dev. Cell.*
- Kai, T. and Spradling, A. (2003). An empty *Drosophila* stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4633–4638.
- Kai, F., Laklai, H. and Weaver, V. M. (2016). Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol.* 26, 486–497.
- King, R. C. (1970). *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press.
- Lavanya Devi, A. L., Nongthomba, U. and Bobji, M. S. (2016). Quantitative characterization of adhesion and stiffness of corneal lens of *Drosophila melanogaster* using atomic force microscopy. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 53, 161–173.
- Milani, P., Gholamirad, M., Traas, J., Arnéodo, A., Boudaoud, A., Argoul, F. and Hamant, O. (2011). In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in *Arabidopsis* using atomic force microscopy. *Plant J.* 67, 1116–1123.

- Milani, P., Mirabet, V., Cellier, C., Rozier, F., Hamant, O., Das, P. and Boudaoud, A. (2014). Matching patterns of gene expression to mechanical stiffness at cell resolution through quantitative tandem epifluorescence and nano-indentation. *Plant Physiol.* 165, 1399–1408.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J. and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221–33.
- Paszek, M. J. and Weaver, V. M. (2004). The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 325–342.
- Pearson, J. R., Zurita, F., Tomás-Gallardo, L., Díaz-Torres, A., Díaz de la Loza, M. del C., Franze, K., Martín-Bermudo, M. D., González-Reyes, A., Lu, P., Weaver, V., et al. (2016). ECM-Regulator timp Is Required for Stem Cell Niche Organization and Cyst Production in the Drosophila Ovary. *PLOS Genet.* 12, e1005763.
- Saika, S., Saika, S., Liu, C.-Y., Azhar Philip Sanford, M. L., Doetschman, T., Gendron, R. L., W-C Kao, C. and W-Y Kao, W. TGF2 in Corneal Morphogenesis during Mouse Embryonic Development.
- Spradling, A. C. (1993). Development Genetics of Oogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. Bate, M.) and Martinez-Arias, A.), pp. 1–70. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tse, J. R. and Engler, A. J. (2011). Stiffness Gradients Mimicking In Vivo Tissue Variation Regulate Mesenchymal Stem Cell Fate. *PLoS One* 6, e15978.
- Van De Bor, V., Zimniak, G., Papone, L., Cerezo, D., Malbouyres, M., Juan, T., Ruggiero, F. and Noselli, S. (2015). Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Rep.* 1–15.
- 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. (2015). Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* 17, 678–688.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* 117, 1223–1237.
- Yurchenco, P. D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004911.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: BM fibril-like structures are remodelled during epithelial cell shape changes.

In all figures, anterior is to the left. **(A)** Schematic of an ovariole with a germarium and follicles at different stages (stage 1 (St.1), 2 (St.2), 5 (St.5), 8 (St.8), 9 (St.9) and 10 (St.10) follicles. Schematic representation of epithelial cell polarity and of cell shape changes are in the boxed areas A' and A'', respectively. The arrangement and identities of the oocyte (OO, arrow, coloured in brown), nurse cells (NC, arrow, light brown), main body follicular cells (FC, arrow, blue), stretched cells (red) and columnar cells (grey) are shown. A BM (arrow) surrounds the germarium and each follicle. **(B)** Ovariole with a BM containing Coll IV-GFP (green). **(C)** Schematic representation of follicle rotation. **(D)** Coll IV-GFP (green) puncta or polarized fibrils from stage 2 to 10 (scale bar: 1 μ m). **(D')** Measures of the fibril orientation relative to the A-P axis. **(E)** Evolution of the density of the fibrils from stage 8 to 10B. For each stage, 5 follicles have been analysed (see materials and methods). Error bars indicate s.e.m. ***, $p < 0.005$ t-test.

Figure 2: Method to measure BM stiffness in live ovarian follicles with AFM

(A) Diagram of the set-up used to image follicles and to obtain force curves with AFM. **(B)** A typical deflection curve obtained from the follicle. The abscissae axis (z on the figure) describes the motion the cantilever towards the sample. The 0 position on this axis is determined empirically by the user, and corresponds to the bending of the cantilever for a deflection maximum imposed by the user. As the surface resists penetration, the cantilever bends and a deflection is recorder. **(C)** Schematic representations of a light **(C)** or deep **(C')**

indentation on multi-layered tissues. **(D)** Electron microscopy of a WT stage 8 follicle. **(E)** Evolution of BM depth from germarium to stage 10 (for each stage, n=3). **(F)** Topographic map of BM from a decellularized follicle. **(G)** Each AFM measure consists of the analysis of 100 force curves extracted from 10x10 matrices with indentation points spaced 150 nm apart. Values for each force curve are color-coded. The use of a colour gradient allows the visualization of differences in stiffness from weak (blue) to strongest (red). **(H)** Representation of the stiffness of the follicle in function of the indentation.

Figure 3: The stiffness of the BM increases from stage 2 to stage 8

(A) Box and whisker plots of BM stiffness (kPa) from WT follicles or from follicles after collagenase treatment. Each sample represents at least 8 matrices from 8 follicles. In all figures with box and whisker plots, boxes extend from 25th to 75th percentile, with a line at the median. Whiskers extend to the most extreme values. **(B-C)** Force-indentation curves **(B)** or box and whisker plots **(C)** of BM stiffness (kPa) from stage 8 follicle, that are WT, genetically or mechanically impaired for BM component production. (For each condition, n=5). **(D)** Stage 9 follicle with clones of cells expressing RNAi against PH4aEFB. **D'** and **D''** represent the BM stiffness map of the box drawn in **D** with **(D')** or without **(D'')** the delimitation of the clone (shade of green). **(E)** BM stiffness map of an equivalent area from a WT stage 9 follicle. The use of a colour gradient allows the visualization of differences in stiffness from small (black) to large (white). Error bars indicate s.e.m. ***, p<0.005 t-test versus control.

Figure 4: The fibril-like structures stiffen the BM

(A) BM with Coll IV-GFP (green) at stage 8 (scale bar: 10 μ m). **(B)** Stiffness map of another BM at stage 8 (scale bar: 10 μ m). **A'** and **B'** are magnified views of the boxes drawn in **A** and **B**, respectively. **(C)** Representation of the height for a piece of BM of 5 μ m from a decellularized follicle. **(D)** BM with Coll IV-GFP (green) from a decellularized follicle (scale bar: 1 μ m). **D''** is a magnified view of the box drawn in **D**. **D''** correspond to the BM stiffness map of the magnified view of the box drawn in **D**. **(E)** 10x10 matrix of BM stiffness from a stage 8 follicle with each indentation point spaced 150 nm apart.

Figure 5: Local BM mechanical properties are controlled by cell flattening

(A) Schematic representation of a stage 9 follicle. The measurement points are indicated. **(B)** Evolution of the BM stiffness from stage 8 to stage 10. Each sample represents at least matrices from 10 follicles. **(C)** 4x4 μ m matrix of BM Stiffness at the junction between the area 3 and 4 at stage 10. **(D)** BM stiffness at stage 9 in WT follicles and in follicles expressing Dad (n=4). **(E)** BM stiffness at stage 8 in WT follicles and in follicles expressing Tkva (n=5). **(F-G)** Scanning electron microscopy from WT follicle (**F**) or from follicle after collagenase treatment (**G**). **F'** and **G'** are magnified views of the boxes drawn in **F** and **G**, respectively. Error bars indicate s.e.m. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005 t-test versus control. (scale bar: 50 μ m)

Figure 6: Cell flattening depends on interactions with the BM.

The yellow dotted line marks the A/P position of WT flattening StC. **(A-D)** Adherens junction are labelled with Ecad (white). **(A)** WT follicle (n=14). **(B)** Stage 9 follicle with *vk*

clones (marked by the absence of RFP expression) (n=12). **(C)** Stage 9 follicle with clones of cells over-expressing RNAi against PH4a-EFB (green) (n=21). **(D)** Stage 9 follicle with *mys* clones (marked by the absence of GFP expression) (n=17). **(E)** Stage 9 follicle with clones of cells over-expressing RNAi against Fak (green) (n=9). (scale bar: 20 μ m)

Figure 7: Fak controls StC flattening

(A, B, C) Apical surface area (Area) (A), shape (Aspect Ratio) (B) or direction of the cell elongation (Angle) (C) from WT cells or from RNAi-expressing cells against Fak in fonction of the row. Each sample represents at least n cells from early stage 9 follicles (n=8) ($l_o/l_f < 0,35$) or from mid stage 9 (n=9) ($0,35 < l_o/l_f < 0,45$).

Figure S1: BM fibril-like structures are remodelled during epithelial cell shape changes.

(A) Evolution of the expression of Coll-IV::GFP from germarium to stage 10. (B) Fibrils size and orientation relative to the A-P axis position during stage 9 (anterior and posterior). (C, D) Raw images of the BM at stage 8 (C') and 10 (D') and images obtained after used of ImageJ plugins to recognize puncta or fibrils used for data quantitation shown in Figure 1. (Scale bar: 1 μ m)

Figure S2. Method to measure BM stiffness in live ovarian follicles with AFM

(A-B) Force-indentation curves (A) or box and whisker plots (B) of BM stiffness (kPa) from WT stage 8 follicles that are incubated in standard medium or with 0.5 M NaCl. (For each condition, n=5). Error bars indicate s.e.m. **, $p < 0.01$ t-test versus control.

Figure S3. The stiffness of the BM increases during rotation

(A) 10x10 matrix of BM stiffness from stage 3, 5 or 7 follicles with each indentation point spaced 150 nm apart. Follicles are either WT or genetically or chemically impaired for BM structure (for each condition n= 5). (B) Stage 5 follicle with clones of cells over-expressing RNAi against PH4a-EFB (red). Coll-IV (green) is retained in the cytoplasm (n=21). B' is a magnified view of the box drawn in B. (C) Electron microscopy of a WT stage 8 follicle. (D) Electron microscopy of a stage 8 follicle expressing RNAi against *vkg* (n=4). (E) Electron microscopy of a stage 8 follicle expressing RNAi against PH4a-EFB (n=5). (F) Electron microscopy of a stage 8 follicle expressing RNAi against *Pcan* (n=3).

Figure S4. Local BM mechanical properties are controlled by cell flattening

(A-B) Force-indentation curves **(A)** and 10x10 matrices **(B)** from BM of a WT stage 8 **(A)**, 9 **(A')** and 10 **(A'')** follicles. Measures have been realized for 4 areas located along the A/P axis. **(C)** 10x10 matrices from BM of stage 9 follicles are either WT or genetically or chemically impaired for BM structure. **(D-E)** Force-indentation curves from BM of a stage 9 expressing Dad or a stage 8 expressing Tkva.

Figure 1

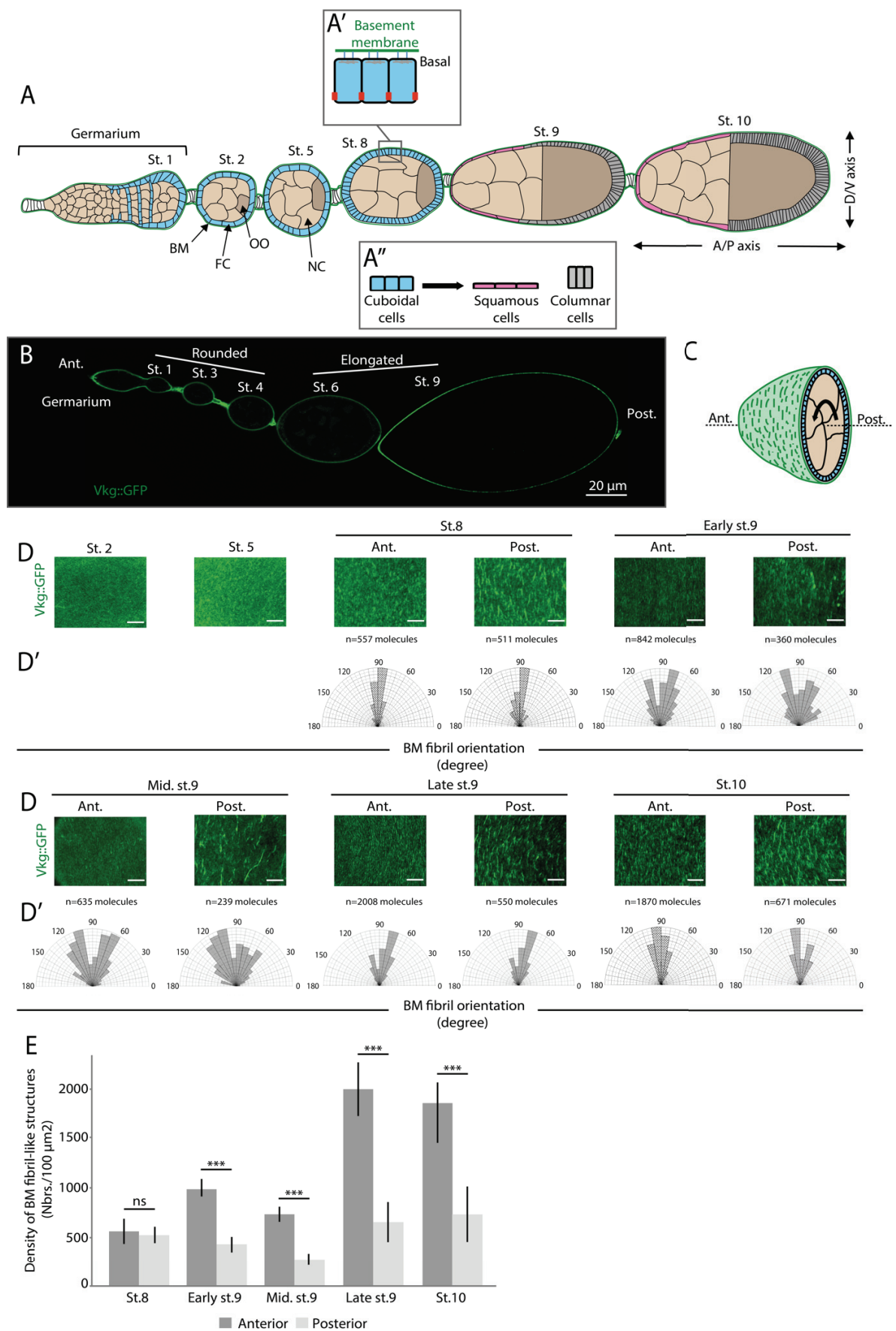


Figure 2

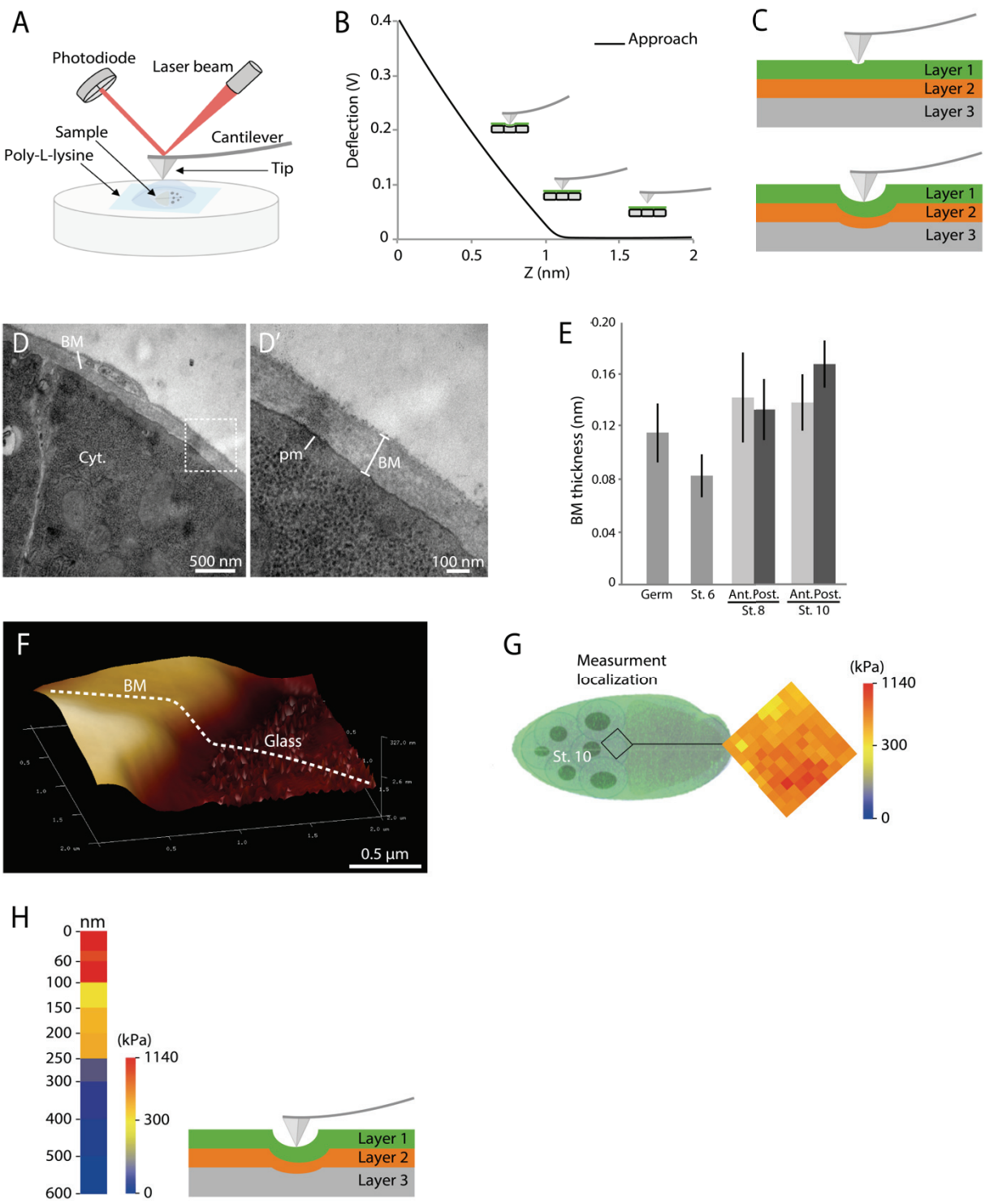


Figure 3

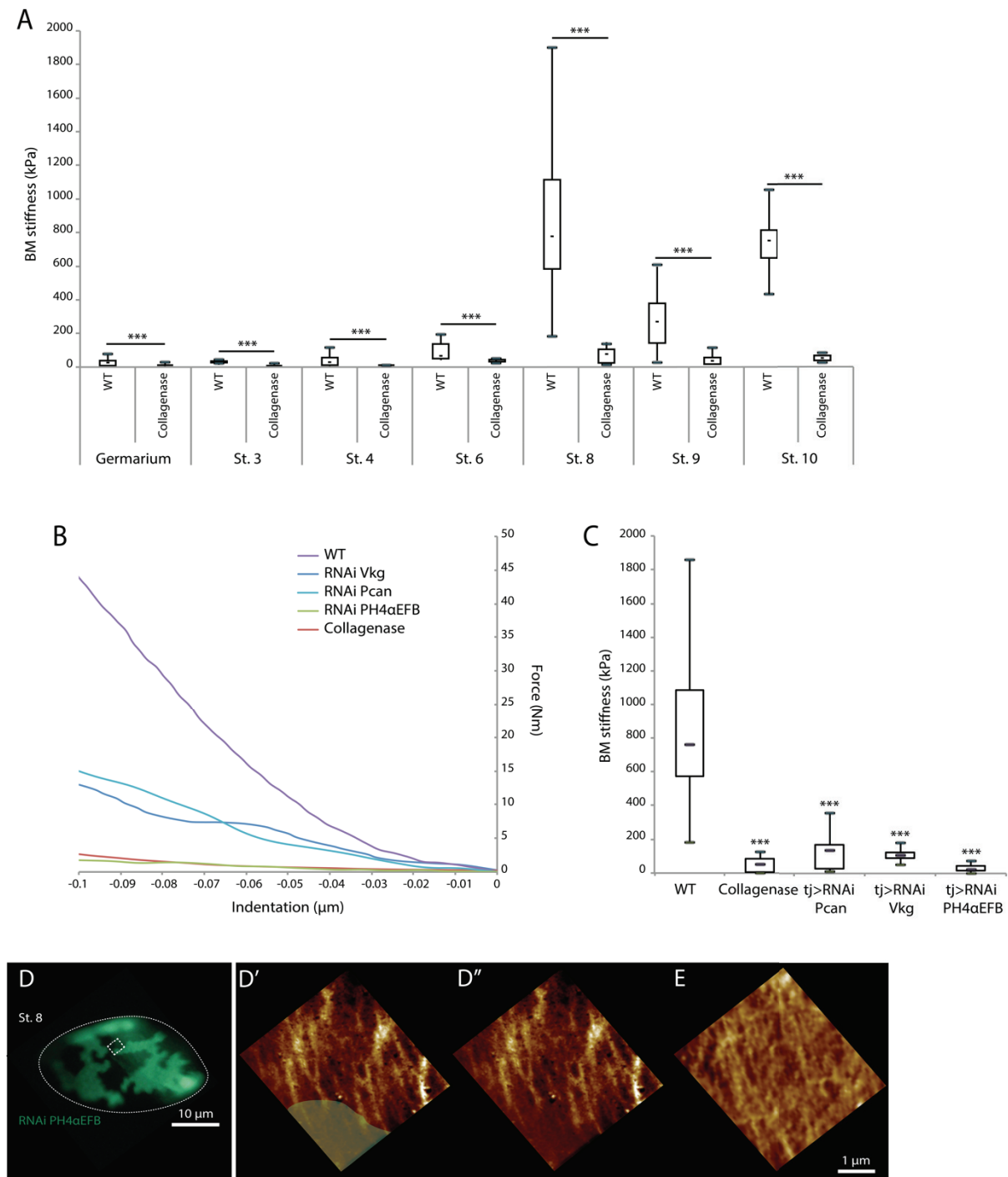


Figure 4

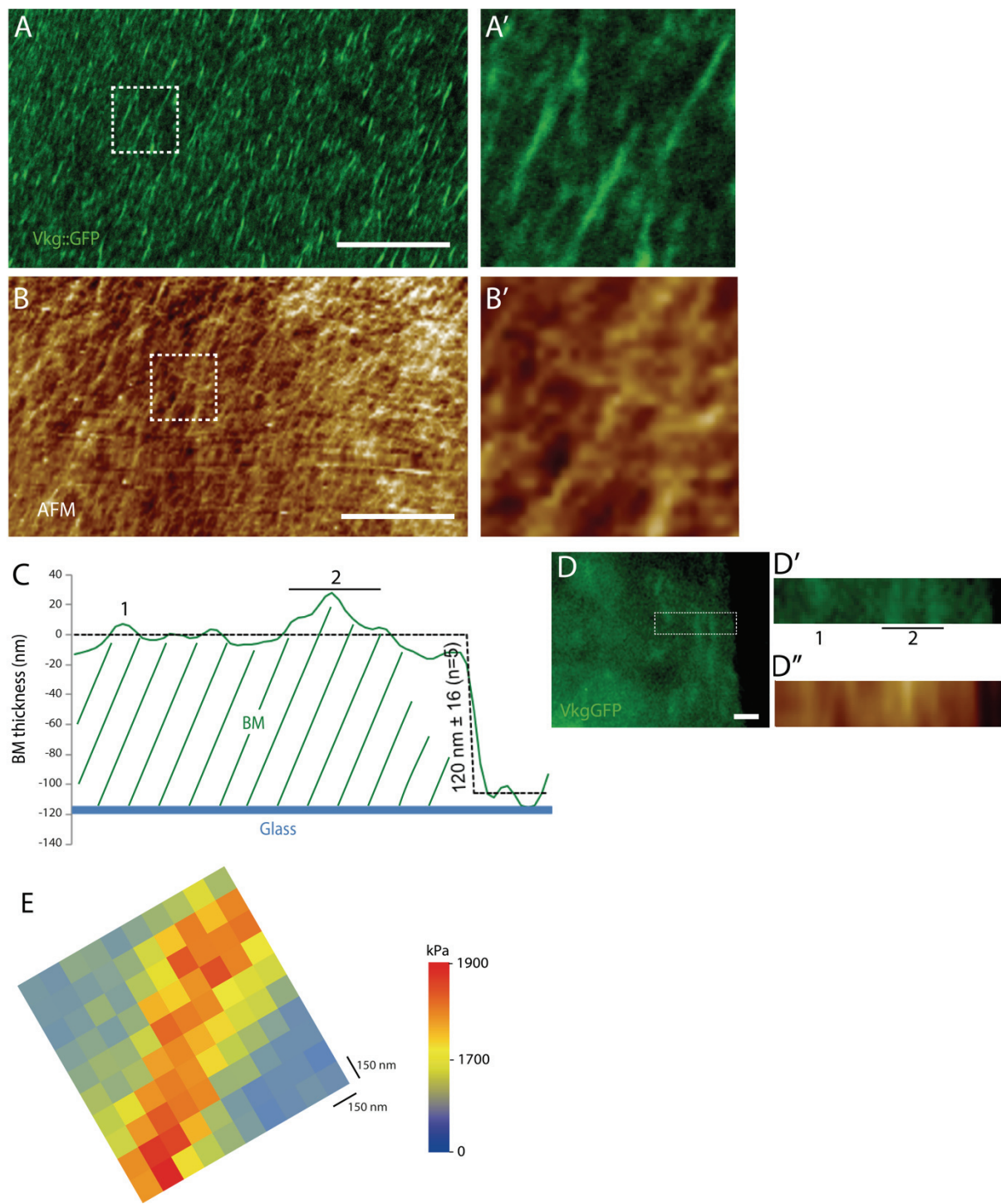


Figure 5

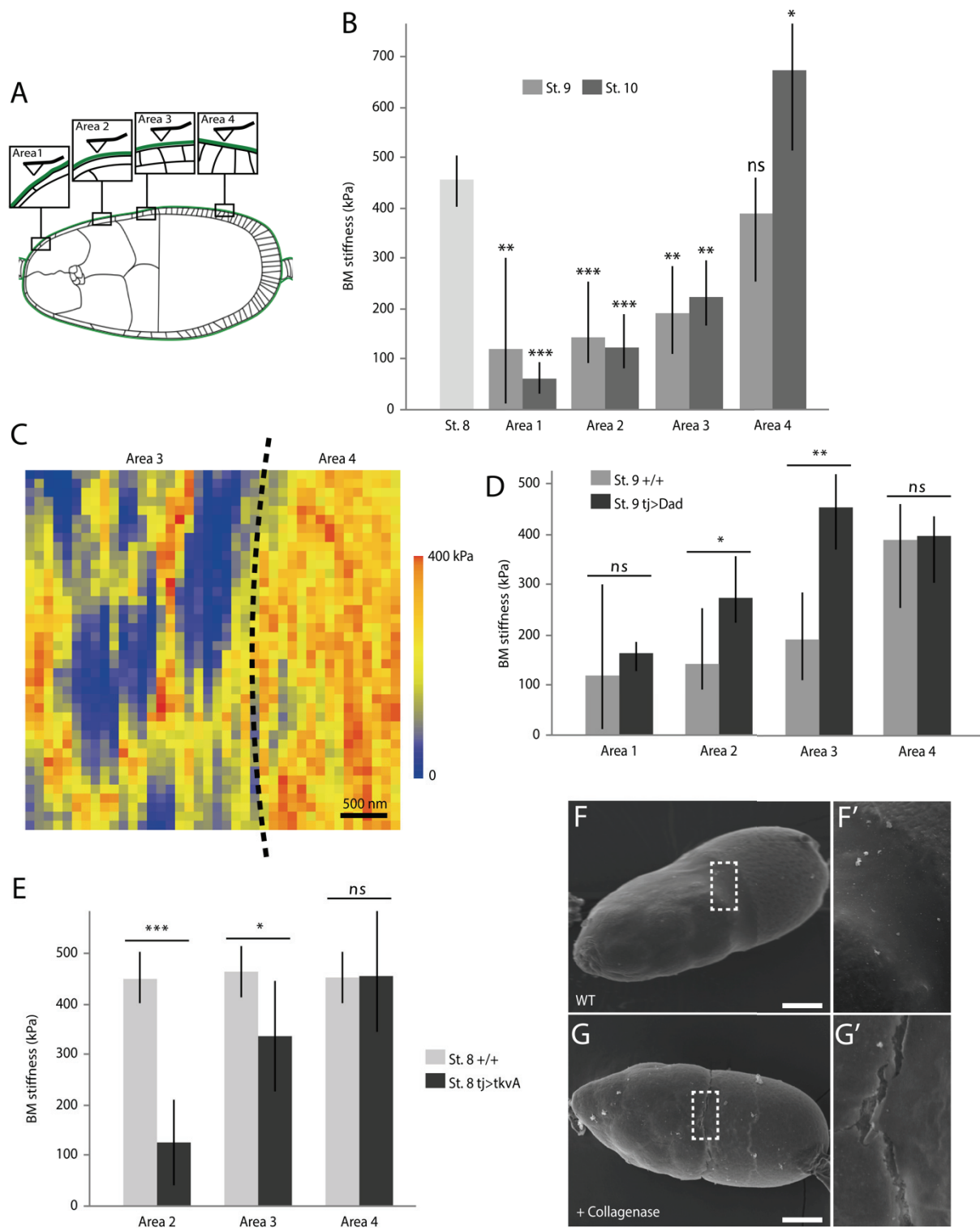


Figure 6

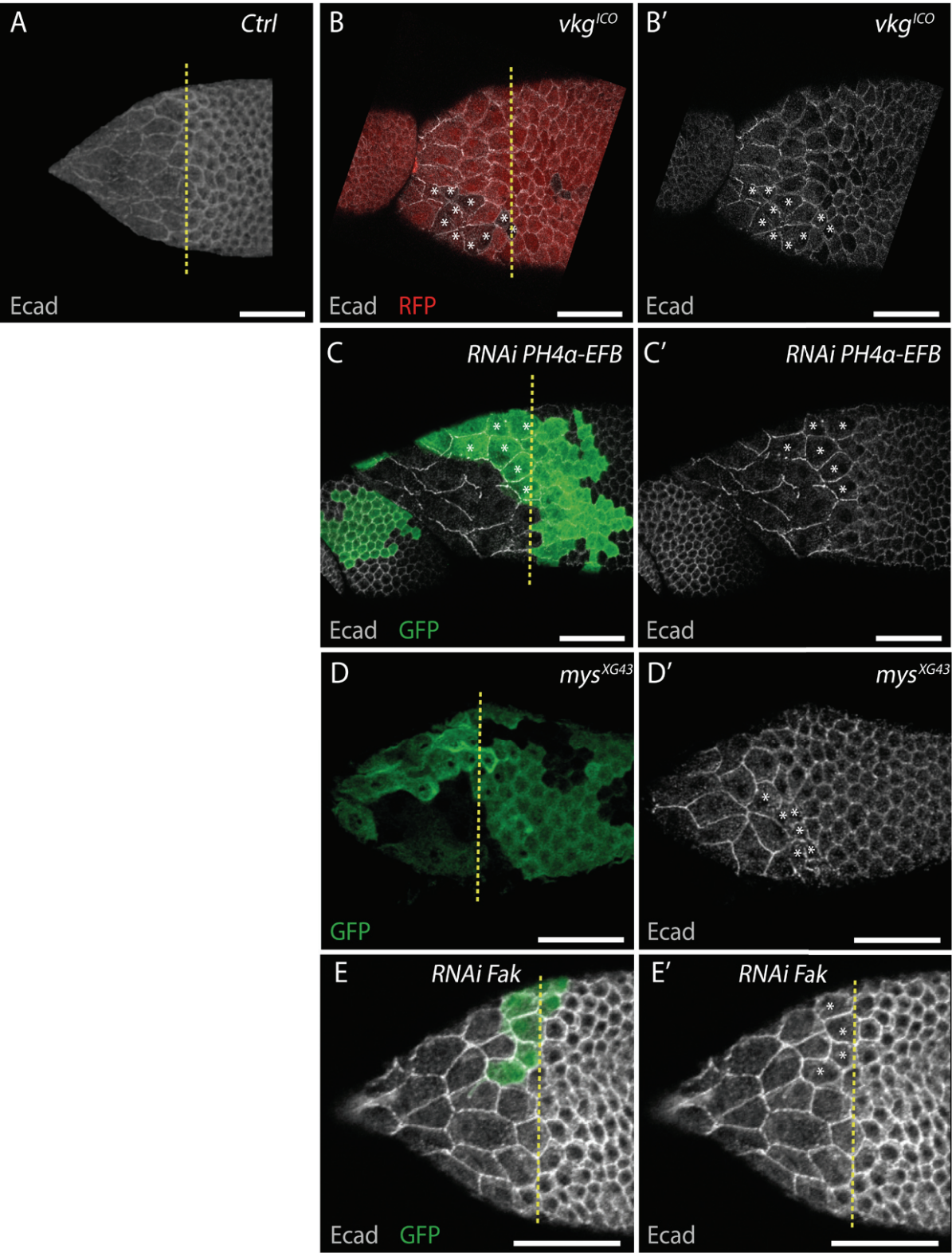


Figure 7

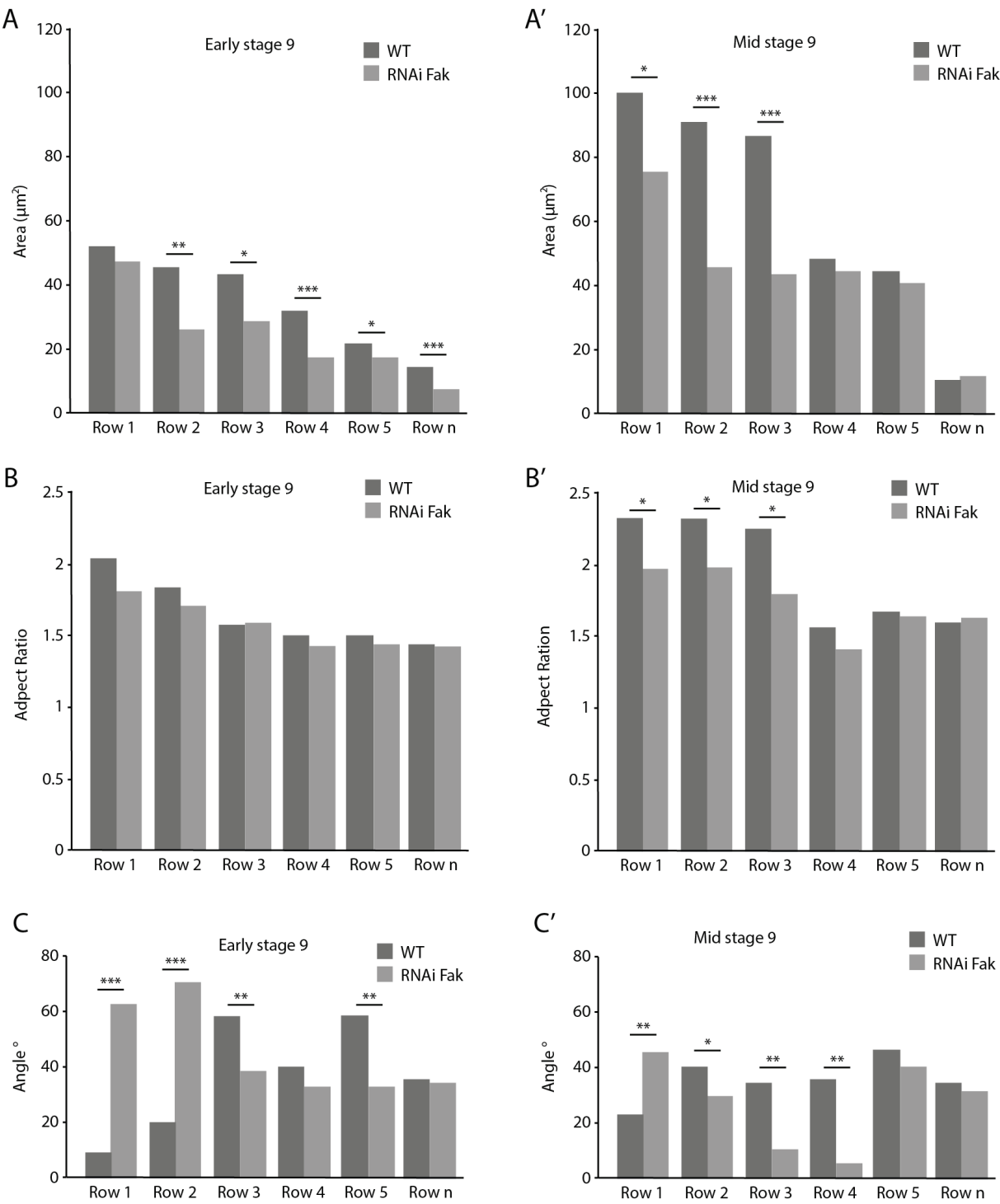


Figure S1

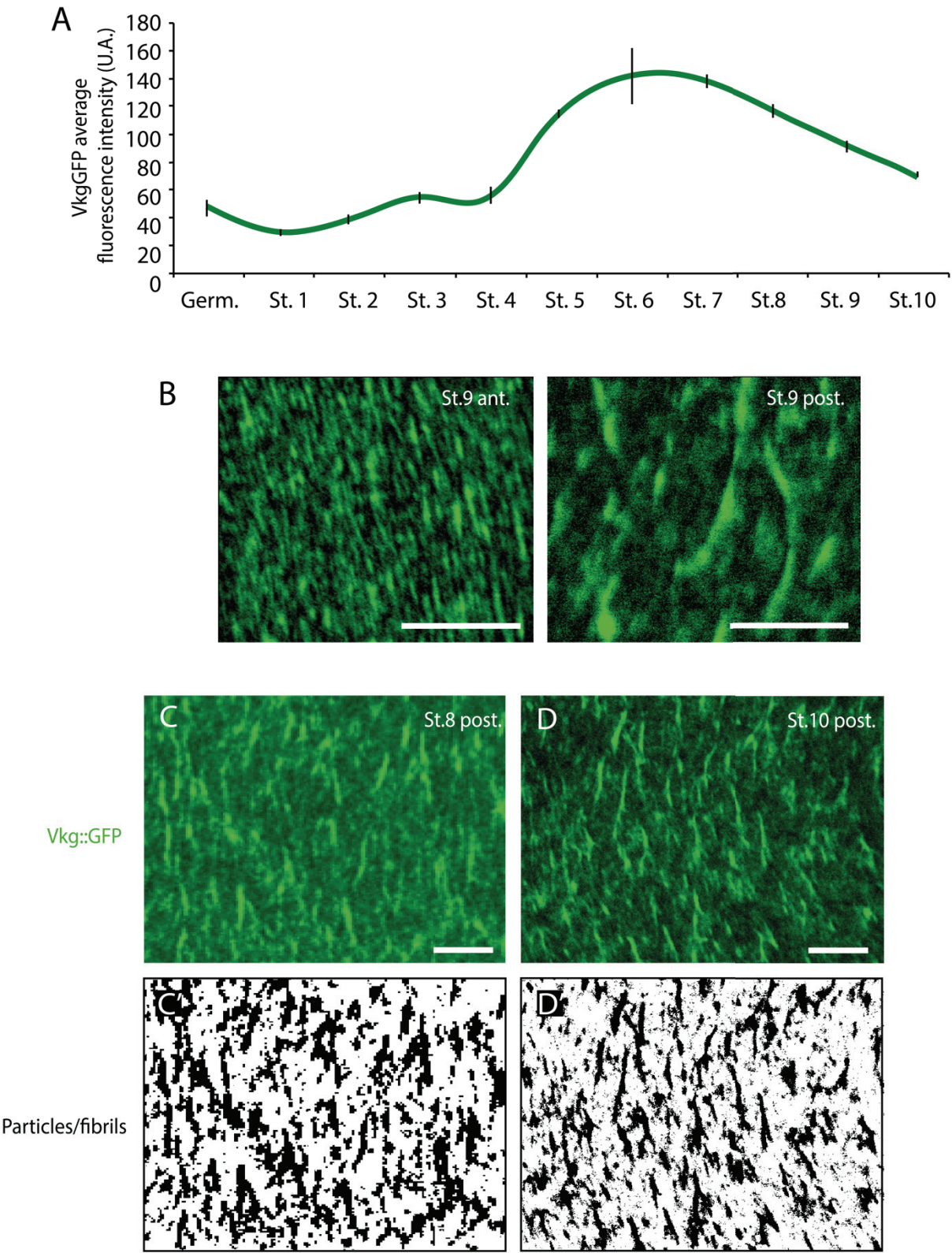


Figure S2

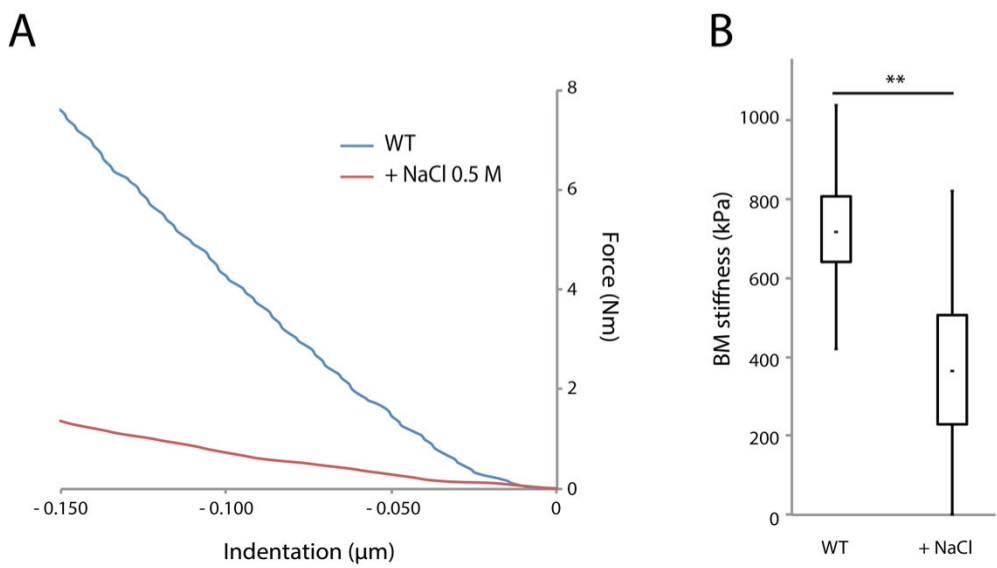


Figure S3

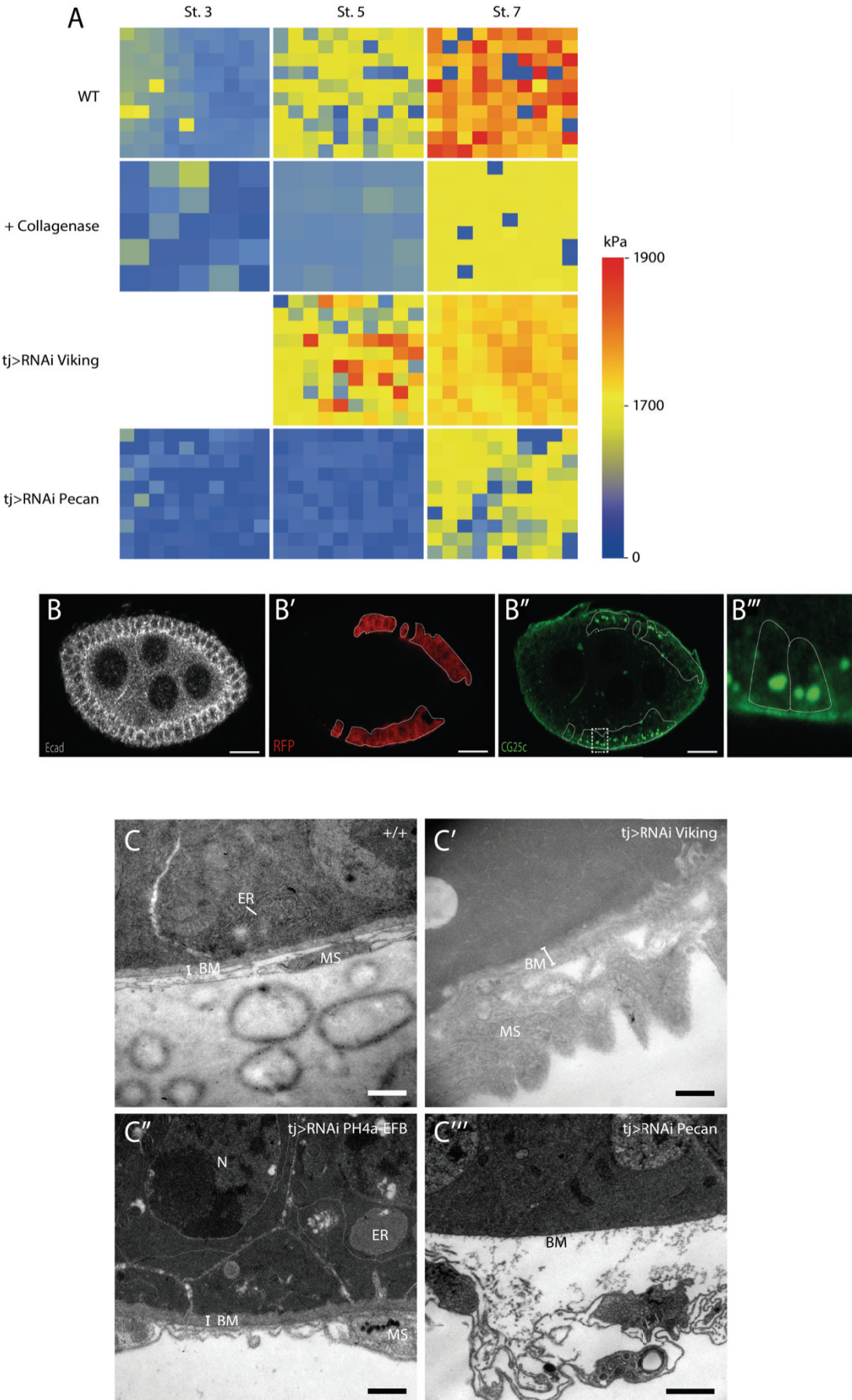
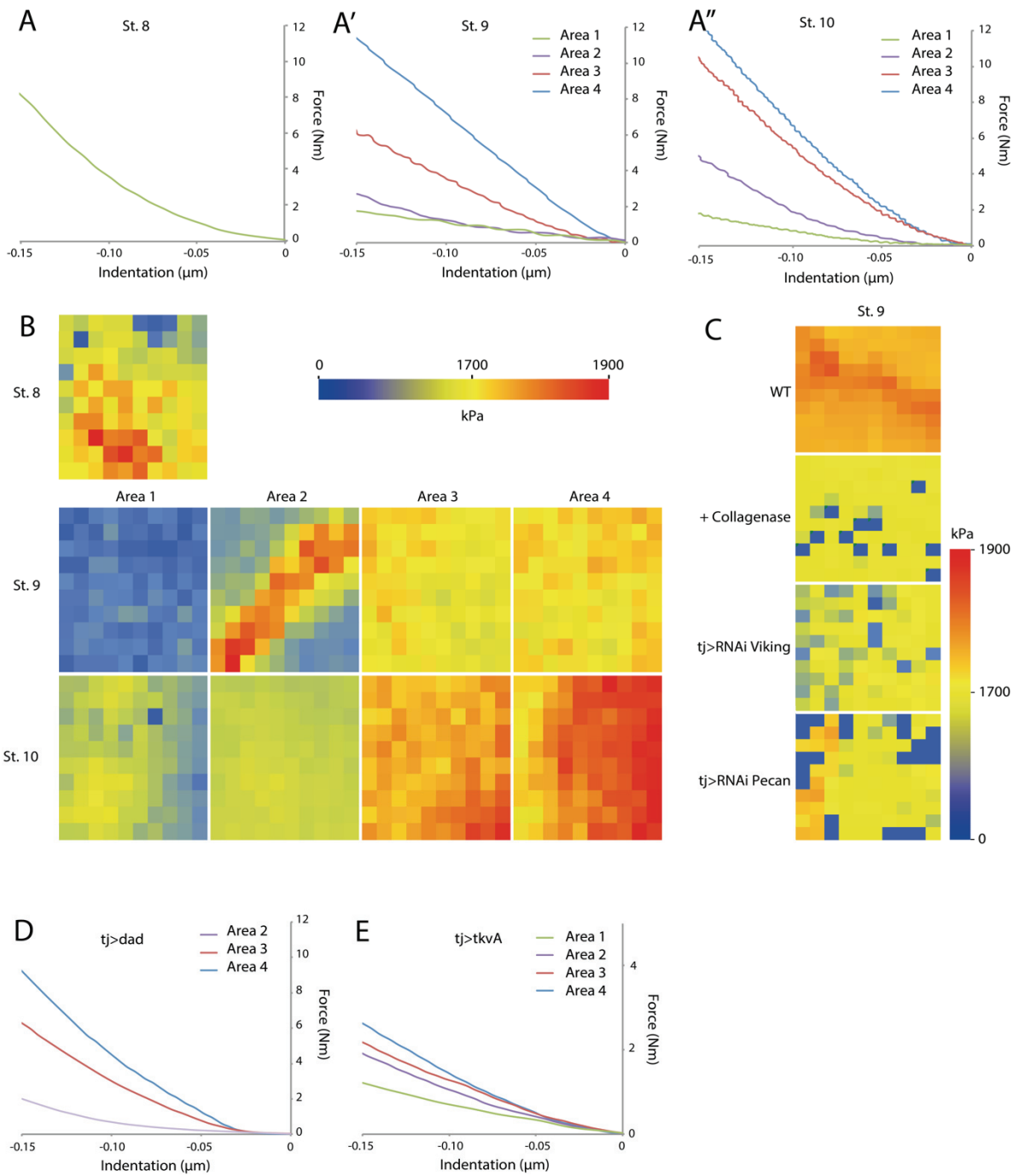


Figure S4



Partie II. MARS-ALT : méthode pour mesurer les valeurs métriques des cellules

Au cours de la formation d'un organe multicouche, les cellules épithéliales s'allongent, se contractent, migrent ou peuvent mourir (apoptose ou nécrose). Ces changements « d'état » font intervenir un certain nombre de voies de signalisation interne contrôlant, entre autres, la contraction/relâchement du cytosquelette d'actine et le remodelage des jonctions d'adhérences. Ces voies interviennent directement sur la forme des cellules épithéliales (volume, surfaces basale/apicale, sens de la morphogenèse).

Chez la *Drosophile*, le follicule ovarien est une structure composée de deux populations cellulaires : les CFs (externes) et les cellules issues de la lignée germinale (interne ou chambre d'œuf). Au cours de l'ovogenèse, les cellules internes vont croître tandis que les cellules externes vont, du stade 1 au stade 6 croître puis se multiplier de manière homogène autour de la chambre d'œuf. Au cours du stade 9, les CFs s'aplatissent autour des cellules nourricières tandis que les cellules autour de l'ovocyte deviennent des cellules en colonne. La très grande augmentation de taille des follicules du stade 6 (longueur (L) : 85 μm) au stade 9 (L : 300 μm) laisse sous-entendre une très grande capacité des CFs à s'adapter en l'absence de divisions. Ainsi, au sein d'une même population nous pouvons observer des comportements cellulaires différents. Afin de déterminer les paramètres métriques des cellules, nous avons appliqué une approche par segmentation cellulaire sur tissus vivants : MARS-ALT (Fernandez et al., 2010). Cette technique est une approche d'acquisitions multi-angles, de reconstructions 3D et de segmentations cellulaires permettant aujourd'hui d'identifier et de suivre une cellule ou un groupe de cellules, et d'en extraire leurs caractéristiques métriques.

Au cours de mon doctorat, j'ai mis au point i) une technique d'acquisition basée sur la rotation d'une plate-forme ou d'un axe, permettant l'acquisition multi-angles, ii) extraits les valeurs métriques des CFs ainsi que celles des cellules de la lignée germinale, iii) étudier leurs changements de forme au cours du stade 9.

A. MARS-ALT : protocole et acquisitions multi-angles

Nous avons développé une méthode d'acquisition multi-angles sur follicules vivants. Les follicules sont disséqués et séparés les uns des autres dans un milieu Schneider, la musculaire entourant les ovarioles est enlevée manuellement. La technique de segmentation MARS-ALT est basée sur l'algorithme de watershed c'est-à-dire sur le remplissage d'un espace de faible intensité de fluorescence délimité par une barrière de forte intensité de fluorescence. Ainsi il est primordial d'utiliser un marqueur stable, spécifique et localisé dans toute la hauteur des membranes. Toutes les mesures ont été effectuées sur la lignée de *Drosophila* : PH-PLC δ -GFP. Ce transgène contient une GFP fusionnée au domaine PIP2. Au cours de l'ovogenèse, le PIP2 est spécifiquement adressé aux membranes plasmiques des cellules de la lignée germinale et folliculaire. Ainsi, toutes les membranes sont marquées par la GFP.

Après dissection, les follicules ont été placés sur un axe préalablement traité par la L-polylysine ou semi-enterrés dans un milieu d'agarose 0,2 % (Figure 32-A). Afin d'augmenter la résolution en z, une série de 3 acquisitions ont été réalisées sur un microscope confocal (Zeiss LSM700 – objectif x40). Afin d'obtenir des acquisitions multi-angles, l'axe ou la plate-forme seront orientés à 0 °, -30 ° et +30 ° (Figure 32-B).

L'image fusionnée est obtenue à la suite de la reconnaissance spécifique de repères morphologiques communs présents sur les projections 2D des 3 acquisitions d'un même follicule (Figure 32-C). La première étape consiste à faire un recalage rigide pour orienter dans le même sens (X, Y et Z) les trois piles d'images du follicule délimités dans un espace 3 D. La deuxième étape consiste à faire un recalage affine et itérée de chaque voxel de chaque pile d'images dans une nouvelle matrice isotrope (même résolution dans les trois axes).

À partir de cette nouvelle image fusionnée, les cellules peuvent être segmentées suivant l'algorithme watershed (Figure 32-D). C'est lors de cette étape que les paramètres des voxels (nombre, taille) ainsi que ceux de contours sont utilisés selon le type cellulaire : folliculaire ou de la lignée germinale. Le contour permet d'inclure les zones de l'image fusionnée à segmenter selon le threshold max et min suivant la position dans le z. La reconnaissance des cellules est dépendante du marquage, de la qualité des trois

acquisitions et de la reconstruction. Actuellement, l'algorithme permet de segmenter 100 % d'un follicule à un stade 8 et plus de 60 % d'un follicule à un stade 9 et 10. D'après les segmentations réalisées, il semblerait que plus de 50 % des CFs ainsi que 60 % des cellules nourricières ont été segmentés correctement.

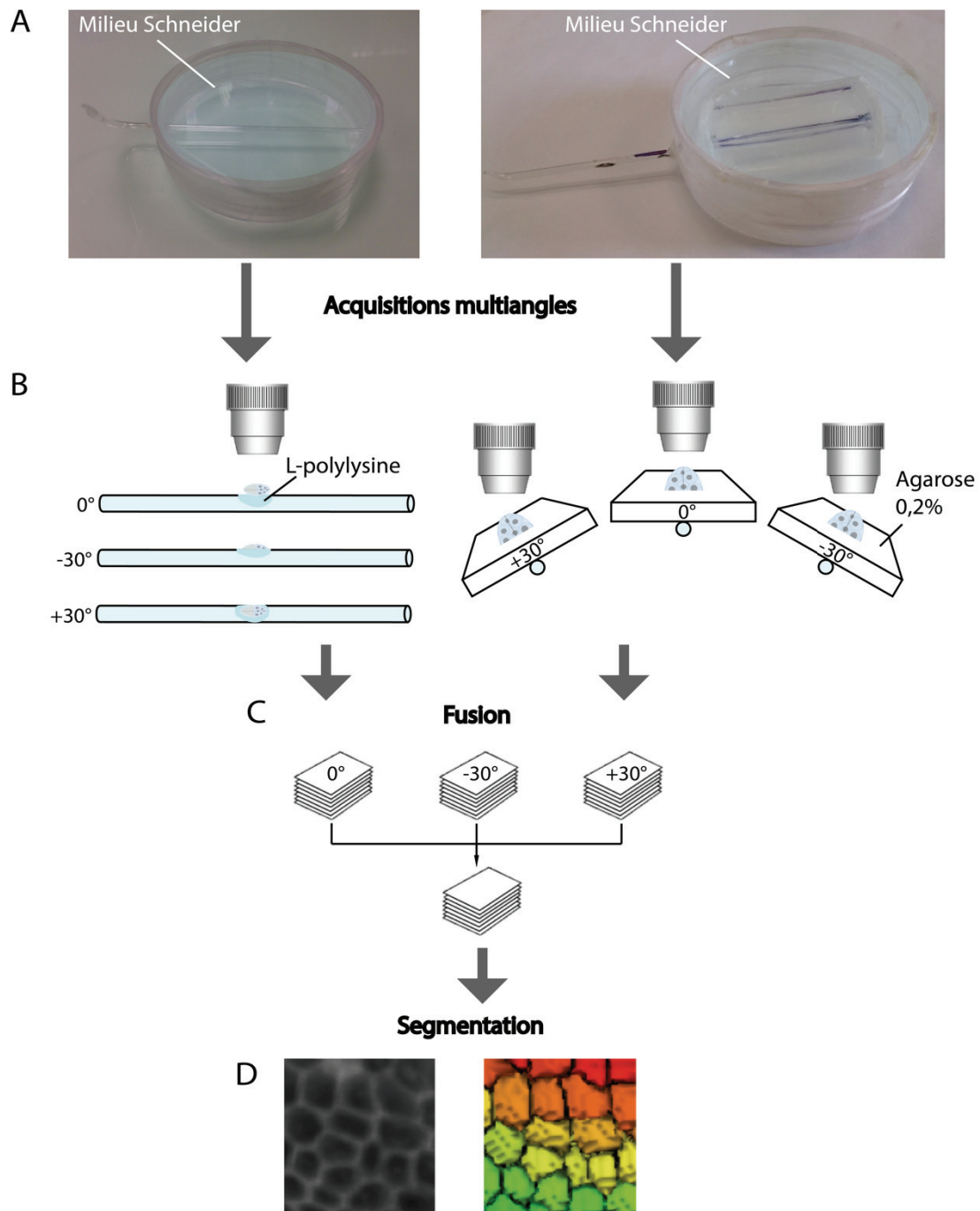


Figure 32 : Protocole d'acquisition multi-angles appliqué au follicule ovarien

(A) Dispositifs de fixation et l'acquisition d'un follicule sur un axe ou une platine. (B) la rotation du dispositif permet la prise des piles d'images permettant de créer une fusion (C) puis une segmentation (D) : image d'un groupe de cellules situées au-dessus de l'ovocyte à un stade 8.

B. Extraction des valeurs métriques des CFs

1. Au cours de l'ovogenèse : du stade 2 au stade 7

Nous avons analysé les follicules aux stades 2 à 7 (L : 25 à 110 μm) afin de suivre l'évolution des CFs au cours de leurs divisions et de la croissance du follicule. Afin de ne pas détériorer l'intégrité cellulaire, les follicules n'ont pas été séparés les uns des autres. Seule la gaine musculaire a été retirée suite à la dissection. Les ovarioles ont été placés sur un axe puis imagés selon le protocole décrit plus haut.

Nous avons segmenté (Figure 33-A) et extrait les valeurs métriques des CFs : volume, surface basale et hauteur (Figures 33-B-B' et B''). Premièrement, l'analyse de l'ovariole nous montre une augmentation du nombre de CFs ainsi qu'une augmentation de la taille globale du follicule (croissance : $\times 4$). Nous comptons respectivement 54 au stade 2 et 214 cellules au stade 7. Deuxièmement, cette augmentation du nombre de cellules s'accompagne d'une diminution de leurs surfaces basales : $49 \pm 26 \mu\text{m}^2$ au stade 2 et $26 \pm 17 \mu\text{m}^2$ au stade 7 (Figure 33-B). Troisièmement, nous remarquons un volume ($36 \pm 10 \mu\text{m}^3$) et une hauteur cellulaire ($1,15 \pm 0,2 \mu\text{m}$) homogène entre les stades.

Au regard des mesures intra-échantillons (antérieur/postérieur), nous n'observons pas de différence régionale. Ces résultats indiquent que les CFs se divisent afin de s'adapter à la croissance du follicule au cours de l'ovogenèse.

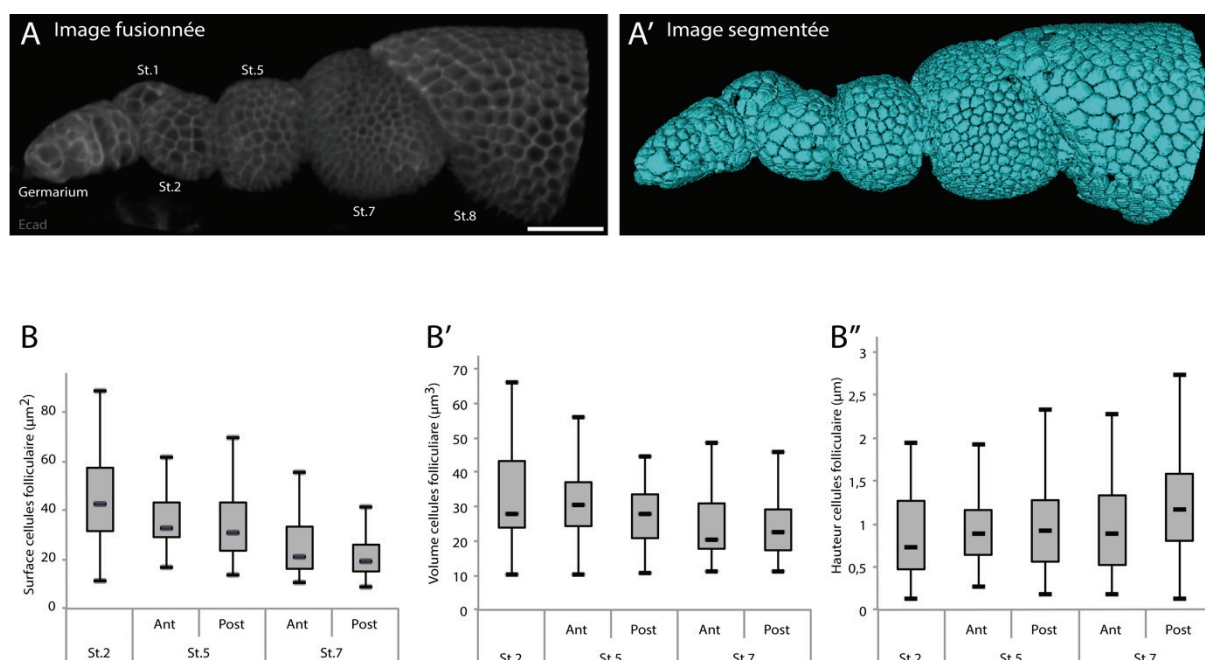


Figure 33 : Valeurs métriques des CFs au cours de l'ovogenèse

(A) Image fusionnée d'un ovariole composé d'un germarium, d'un stade 1 à 7. (B) Image obtenue après segmentation cellulaire, couleur arbitraire. (B, B' et B'') Respectivement l'aire, le volume et la hauteur des CFs. Echelle : 30 μm .

2. Au cours de l'ovogenèse : stade 8

Au stade 8, les follicules font en moyenne 165 μm de long (axe antéro-postérieur) et sont 1,5 x plus grand que les follicules au stade 7. Par rapport aux stades précédents, qui présentent une forme ronde, le stade 8 à une forme ovoïde. Il semble croître de manière anisotropique avec une préférence antéro-postérieur. Afin d'étudier les valeurs métriques des CFs au stade 8, nous avons séparé ce stade en 5 zones perpendiculaires à l'axe A/P (Figure 34-A). Concernant les CFs, nous observons que leurs volumes ($38,4 \pm 3,7 \mu\text{m}^3$) ainsi que leurs surfaces basales ($48,5 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$) ne changent pas entre les zones (Figure 34-B-B'). Cependant nous remarquons un changement dans la hauteur des cellules composant la zone 1 ($0,68 \pm 0,2 \mu\text{m}$) par rapport aux autres zones ($0,87 \pm 0,1 \mu\text{m}$) (Figure 34-B''). Les analyses des valeurs métriques des CFs au stade 8 suggèrent un remodelage des membranes latérales cellules/cellules dans la zone 1. D'après ces résultats, il semblerait que

la morphogenèse épithéliale observée au stade 9 démarre à un stade 8 par une diminution en antérieur de la hauteur des CFs.

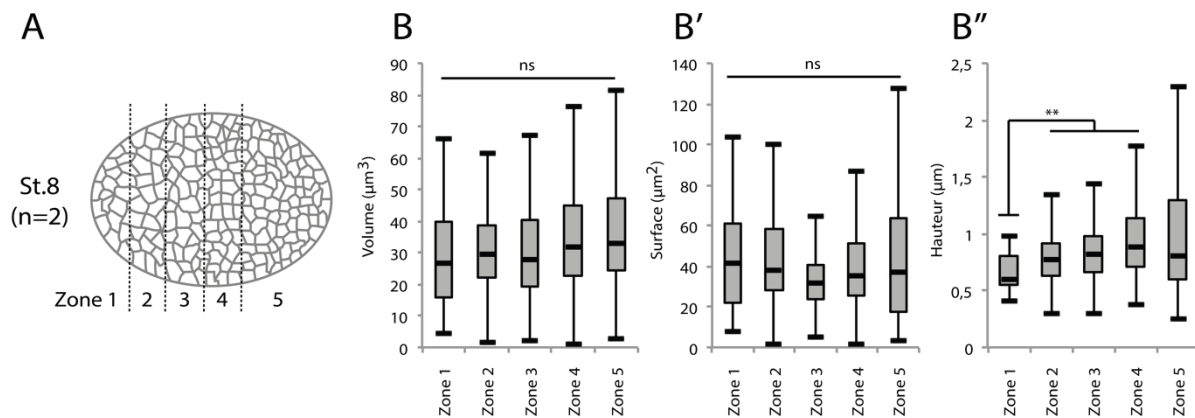


Figure 34 : Mesures des valeurs métriques au stade 8

(A) Représentation schématique d'un follicule au stade 8, la zone 1 correspond aux cellules à l'extrémité antérieure, alors que la zone 5, à l'extrémité postérieure. (B-B' et B'') Les valeurs métriques respectivement le volume, la surface basale et la hauteur ont été extraites suivant un algorithme développé sous python.

En parallèle de ces observations, nous remarquons un changement dans l'anisotropie des CFs antérieur (Figure 35). En effet, au stade 8, la surface basale des CFs est circulaire, à la fin du stade 8, nous remarquons un allongement en spiral des CFs antérieur (MARS-ALT n=2; confocal tissu fixé n=10), supposant un rôle de la rotation du follicule dans l'initiation de l'aplatissement des CFs au stade 9.

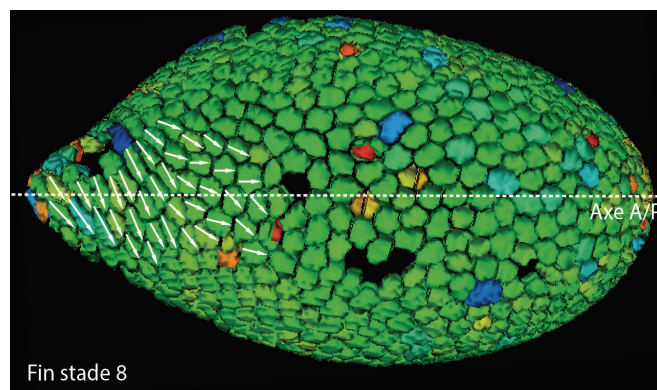


Figure 35 : Les CFs antérieures s'orientent en spirale et s'allongent au cours du stade 8

Segmentation d'un follicule au stade 8 (couleurs arbitraires). L'anisotropie des CFs est mesurée selon l'orientation du plus grand axe de la cellule (flèches blanches) par rapport à l'axe A/P.

3. Morphogenèse épithéliale au stade 9

Au stade 9, environ 50 cellules épithéliales s'aplatissent progressivement du pôle antérieur jusqu'au milieu du follicule ou les CFs commencent à devenir en colonne (Figure 36-A). Nous avons analysé les variations des valeurs métriques des CFs au début, milieu et fin de stade 9 par l'intermédiaire des images segmentées (Figure 36-A'). En coupe, nous pouvons observer l'extrême aplatissement des cellules squameuses (Figure 36-A''). Nous remarquons la présence de prolongements cytoplasmiques entre les cellules germinales (Flèches blanches). Ces prolongements sont des excroissances issues des cellules squameuses, imposés par la géométrie du tissu sous jacent et par la continuité du corset moléculaire de MB.

Afin de mesurer les conséquences de la morphogenèse épithéliale sur les CFs, nous avons séparé les follicules en 5 zones (Figure 36-B). Les zones 1 à 4 correspondent aux cellules squameuses (couleur bleue), alors que la zone 5 correspond aux des cellules en colonne. L'analyse des données métriques nous informe que : premièrement, la hauteur des cellules de la zone 1 ne varie pas au cours de la morphogenèse ($1,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$), mais restent globalement plus hautes que les cellules de la zone 2 et 3 (Figure 36-C). De plus, nous remarquons une diminution des hauteurs des cellules dans les zones 2, 3 et 4, ainsi qu'une augmentation dans la zone 5. Ces résultats suggèrent une dynamique d'aplatissement dépendante de la zone. En effet, la zone 3 diminue tout au long du stade 9, à l'inverse des zones 2 et 4 qui présentent des paliers entre les stades. Ainsi la morphogenèse épithéliale n'est pas un processus homogène, mais plutôt hétérogène le long de l'axe A/P pouvant dépendre de la position des cellules de la lignée germinale. Deuxièmement, nous observons une augmentation significative du volume (Figure 36 -C') ainsi que de la surface basale (Figure 36-C'') des CFs au cours de la morphogenèse.

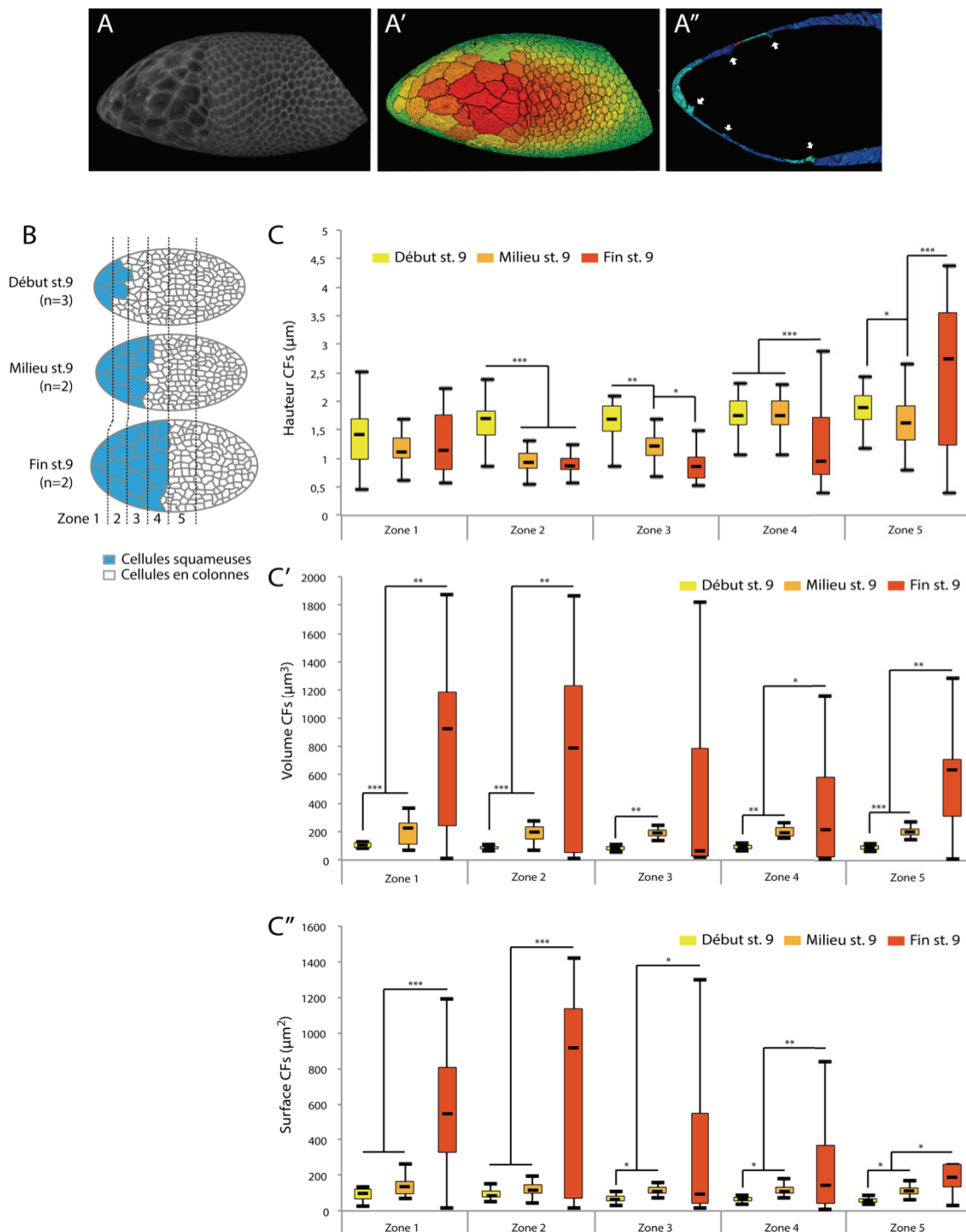


Figure 36 : Mesure des valeurs métriques au cours de la morphogenèse épithéliale

(A) Image fusionnée puis segmentée (A') d'un follicule au milieu d'un stade 9 (couleurs arbitraires). (A'') Coupe de l'image segmentée (A') montrant l'épaisseur des cellules squameuses et de cellules en colonnes. Prolongements cytoplasmiques des cellules squameuses (flèches blanches). Les cellules sont analysées selon leurs positions A/P ainsi que leurs stades de développement (B). Les valeurs de hauteur (C), de volume (C') ainsi que leurs surfaces basales (C'') ont été extraites selon le protocole adapté aux CFs.

4. Changement de forme des CFs

Afin d'étudier les formes cellulaires, nous avons modélisé les membranes plasmiques, en utilisant le barycentre des voxels situés dans la zone de contact entre deux cellules. Nous avons extrait les cellules localisées en antérieur pour les stades 2 à 7 et celles localisées dans la zone 3 pour les stades 8 et 9 (Figure 37). Ces zones correspondent, d'une part aux futures cellules squameuses, et d'autre part à la zone où le dynamisme cellulaire est le plus marqué.

Nous observons des morphologies différentes selon le stade de développement (Figure 37-A). Nous observons que les CFs au stade 5 présentent une morphologie cubique, rapport hauteur/largeur (h/l) de 0,85. Au stade 8, nous observons un allongement A/P et un rapport h/l égale à 0,26. A ce stade, nous remarquons une forme en trapèze des CFs, laissant présager l'apparition de forces tensions différentes selon la face cellulaire (apical/basal). Au stade 9, les CFs s'allongent dramatiquement et parallèlement à l'axe A/P ($h/l = 0,06$). Au cours de l'ovogenèse, nous observons une augmentation significative de la surface basale des CFs (x 12) (Figure 37-B).

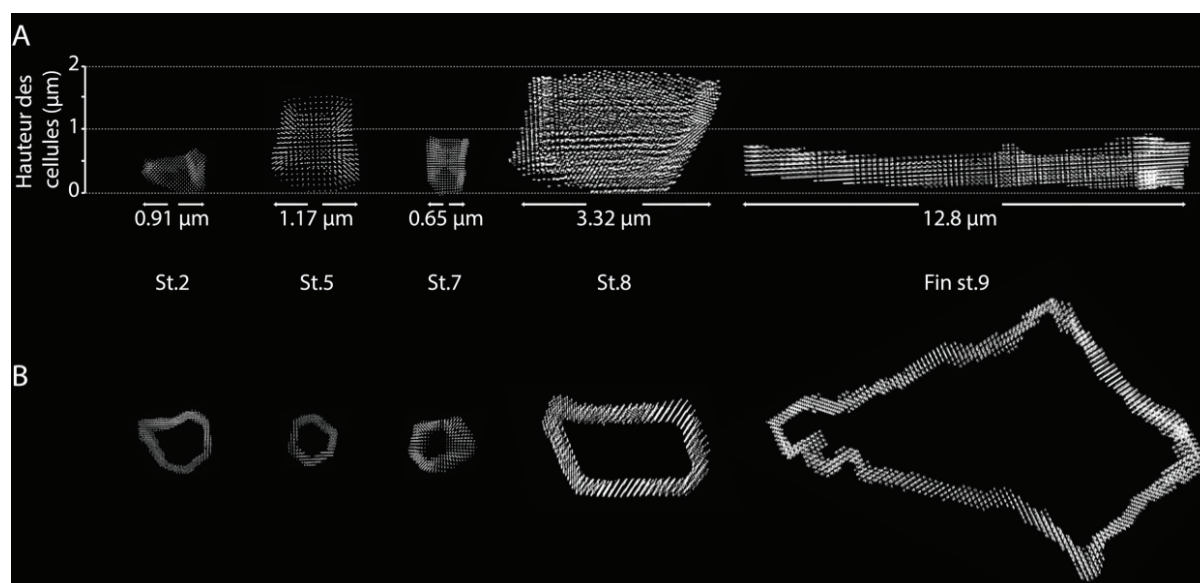


Figure 37 : Forme des CFs selon le stade folliculaire

(A) Vue latérale et basale (B) des CFs.

C. Données métriques sur la lignée germinale

1. Les cellules nourricières

Un follicule ovarien, est une structure complexe composée d'une monocouche de CFs entourant un cluster formé de 16 cellules de la lignée germinale : 15 cellules nourricières en antérieur et 1 ovocyte en postérieur.

Les cellules de la lignée germinale sont des cellules beaucoup plus massives que les CFs. Afin de les segmenter, il est nécessaire d'appliquer un protocole utilisant une taille de voxels différente que celle utilisée pour segmenter les CFs (Figure 38). Nous avons étudié la variation du volume des cellules germinales entre les stades 8 et 9. Après segmentation, nous observons une hétérogénéité volumétrique des cellules selon un gradient A/P (Figure 38-A-A'). Afin d'analyser les cellules de la lignée germinale, nous les avons séparés en 4 rangs (Figure 38-B). Nous notons une augmentation graduelle du volume entre les stades 8, début et fin de stade 9 (Figure 38-B'). De manière surprenante, nous observons que le dynamisme de croissance est différent selon les rangs cellulaires (Figure 38-B''). Il semblerait que les rangs 1 et 2 croient plus que les rangs 3 et 4 entre le stade 8 et début de stade 9. À l'inverse, au cours du stade 9, ce sont les rangs 2,3 et 4 qui croient 1,5 x plus que le rang 1.

Ces résultats montrent une croissance différentielle selon le stade folliculaire, en effet, les cellules croient très rapidement au début de stade 9 puis nous observons une diminution du taux de croissance au cours du stade 9.

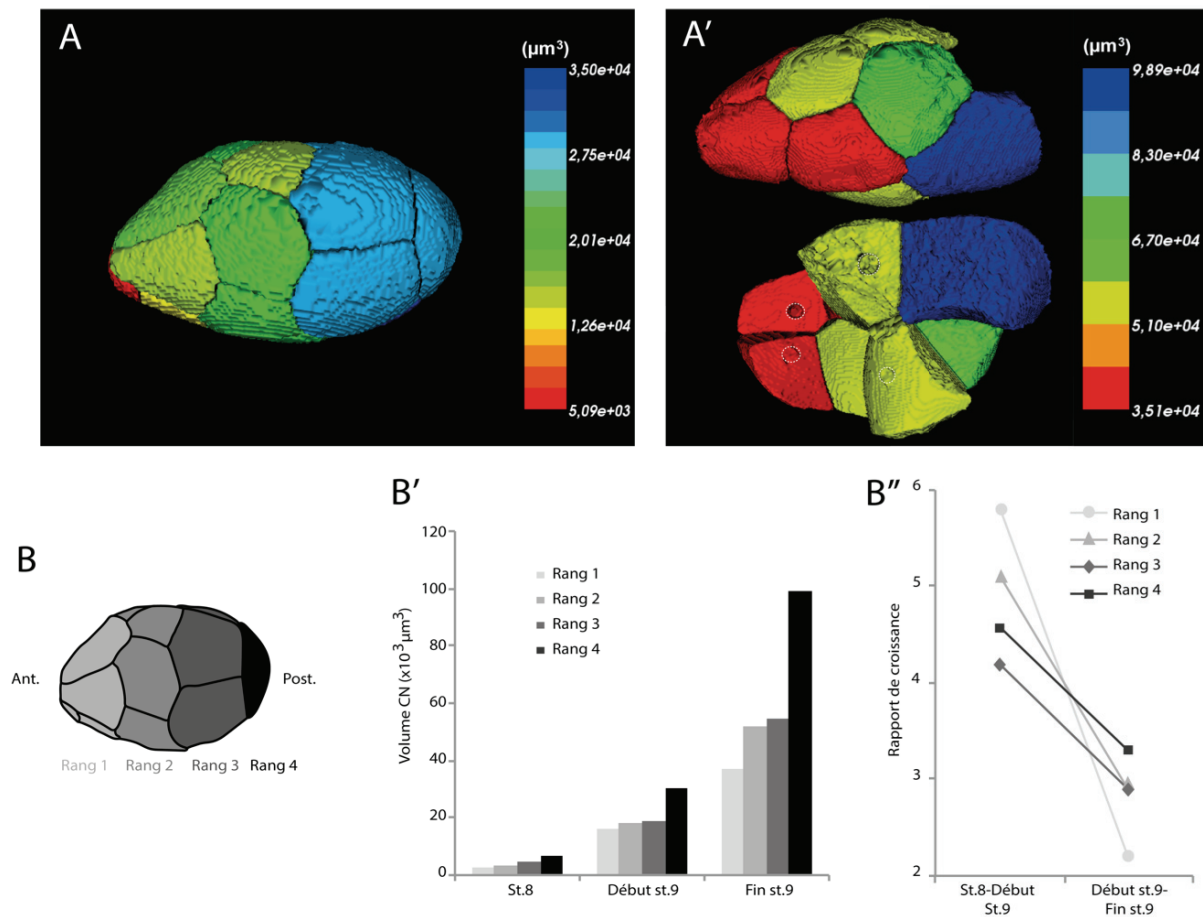


Figure 38 : Les cellules nourricières croissent préférentiellement dans l'axe A/P

(A) Image segmentée de la chambre d'œuf au stade 8 ainsi qu'au stade 9 (A'). Les empreintes des ponts cytoplasmiques sont visualisables (A' – trait pointillé blanc). (B) Schéma d'une chambre d'œuf. (B') Graphique représentant les variations de volumes des cellules de la chambre d'œuf selon leur position. (B'') Rapport de croissance des cellules germinales entre les stades de développement folliculaire.

2. Les cellules de bordure

Au cours de la morphogenèse épithéliale au stade 9, un groupe d'une dizaine de CFs ($\approx 4000 \mu\text{m}^3$) se détache du pôle antérieur pour migrer au travers des cellules nourricières et s'arrêter au niveau de la jonction entre les cellules nourricières et l'ovocyte (Figure 39-A). Les cellules de bordures sont constituées de deux types cellulaires : les cellules polaires et les cellules externes de la bordure. Ensemble elles deslaminent et migrent sous la forme d'un groupe organisé de cellules épithéliales composé de cellules polaires en position centrale et de cellules externes de la bordure en périphérie, le tout formant un groupe appelé cellule de bordure (Figure 39-B-B'''). Ces cellules migrent à

travers des cellules nourricières en direction de l'ovocyte et participent à la formation du canal du micropyle (point d'entrée du spermatozoïde), structure essentielle pour la fertilisation de l'œuf. Les cellules polaires sont des cellules allongées dont le volume ($173,5 \pm 14 \mu\text{m}^3$) est 3x inférieur au volume des cellules de bordures ($613,6 \pm 84 \mu\text{m}^3$).

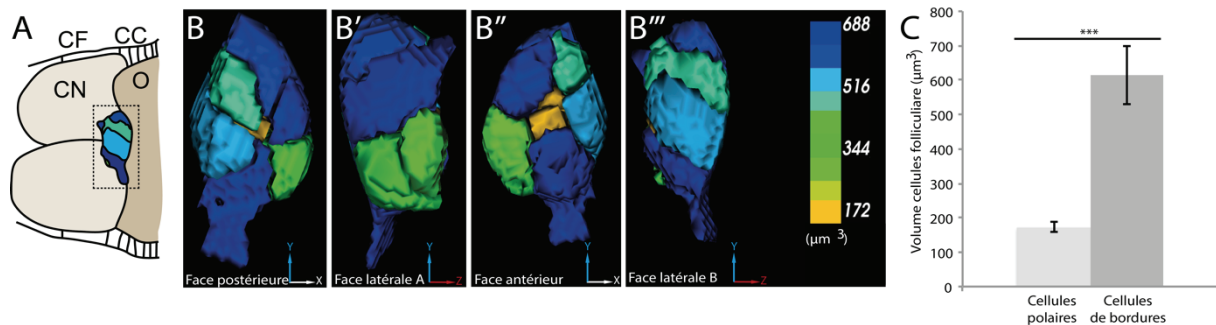


Figure 39 : Segmentation des cellules de bordures

(A) Schéma des cellules de bordures d'un follicule au stade 10. (B-B'-B''-B''') Différentes vues de la segmentation des cellules de bordures. (C) Graphique du volume des deux populations cellulaires composant le cluster de cellules de bordures.

D. La dynamique de croissance et de morphogenèse folliculaire

L'ovogenèse n'est pas un mécanisme figé, nous observons un dynamisme des cellules, d'une part global, puis local. En effet, les follicules jusqu'au stade 7 vont croître de façon homogène. C'est à partir du stade 8, que nous observons une différence régionale de hauteur des CFs, de plus nous remarquons une que ces cellules sont orientées. De plus nos analyses montrent une orientation spiralée des CFs avant le début de l'aplatissement (Figure 40).

Ainsi selon la localisation et le stade folliculaire, le devenir morphologique des cellules ne sera pas le même. La technique MARS-ALT nous a permis de montrer et de mesurer les différences A/P des CFs ainsi que celles de la lignée germinale (Figure 40). De plus, nos résultats montrent que la morphogenèse des CFs est un processus dynamique qui démarre au stade 8 et dépendant de plusieurs facteurs : la croissance de la lignée germinale et la rotation de la chambre d'œuf.

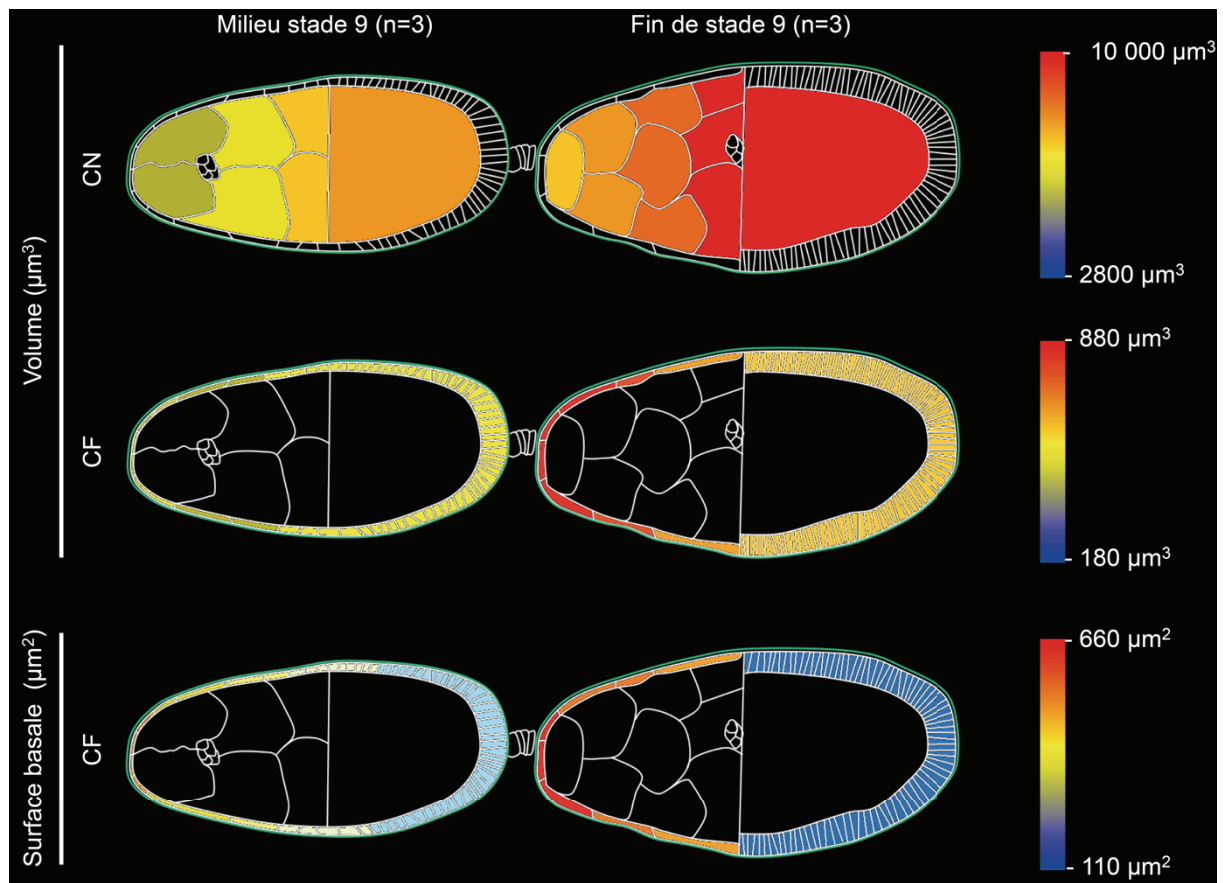


Figure 40 : Variation du volume et de la surface basale des cellules

Ce schéma récapitule les variations volumétrique et surfacique des cellules qui composent le follicule ovarien au cours de la morphogenèse épithéliale au stade 9.

Partie III. TGF β contrôle la transition des cellules cuboïdes à squameuses au cours du stade 9

Au début de mon doctorat, j'ai participé à un travail concernant le rôle de TGF β au cours de la morphogenèse épithéliale au stade 9. Dans cette étude, nous avons mis en évidence le rôle crucial de TGF β dans la transition des cellules cuboïdes à squameuses, ainsi que dans le degré et la dynamique de l'aplatissement des cellules. Durant ce processus, les jonctions d'adhérence sont remodelées par l'action TGF β . En effet, ce facteur agit de manière cellulaire autonome sur le réseau de cytosquelette d'actine et sur la localisation et l'activation de la Myosine II. De plus, nous avons montré que TGF β contrôle la voie N. Ce processus est un phénomène actif, et non passif en réponse à un changement global généré par la croissance d'un tissu. Dans cette étude, mon travail a consisté à déterminer si la voie N était active ou pas en l'absence de la voie TGF β . Pour ce faire, j'ai réalisé un croisement afin de générer des clones somatique pour la protéine Mad mutée (mad¹²) en présence d'un rapporteur de l'activité de la voie N (GbeSu (H)). Cette construction contient des sites de fixation au facteur Grainy Head et Su (H) en amont du gène rapporteur LacZ. L'expression de la β -galactosidase ne se produit qu'en présence de la partie intracellulaire de N. Il a été précédemment montré que ce rapporteur s'exprimait au niveau des cellules squameuses au cours du stade 9 (Grammont, 2007).

Différentes études ont montré que l'expression de la protéine Brinker devait être régulée afin de permettre une expression de gènes cible de la voie TGF β . Afin de déterminer si cette régulation était également présente au niveau des cellules squameuses, j'ai entrepris une analyse clonale de brinker (brk^{M68}). Nous avons ainsi montré que Brinker ne réprimait pas la voie de signalisation TGF β au stade 9.

La signalisation TGF β est un mécanisme propre et un véritable chef d'orchestre à la base de la transition cuboïde à squameuse.

Article « Transforming Growth Factor β /activin signalling induces epithelial cell flattening during *Drosophila* oogenesis »

RESEARCH ARTICLE

Transforming Growth Factor β /activin signalling induces epithelial cell flattening during *Drosophila* oogenesis

Isabelle Brigaud¹, Jean-Luc Duteyrat¹, Julien Chlasta^{1,2}, Sandrine Le Bail³, Jean-Louis Couderc³ and Muriel Grammont^{1,2,*}

ABSTRACT

Although the regulation of epithelial morphogenesis is essential for the formation of tissues and organs in multicellular organisms, little is known about how signalling pathways control cell shape changes in space and time. In the *Drosophila* ovarian epithelium, the transition from a cuboidal to a squamous shape is accompanied by a wave of cell flattening and by the ordered remodelling of E-cadherin-based adherens junctions. We show that activation of the TGF β pathway is crucial to determine the timing, the degree and the dynamic of cell flattening. Within these cells, TGF β signalling controls cell-autonomously the formation of Actin filament and the localisation of activated Myosin II, indicating that internal forces are generated and used to remodel AJ and to promote cytoskeleton rearrangement. Our results also reveal that TGF β signalling controls Notch activity and that its functions are partly executed through Notch. Thus, we demonstrate that the cells that undergo the cuboidal-to-squamous transition produce active cell-shaping mechanisms, rather than passively flattening in response to a global force generated by the growth of the underlying cells. Thus, our work on TGF β signalling provides new insights into the mechanisms through which signal transduction cascades orchestrate cell shape changes to generate proper organ structure.

KEY WORDS: Epithelial cell flattening, Adherens junction, TGF β

INTRODUCTION

Epithelial morphogenesis, which includes any process requiring a deformation within an epithelial cell sheet, is a key precondition for proper tissue and organ development, as well as for their repair during adult life. Epithelial cells are, typically, polarized cells with apical, lateral and basal domains. Morphogenetic processes usually affect the relative sizes of these domains and, temporally or permanently, modify the expression patterns of components of these domains (St Johnston and Sanson, 2011). In particular, the lateral domain contains the intercellular junctions, such as adherens junctions (AJ), that physically couple adjacent cells. Through its interaction with the actomyosin network and in

response to its contractility, AJ are often remodelled during morphogenesis (Bertet et al., 2004; Blankenship et al., 2006; Harris and Peifer, 2007). The mechanisms that regulate AJ remodelling remain unclear, especially with respect to the role of signalling pathways in their anchoring, turnover or link with the cytoskeleton. One of the model systems to study the interactions between signalling pathways and AJ remodelling is the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary (Deng and Bownes, 1997; Peri et al., 2002; Yakoby et al., 2008; Zartman et al., 2009).

The *Drosophila* follicle consists of an epithelial monolayer of cuboidal somatic follicular cells surrounding an oocyte and 15 nurse cells. The follicular cells progressively differentiate into various sub-populations that experience the different cell-shape changes and/or migrations required to pattern the future eggshell (Fig. 1A) (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). The cell shape changes start at stage 9 with about 50 stretched cells (StC) that flatten dramatically over the nurse cell compartment, and with the border cells that delaminate from the epithelium and migrate posteriorly between nurse cells. Concomitantly, the posterior cells and the main body follicular cells become columnar around the growing oocyte (Kolahi et al., 2009). At the beginning of stage 10A, the boundary between the flattened StC and the columnar cells is aligned with the nurse cell-oocyte interface.

The flattening process of the StC leads to anisotropic shape, with cells elongating more along the anterior-posterior (A/P) axis than the medio-lateral (M/L) axis (Grammont, 2007; Kolahi et al., 2009). It begins at the anterior pole and spreads row by row in an anterior to posterior wave, such that all the cells located at the same position relative to the A/P axis are at a similar phase of cuboidal-to-squamous transition (Fig. 1B,C). Stretched cell shape changes require extensive adherens junctions (AJ) remodelling with the spatial and temporal regulation of two apicolateral AJ components, DE-cadherin (Ecad, encoded by *shotgun*) and β -catenin (encoded by *armadillo*), and with changes in Actin cytoskeleton dynamics through the activity of the non-muscular Myosin II (encoded by the *zipper* (*zip*) and *spaghetti squash* (*sqh*) genes). The mechanisms that drive AJ remodelling and cytoskeleton rearrangement are still unclear. From morphometric analyses and manipulation of the growth of the underlying germline, it has been proposed that StC flatten in response to the tension generated by this growth through a “compliant” flattening process (Kolahi et al., 2009). This is counterbalanced by the analyses from the Notch pathway as well as the *hindsight* and *tao* genes, which suggest the presence of active and cell-autonomous mechanisms in the StC to allow their flattening to occur (Gomez et al., 2012; Grammont, 2007). First, the Fringe-dependent Notch pathway controls the expression patterns of Ecad, Arm, Zip and Sqh (Grammont, 2007). Second, the *hindsight* gene, a transcription factor that putatively negatively regulates JNK signalling, regulates Ecad and Arm expression level

¹Université Lyon 1, Lyon and Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5534, Villeurbanne, France. ²Laboratoire Joliot Curie, CNRS, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France.

³CNRS 6293, Clermont University, Inserm U1103, UMR GReD, UFR Médecine, Clermont-Ferrand F-63001, France.

*Author for correspondence (muriel.grammont@univ-lyon1.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

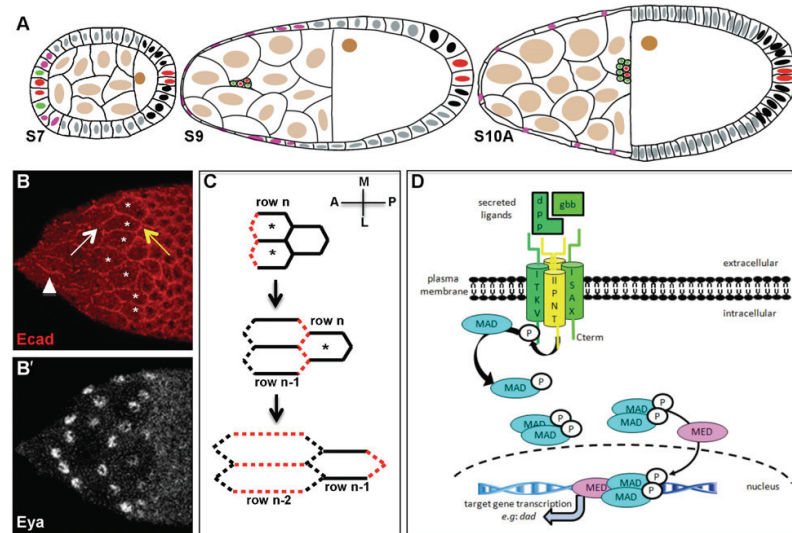


Fig. 1. Cell flattening during *Drosophila* oogenesis. In all figures, anterior is to the left. (A) Schematic of a stage 7 (S7), 9 (S9) and 10A (S10A) follicles. The arrangement and identities of the oocyte (nucleus coloured in brown), nurse cells (light brown), main body follicular cells (grey), polar cells (red), border cells (green), stretched cells (pink) and posterior cells (black) are shown. (B–B') A mid stage 9 follicle showing adherens junction (AJ) remodelling of the StC. The asterisks indicate flattening StC. Ecad is no longer detected at the three-cell junctions between flattened and flattening StC (white arrow), but is visible at the three-cell junctions between flattening and cuboidal cells (yellow arrow). Ecad is temporally maintained at the A/P oriented junctions (arrowhead). Eya expression is detected in the nuclei of the flattened and flattening StC. (C) Schematic of AJ disassembly in StC during stage 9. AJ of two StC rows are represented at three stages of flattening: row n: flattening StC (asterisks); row n-1: flattened StC; row n-2: fully flattened StC. The AJ that are disassembling are in red. (D) Schematic representation of the TGFβ/BMP signalling pathway in *Drosophila*. Activation starts with the binding of a homo or heterodimer ligand to a tetrameric complex of two types II and two types I receptors. Under binding, the type II receptor phosphorylates the type I receptor, which in turn activates Mad. Two phosphorylated Mad associate with Med and translocate to the nucleus (Wharton and Derynck, 2009).

(Melani et al., 2008). Third, the *tao* gene, which is known to activate the stress-responsive MAPK pathway in mammalian cells and the Salvador-Warts-Hippo pathway in *Drosophila*, promotes the endocytosis of the cell adhesion molecule Fasciclin 2, the *Drosophila* N-CAM (neural cell adhesion molecule), from the lateral membrane (Gomez et al., 2012).

Another cell-autonomous possible regulator of the cuboidal-to-squamous transition could be the Transforming Growth Factor/Bone Morphogenetic Protein (TGFβ/BMP) pathway. In *Drosophila*, TGFβ ligands are encoded by the *decapentaplegic* (*dpp*), *glass bottom boat* (*gbb*) and *screw* genes; the type I receptors by the *saxophone* (*sax*) and *thick veins* (*tkv*) genes; the type II receptors by the *punt* and *wishful thinking* (*wit*) genes; and the Smads by the *Mothers against dpp* (*Mad*) and *Medea* (*Med*) genes (Fig. 1D) (Miyazawa et al., 2002; Wharton, 1995). It has been shown that the TGFβ pathway is active in the StC during stage 9 (Guichet et al., 2001; Muzzopappa and Wappner, 2005; Twombly et al., 1996). Indeed, the *dpp* mRNA, the phosphorylated form of the Mad and the β-galactosidase activities from enhancer-trap elements inserted at the *dpp* and at the *Daughter against dpp* (*Dad*) loci, are specifically detected in the StCs at stage 9. However, no study has been undertaken to determine whether the activation of this pathway in these cells during their flattening is functionally relevant.

In the article, we make a comprehensive study of the contribution of the canonical TGFβ pathway actors during StC flattening by genetically manipulating their expression levels. We find that TGFβ expression from the StC is required for the cuboidal-to-squamous follicular cell transition. We show that the

activation of the TGFβ pathway within these cells autonomously regulates the dynamic and the degree of the flattening, by acting on AJ remodelling and cytoskeleton rearrangement. We show that one of the targets of the TGFβ signalling is the Notch gene and that restoring N activity can partially rescue impaired TGFβ signalling. Finally, our results indicate that the temporal regulation of TGFβ activity is crucial to set up the timing of StC flattening, demonstrating that StC actively participate to their flattening by producing internal forces.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks and crosses

The mutant stocks used are *tkv^{a12}* FRT40A, *tkv⁸* FRT40A, *tkv⁷* FRT40A, *Mad¹⁻²* FRT40A, *Mad¹²* FRT40A, *Mad⁸⁻²* FRT40A, FRT82B *punt^{Δ61}*, FRT82B *punt¹³⁵*, FRT82B *punt¹⁰⁴⁶⁰*, FRT82B *Med⁸*, FRT82B *Med¹³*, FRT82B *Med¹*, FRTG13 *gbb¹*, FRTG13 *sax⁴*, *wit^{G15}* FRT2A, *Smox^{MB388}* FRT19A, FRTG13 *babo³²*, *dpp^{d12}* FRT40A, *dpp^{d14}* FRT40A, *DI^{rev10}* FRT82B and *TRIP.dpp^{IF01371}* (Bang and Wharton, 2006; Cordero et al., 2007; Sutherland et al., 2003; Yoshida et al., 2005; Zheng et al., 2003; Pérez-Garijo et al., 2009).

Canton-S was used as WT, and the transgenic lines used are Gbe-Su(H)m8-lacZ (Furriols and Bray, 2001); P(UAS-DI::NΔECN) (referred as *Nact*) (Baker and Schubiger, 1996; Doherty et al., 1996); P(UAS-*tkv^{Q199D}*) (referred as *tkvA*), P(UAS-Dad.T) (Bang and Wharton, 2006), MA33 (González-Reyes and St Johnston, 1998) and UAS-DI.D (gift from M. Muskavith). Additional information can be found at FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

Clones were generated by Flipase-mediated mitotic recombination on FRT19A, FRT40A, FRTG13, FRT2A, or FRT82B chromosomes (Xu and Rubin, 1993). To generate Dpp clones, the *ywFLP*; M(2L)24F ubiGFP FRT40A/CyO stock was used.

Ectopic expression of *tkvA*, *Dad* or *Nact* was performed by generating Flip-out Gal4 clones in animals carrying the *hs-FLP22* and the *AyGAL4* UAS-GFP transgenes (Ito et al., 1997). Flipase expression was induced by heat shocking 2-d-old females at 37.3°C for 1 h to generate mutant clones and Flip-out clones.

Follicle staining and mounting

Ovaries from females were dissected directly into fixative 3 to 4 days after Flipase induction and stained following the protocol described in Grammont and Irvine (Grammont and Irvine, 2002). The following antibodies were used: goat anti β -galactosidase (1:1,000; Biogenesis), Mouse anti-Myc (1:100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Myc (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), mouse anti-GFP (1:500; Sigma-Aldrich), goat anti-GFP (1:1000; Abcam), rabbit anti-Zipper (1:1,000) (Jordan and Karess, 1997), mouse anti-Eya [1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)], rat anti-ECad (1:200; DSHB), rat anti-NCad (1:20; DSHB), mouse anti-Notch (1:100; C458.2H, DSHB), mouse anti-Delta (1:200; C594.9B, DSHB), mouse anti-Dlg (1:50; DSHB), rabbit anti-phospho-Histone3 (PH3) (1:200; Cell Signaling), rabbit anti-PMad (1:200) (Nakao et al., 1997), rabbit anti-cleaved Caspase-3 (1:200; Cell Signaling), mouse anti-Hindsight (1:10; DSHB), Mouse anti-Phospho-Sqh (1:1000; Cell Signaling), mouse anti- β -tubulin (1:1000; clone DM1A; Sigma-Aldrich), mouse anti-Armadillo (1:50; DSHB). Actin staining is realized by using Rhodamine-Phalloidin (Molecular Probes). Once stained, follicles were staged according to Spradling (Spradling, 1993). To avoid fluctuations of the depth of the follicles that are squeezed by the coverslip, each slide contains 15 ovaries, from which stage 11 to 14 are removed. After dissection of the follicles, most of the PBS is removed and 20 μ l of the Imaging medium [PBS/Glycerol (25/75) (v/v)] is added before being covered by a 22/32 mm coverslip.

Microscope image acquisition

Preparations were examined using a confocal microscope (LSM510 Meta; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) with 40 $\times$ NA 1.3 plan-Neofluar and 63 $\times$ NA 1.4 plan-Apochromat objectives. All imaging was performed at RT.

Images were processed using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). For all included images, a projection of all of the z sections in which the StC are visible is presented.

Image segmentation on early or mid stage 9 follicles was performed using an ImageJ macro (see supplementary material macro iMetrics and macro stack). Before running the macro, the stacks were cropped to exclude nurse cell membrane staining. Younger or older follicles were also removed and the canvas was adjusted to avoid follicles of interest touching the border of the image. Cell and follicle outlines are usually maximum intensity z projections of $\sim$ 2 μ m. Non-specific background staining in the Eya channel was used to detect the outline of the follicles. For this, the AutoThreshold tool (Li dark method) was used to enhance contrast and the Analyse Particles tool is then applied to select large objects (superior to 2000 pixels). The angle of the object with respect to the x axis was calculated and printed. Extremities were obtained with the DrawFeretTips function. Real Eya expression was then used to detect the anterior extremity: the standard deviation (SD) of pixel intensity was calculated at both extremities, where high SD indicates anterior. An Euclidian Distance Map was then applied (EDM16b function). To segment the cell outlines through the Ecad channel, the AutoThreshold tool (Median method – radius 10) was used to enhance contrast and the Analyse Particles tool was then applied to select objects (superior to 500 pixels). Mathematic morphometric tools (Close, Dilate And Erode) were then employed to close some of the outlines and then the Skeletonize tool was applied. Spikey outlines were smoothened with the PruneAll plugin. The Set Measurements was used to get the metrics of all the cell objects detected with the Analyse Particles (size=50–1000) that have been registered in the roiManager.

For each object, the Area is given in square units (μ m²) and an ellipse is fitted. Information about the shape is obtained by measuring the primary (Major) and secondary (Minor) axis of the best fitting ellipse and

by calculating the Aspect Ratio (AR) of the ellipse, where $AR = [\text{Major Axis}] / [\text{Minor Axis}]$. The direction of the cell elongation (Angle) is given by the angle formed by the primary axis and the X-axis of the image (Fig. 2).

Area, AR and direction of the cell elongation on old stage 9 or stage 10 follicles are obtained after the manual delimitation of the cell outlines based on a membrane-tagged GFP expression.

To calculate the volume of the follicles, we considered them as ellipsoid objects for which the volume is given by the formula: $\frac{4}{3} \pi a b c$. a and b are the length and the width of the midsagittal plane image of the follicle. In normal follicles that are not under compression, c would be equal to b. Because we observe no significant increase in the length and width of our squeezed follicles in our mounting conditions, c is taken to be equal to b.

Statistics

All the error bars shown in the figures are SD. p values are calculated using paired t test.

RESULTS

Determining the metrics of StC flattening

To clearly delineate stereotyped StC flattening, we created an ImageJ macro (called iMetrics) to semi-automatically measure a variety of cellular metrics. We monitor cell outlines using Ecad staining and these are used to get a skeleton of all cells and created a segmented image. Thereafter, apical surface area, cell shape and direction of the elongation are automatically extracted for each segmented cell (see Materials and Methods). In parallel, we used Eyes absent (Eya) expression, which turns on in the StC as they start flattening, to monitor not only the acquisition of the StC fate, but also the distance between these cells and the anterior end of the follicle. Based on this, StC are then sorted by M/L-oriented rows (Fig. 2A). To validate the functionality of the macro, we established these parameters for WT StC before, during and after stage 9. We found that the average apical surface area of StC between stage 8 and early stage 10A increases from $35 \pm 5 \mu\text{m}^2$ to $800 \pm 50 \mu\text{m}^2$, which corresponds to the net surface area of the StC growing from $0.2 \pm 0.2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ to $4.0 \pm 2.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Fig. 2B). Our values are similar to those determined by Kolahi et al. (Kolahi et al., 2009). To complete these data, we carried out a row-by-row analysis of the dynamics of StC flattening during stage 9. We observed that 4 rows of cells are usually required to cover the nurse cell compartment (Fig. 2B). To test whether the macro was able to detect changes in cell shape and direction of the cell elongation, we analysed early and mid stage 9 follicles. At early stage 9, only StC in row 1 are significantly elongated (Aspect Ratio > 2) and they are more elongated along the A/P axis than along the M/L axis (Angle $\alpha < 30^\circ$). We observed that the StC in the row 2 are already oriented along the A/P axis, indicating that the anisotropy of the shape can be detected even before the cells are majorly elongated. By mid stage 9, the StC in rows 2 are elongated and the shape of the StC in row 3 is also more stretched (Fig. 2C,D). These data show that our tool accurately quantifies the magnitude and pattern of the flattening, and can follow the dynamics of each row.

The TGF β pathway is required for the dynamic and the degree of flattening

TGF β signalling activity has previously been detected during the cuboidal-to-squamous follicular cell transition (Guichet et al., 2001; Muzzopappa and Wappner, 2005; Twombly et al., 1996), but it is unclear if it is required for this process. To test this, we

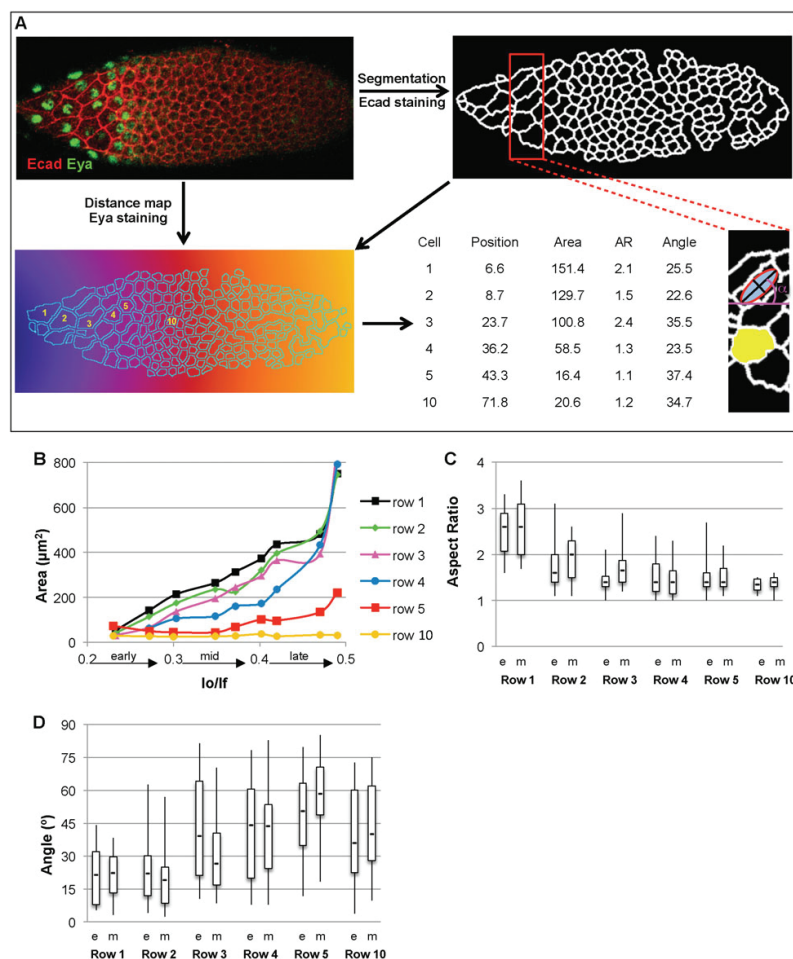


Fig. 2. The physical parameters of StC flattening.

(A) The custom-made ImageJ macro uses Ecad staining to segment the cells and Eya staining to extract follicle outlines, to determine the anterior and establish a distance map (for the stack used to describe the macro, see supplementary material macro stack). Six cells are numbered in function of the row they belong to. Apical surface area (Area in μm^2), shape (Aspect Ratio), direction of the cell elongation (Angle in $^\circ$) and position of the cells relative to the anterior (Mean Grey in μm) are given for each cell (see Materials and Methods). The red box in the segmented image is enlarged to show the Area (yellow) of one cell, the position of the best-fitted ellipse (red and grey) in another cell with the axes (black) used to calculate the Aspect Ratio and the Angle (purple).

(B) Evolution of the apical surface area (Area) of WT StC per row during the stage 9 and early 10. The rows 1 to 4 contain cells that become StC. The row 5 contains cells that become either StC or main body follicular cells. The row 10 corresponds to a row of cells that become main body follicular cells. The follicles were staged by calculating the ratio between the length of oocyte (Io) and the follicle (lf). Each point represents average of more than 10 areas from 3 to 5 follicles at each Io/lf chosen. (C,D) Box and whisker plots of the shape (Aspect Ratio) (C) and of the direction of the cell elongation (Angle) (D) from WT early (e) and mid (m) follicles. Each sample represents at least 30 cells from 7 to 10 follicles. In all figures with box and whisker plots, boxes extend from 25th to 75th percentile, with a line at the median. Whiskers extend to the most extreme values.

examined Ecad and Eya expression patterns in follicles carrying somatic mutant clones for all canonical TGF β signalling components. The robustness of the phenotypes was assayed by using three different mutant alleles for each gene. No phenotype was detected before stage 9 in any follicular cell (supplementary material Fig. S1A,B) or during stage 9 when the mutant clone encompassed only the main body follicular cells (supplementary material Fig. S1C,D). In contrast, more than 80% of the stage 9 follicles with StC mutant for either *tkv*, *punt*, *Mad* or *Med* or with StC over-expressing the negative regulator *Dad* displayed an aberrant cuboidal-to-squamous transition, based on the four following observations. First, mutant StC presented a delay in AJ remodelling compare to WT StC, as perdurance of apical membrane-localized Ecad molecules is observed in mutant StC, indicating that TGF β signalling is required for temporal AJ remodelling in these cells (Fig. 3A,B,C; supplementary material Fig. S1E). Second, mutant StC showed a delayed onset of Eya and of the MA33 enhancer-trap StC marker expression, indicating that TGF β signalling is required for the expression of both markers (Fig. 3A,B,D,E). Third, we quantified the degree of flattening of WT and mutant StC in mosaic follicles containing 40% to 60% mutant StC. At mid stage 9, mutant StC that are

flattening or have already flattened are on average half the size of WT StC (Fig. 4A,D,E). At early stage 10, the apical surface area of the mutant StC is reduced by 45% (Fig. 4B) while the volume of the mosaic follicles stays similar to that of WT follicles (supplementary material Fig. S1F), indicating that TGF β signalling controls the degree of flattening. Fourth, we counted 25% extra Eya or MA33-expressing cells over the nurse cell compartment in mutant stage 10 follicle (Fig. 4C). This increase in StC number could be due to either main body follicular cells that have been recruited and converted to StC or from extra rounds of cell division. We excluded the latter possibility because we never detected phospho-Histone3 expression in mosaic *Med* follicles after stage 6 (supplementary material Fig. S1G). Thus, the extra cells over the nurse cells in mosaic follicles are main body follicular cells that have adopted a StC fate. Together, these data demonstrate that the TGF β pathway is required for the cuboidal-to-squamous transition.

We also analysed the shape and the direction of the elongation of the mutant StC. We observed that the mutant StC elongated later and less than WT cells (Fig. 4F,G), but along the A/P axis (Fig. 4H,I). Our measurements also show that the improper flattening of mutant StC has an impact on the flattening of

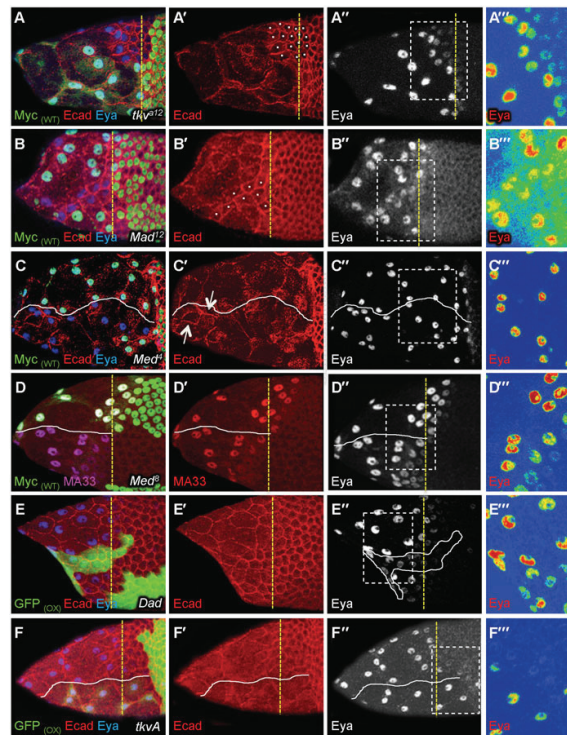


Fig. 3. TGF β is required for cuboidal-to-squamous transition. In all figures, the yellow dotted line marks the A/P position of WT flattening StC and the white line separate the mutant cells from WT cells; the Myc_(WT) and GFP_(WT) labels indicate that WT cells are green whereas the GFP_(OX) label indicates that cells overexpressing a transgene are green; the use of a colour gradient allows the visualization of differences in intensities of protein accumulation from none (blue) to strongest (red); A''–F'' are magnified views of the boxes drawn in A'–F'. (A–F'') Stage 9 (A,B,D–F) or 10 (C) follicles with clones of mutant cells (A–D) or with clones of cells over-expressing Dad (E) or *tkvA* (F). A''–F'' are magnified views of the boxes drawn in A'–F'. (A,B) Difference of dynamic of AJ remodelling between WT StC and mutant StC (white dot) in round or drawn-out clones. Mutant StC undergoing flattening were located three to four rows anterior to WT StC. (C) Follicle with *Med* clones. The arrows point to persistent AJ within clones. (D) Comparison of MA33 expression between *Med* and WT StC. (E) Difference of AJ remodelling dynamic between Dad and WT StC ($n=59$). (F) Difference of dynamic of the flattening between *tkvA* and WT StC. In (C–F) a white line separates mutant, Dad or *tkvA* StC or from WT StC. All the phenotypes have been observed with different alleles of *tkv*, *punt*, *Mad* and *Med*: for *tkv* (*tkv^{Δ12}*: $n=50$; *tkv^{Δ8}*: $n=88$; *tkv^{Δ7}*: $n=42$); for *punt* (*punt^{Δ161}*: $n=30$; *punt^{Δ135}*: $n=20$; *punt^{Δ1046}*: $n=18$), for *Mad* (*Mad^{Δ1-2}*: $n=90$, *Mad^{Δ12}*: $n=40$, *Mad^{Δ9-2}*: $n=35$), and for *Med* (*Med^{Δ8}*: $n=210$; *Med^{Δ13}*: $n=123$, *Med^{Δ4}*: $n=134$).

neighbouring WT StC. Indeed, the apical surface area of WT StC in mosaic stage 9 follicles is wider than those of StC in WT follicles. A higher proportion of the former also more rapidly adopts an elongated shape oriented along the A/P axis than the latter (Fig. 4D–I). This confirms that proper StC flattening requires coordination between adjacent cells. The expressivity of the phenotypes also depends on the size (fewer than 5 cells versus more than 5 cells) and on the shape of the mutant clones (round versus drawn-out) (compare Fig. 3A with Fig. 3B). Isolated mutant cells do not flatten at all and maintain AJ until stage 10. These data show that TGF β pathway controls the dynamics of the cuboidal-to-squamous transition, the degree of flattening of the

StC and participates to the development of an elongated cell shape.

Only 50% of follicles with somatic *sax^Δ* clones display a mild phenotype (compare supplementary material Fig. S1H with Fig. 3A,B). We also tested whether the expression of the ligands *dpp* and *gbb* ligands in the stretched cells is required for cell flattening by generated either RNAi-expressing clones and or clones for hypomorphic or null alleles. We observed that follicles where *dpp* RNAi clones encompass most of the StC, present smaller and supernumerary StC compare to WT follicles. In addition, these StC do not remodel their AJ. However, although some mutant clones (33%) that encompass less than 15 StC, contain cells that are smaller than their WT neighbours, most clones do not induce a phenotype, indicating that the Dpp ligand expressed by the WT cells rescues the *dpp* StC (supplementary material Fig. S1I,J). Clones for hypomorphic *dpp* alleles in a Minute background, which helps recover some mutant cells, displayed phenotypes that were too variable to be conclusive (data not shown). Lastly, follicles with somatic *gbb^Δ* clones do not display any abnormal cell flattening. Thus, Dpp is the main ligand that is used to drive cell flattening and its expression in the StC is required for the flattening. No detectable phenotypes were observed in follicles with *wit^{G15}* clones, or in follicles with somatic clones of two members of the Activin pathway, *baboon* or *Smad on X* (supplementary material Fig. S2A–D).

The TGF β pathway controls the timing of StC flattening

To test whether the TGF β signalling activity is sufficient to promote the cuboidal-to-squamous follicular cell transition, we expressed a constitutively active form of *tkv* (*tkvA*) (Lecuit et al., 1996) (Nellen et al., 1996) using the Flip-out technique. During stage 9, when follicles are composed of 50% *tkvA*-expressing StC (referred to as *tkvA* StC), these StC exhibit premature AJ remodelling and precocious Eya expression. During the cuboidal-to-squamous transition, *tkvA* StC undergoing flattening also present a three fold increase of their apical surface when compared to those of WT neighbours (Fig. 4A). This increase is temporary, as, in a stage 10, the apical surface area of flattened *tkvA* StC ($844 \pm 45 \mu\text{m}^2$) is not significantly different from that of flattened WT StC ($A=750 \pm 30 \mu\text{m}^2$) ($p>0.05$) (Fig. 3F and Fig. 4D,E). Interestingly, the *tkvA* StC flatten progressively from the anterior to the posterior, indicating that the A/P gradient of flattening is independent of the spatio-temporal pattern of TGF β activity (supplementary material Fig. S3A). *tkvA* StC also take on a more elongated shape oriented along the A/P axis than WT cells (Fig. 4F–I). In addition, the increased flattening of the *tkvA* StC also has an effect on the shape of their WT counterparts, since only 20% of these are elongated (Aspect Ratio >1.5), as compared to the 65% for WT flattening StC in WT follicles. However, this non cell-autonomous effect is temporary, as no difference is detected once they are fully flattened. We also analysed follicles composed of at least 80% *tkvA* StC. Based on the overall size of such follicles, flattening starts at stage 8 and ends by mid-stage 9 ($lo=0.51f$) (supplementary material Fig. S1F). At this point, the apical surface area of *tkvA* StC is smaller by 2.25-fold compared to that of StC from stage 10 WT follicles and the number of StC is reduced by 25% compare to WT follicles (Fig. 4A,C). We hypothesized that this could simply be a consequence of the reduced size of such follicles (supplementary material Fig. S1F). To confirm this, we compared the apical surface area of the *tkvA* StC with those of WT StC from WT follicles of similar size and we observed that *tkvA* StC are neither

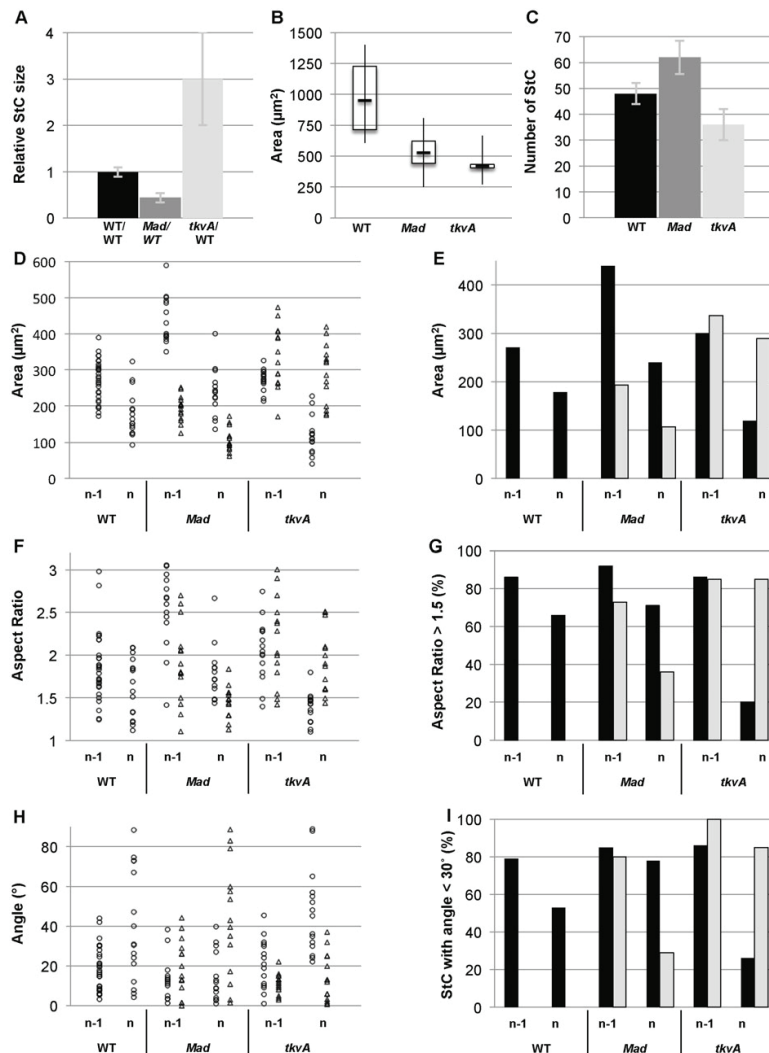


Fig. 4. TGFβ controls the timing, the degree and the dynamic of StC flattening. *Mad* follicles refer to follicles containing 40 to 60% of *Mad*^{1/2} or *Mad*^{1/2-2} StC. Note that no measurement has been done on follicles containing 100% of mutant StC, as such follicles die prematurely. *tkvA* follicles refer to follicles containing more than 50% (A,D–I) or 80% (B,C) of *tkvA* StC. (A) Relative size of WT, *Mad* or *tkvA* StC during flattening. Ratios have been calculated by measuring Area of WT, *Mad* or *tkvA* StC located in the same row than WT flattening StC in WT, *Mad* or *tkvA* follicles, respectively. Each sample represents at least 28 cells from stage 9 follicles (n=5) (0.3<lo/lf>0.35). (B) Box and whisker plots of apical surface area (Area) from WT, *Mad* and *tkvA* follicles. Each sample represents at least 35 cells from stage 10 follicles (n=10) (lo/lf=0.5). (C) Determination of the number of StC in WT (n=10), *Mad* (n=18) or *tkvA* (n=22) follicles (lo/lf=0.5). (D,F,H) Apical surface area (Area), shape (Aspect Ratio) or direction of the cell elongation (Angle) of individual StC is plotted in function of the row: flattening (row n) and flattened (row n-1); and of the genotype: WT (dots), *Mad* (triangles) or *tkvA* (triangles). Each sample represents 9 to 14 cells from 4 to 5 follicles (lo/lf=0.35). (E) Average of apical surface area (Area) of StC per row and genotype: WT (black bar), *Mad* (grey bar) or *tkvA* (grey bar). (G) Percentage of StC displaying an Aspect Ratio superior of 1.5, per row and genotype. (I) Percentage of StC elongated in a direction making an angle superior of 30° with the A/P axis, per row and genotype. (E,G,I) Each sample represents 15 to 30 cells from 10 follicles.

smaller nor wider than WT StC (supplementary material Fig. S3B). In parallel, we also verified that the low number of StC is not due to cell death since cleaved-Caspase3 expression is never detected (supplementary material Fig. S3A). Thus, *tkvA* StC flatten to the same extent as WT cells and adjust their degree of flattening and their number to the size of the nurse cell compartment. Together, these data demonstrate that the premature activation of TGFβ signalling is sufficient to induce cell flattening in anterior cells and modifies the dynamics of the flattening in an opposite manner to the lack of signalling. But, it does not affect the other four main features of flattening, namely the A/P gradient, the degree of flattening, the shape of the StC and the direction of the cell elongation. From these data, we confirm that the activation of the TGFβ pathway controls the dynamics of StC flattening and we also demonstrate that the activation of the TGFβ pathway controls the timing of this process.

We further examined whether the ectopic activation of TGFβ signalling is sufficient to promote premature cuboidal-to-squamous transition. When TGFβ was activated only in the main body follicular cells or in the follicular cells between stage 2 and 6, they did not present AJ disassembly and did not flatten based on the expression of a lateral and basal marker, Disc large, but did show a 2-fold increase in their apical area when compared to WT cells (supplementary material Fig. S3C–F). Thus, ectopic induction of TGFβ signalling induces cell growth, but not a cuboidal-to-squamous transition.

TGFβ signal controls Notch and Delta expression patterns

Three genes or signalling pathways, Hindsight, Tao and the Notch pathway, are known to be required for StC flattening. We observed no differences in Hnt expression in *Mad* clones, indicating that Hnt acts in parallel to TGFβ signalling for StC flattening (supplementary material Fig. S4A). We did not test

whether TGF β controls Tao, because Tao acts before the pathway is active (Gomez et al., 2012). For the Notch pathway, we previously described that N and DI are strongly detected at the membranes of the StC that just flattened and of the StC that are flattening (supplementary material Fig. S4B,C) (Grammont, 2007). At these membrane contacts, we observed a strong reduction of N in *Mad* or *Med* clones (Fig. 5A). In contrast, a strong increase of DI is detected in the *Mad* or *Med* StC undergoing flattening and up to three/four rows posterior to these cells (Fig. 5B), which clearly differs from WT expression. We then used the *GbeSu(H)-lacZ* transgene to determine whether the pathway is affected, and we detected a delayed and reduced expression of N reporter activity in *Mad* clones (supplementary material Fig. S4D), indicating that TGF β signalling is required for proper N activity in the flattening StC. To test whether TGF β signalling is sufficient to induce N expression and to repress DI expression, we analysed N and DI expression patterns in *tkvA* cells. At stage 8, N is detected in the *tkvA* StC, showing that

TGF β signalling controls the temporal pattern of N expression (Fig. 5C). However, TGF β signalling does not induce N expression in the main body follicular cells, indicating that the spatial pattern of N is independent of TGF β . DI expression is lower in *tkvA* cells than in WT cells before and during StC flattening (Fig. 5D; supplementary material Fig. S4E), indicating that TGF β signalling can repress DI expression at several stages of oogenesis. Nevertheless, this repression is insufficient to fully shut down DI expression, as it is still present in *tkvA* StC. Thus, DI is controlled by at least one other pathway, which overcomes the negative regulation exerted by TGF β signalling. From these results, we hypothesized that the opposite regulation of TGF β on N and DI could be important to prevent them from being expressed simultaneously in the same cell, a context that is known to prevent Notch activation through cis-interactions (de Celis and Bray, 1997; Jacobsen et al., 1998; Klein et al., 1997; Micchelli et al., 1997). To support this hypothesis, we over-expressed DI and observed that StC flattening is impaired in DI-expressing cells as well as in neighbouring WT cells, showing that DI expression must be regulated sequentially to allow proper StC flattening (supplementary material Fig. S4F).

To test whether the phenotype observed in the absence of TGF β signalling could derive entirely from an impaired N signalling, we measured the apical surface of flattened and flattening StC in stage 9 follicles composed of WT cells and of cells expressing both *Dad* and a constitutive active form of N (*Nact*) and compared it with the apical surface of StC from WT follicles and from follicles expressing *Dad* alone (compare Fig. 3E with supplementary material Fig. S4G). At mid stage 9, although the *Dad* StC are around half the size of WT StC, the StC overexpressing concomitantly *Dad* and *Nact* display a wider apical surface than those of the *Dad* StC (Fig. 5E,F), indicating that *Nact* expression can rescue partially the phenotypes associated with impaired TGF β signalling ($p < 0.005$). Taken together, these results demonstrate that TGF β activity orchestrates cell flattening by triggering the N pathway and that, once this pathway is activated, either of the pathway regulate common targets and/or Notch fulfils some of the TGF β requirements.

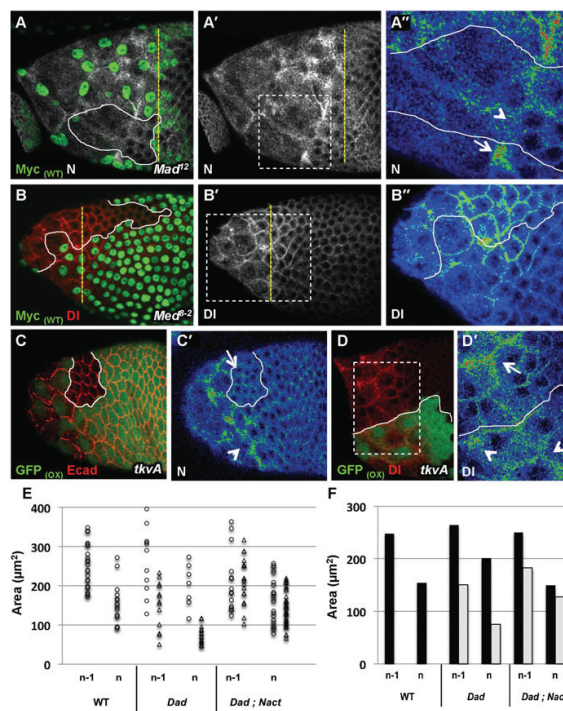


Fig. 5. TGF β controls N and DI expression patterns. (A–B'') Stage 9 follicles with clones of *Mad* or *Med* cells (A, B). A', B', D' are magnified views of the boxes drawn in A, B, and D. (A) N expression at AJ undergoing remodelling in *Mad* (arrowhead) or WT StC (arrow) ($n=10$ for *Mad* and $n=8$ for *Med*). (B) DI expression in *Mad* or in WT StC. ($n=8$ for *Mad* and $n=7$ for *Med*) (C, D) Follicles with clones of cells over-expressing *tkvA*. (C, C') N expression at the AJ undergoing remodelling of *tkvA* StC (arrowhead) or of WT cells (arrow) in a stage 8 follicle ($n=23$). (D, D') DI expression in *tkvA* StC (arrowhead) or in WT StC (arrow) at stage 9 ($n=19$). (E) Apical surface of area (Area) of individual StC is plotted in function of the row: flattening (row n) and flattened (row n-1); and of the genotype: WT (dots), UAS-Dad (triangles) or UAS-Dad; UAS-Nact (triangles). Each sample represents 9 to 14 cells from 3 to 5 follicles (lo/lf=0.35). (F) Average of apical surface area (Area) of StC per row and genotype: WT (black bar), UAS-Dad (grey bar) or UAS-Dad; UAS-Nact (grey bar). Each sample represents 15 to 30 cells from 10 follicles.

TGF β signalling regulates Actomyosin contractility and Ncad down-regulation

As the main target that Notch controls is the localisation of the Myosin II components (Grammont, 2007), we tested whether impaired TGF β signalling also leads to abnormal activity of the Actomyosin network at AJ undergoing disassembly. We analysed the levels of expression of the heavy chain of Myosin II (Zip), of the phosphorylated and active form of the regulatory light chain (P-Sqh) and of F-actin in follicles carrying StC that were either mutant for the TGF β pathway or expressing *tkvA* during stage 9. In WT cells, Zip and Sqh accumulate at the junctions that undergo disassembly (Grammont, 2007). We observed that accumulation of both components is delayed in *Mad* or *Med* StC (Fig. 6A,C; data not shown). Consistent with this, a high and uniform level of Zip expression is detected in all *tkvA* cells and a premature accumulation of P-Sqh is observed in *tkvA* StC undergoing flattening (Fig. 6B,D). For the Actin filament network, we observed the density of Actin filaments increases in WT StC undergoing flattening and remains high in flattened cells. This does not occur in *Mad* StC, whereas it does occur earlier in *tkvA* StC (Fig. 6E,F). This *tkvA*-dependent effect is specific of its expression in the StC as no defect was observed in

the main body follicular cells (Fig. 6F; supplementary material Fig. S5A). The TGF β signal is thus required to promote the formation of actin bundles and to control the activity of Myosin II in WT follicles.

DN-cadherin (Ncad) down-regulation is another step that needs to be regulated to allow StC flattening. Indeed, we previously showed that Ncad expression decreases from stage 7 in WT follicles, and that the maintenance of this expression blocks StC flattening (Grammont, 2007; Tanentzapf et al., 2000; Zartman et al., 2009). In 100% of *Mad* or *Med* mutant clones, Ncad is detected in anterior cells at stages 8 and 9 (supplementary material Fig. S5B), indicating that the TGF β pathway is required for down-regulating Ncad expression. To confirm this, we

activated the TGF β pathway between stages 4 and 7, and observed that Ncad expression is greatly reduced or absent in 100% of *tkvA* follicles (supplementary material Fig. S5C). This result confirms that the temporal control of TGF β activity throughout oogenesis is crucial in order to achieve the proper expression pattern of this adhesion molecule. Thus, TGF β signalling orchestrates StC flattening via multiple regulatory inputs of adhesion molecules and of the components of the actin cytoskeleton.

As TGF β is regulating N activity, we also tested whether Notch could be also involved in *Ncad* regulation. In stage 9 follicles with *DI* clones, we observe the persistence of Ncad expression, indicating that *Ncad* represents a second shared target for TGF β and Notch signalling (supplementary material Fig. S5D).

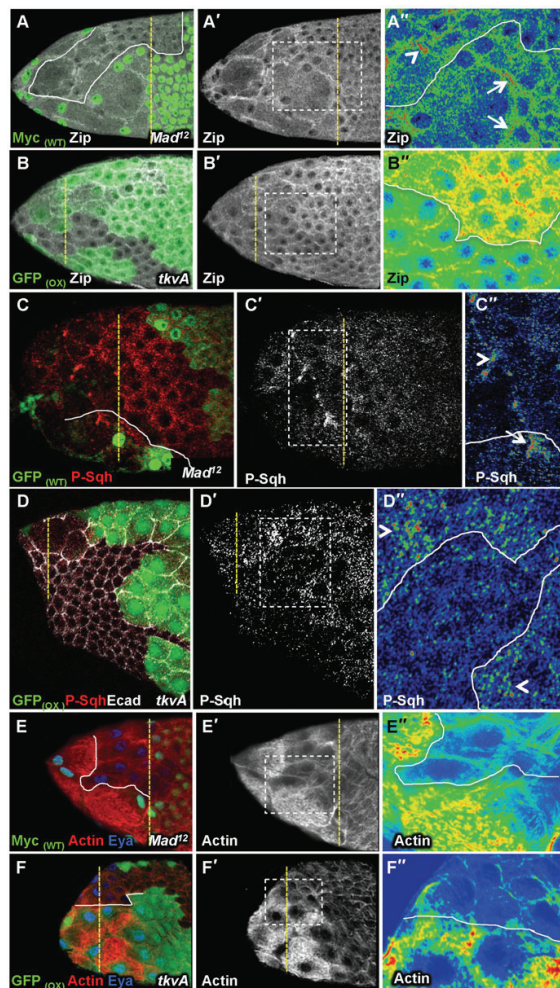


Fig. 6. TGF β controls Actomyosin network formation and contractibility. (A–F) Stage 9 follicles. A'–F' are magnified views of the boxes drawn in A–F. Zip and P-Sqh accumulations and Actin network in *Mad* ($n=40$ for Zip, $n=16$ for P-Sqh, $n=40$ for Actin) (A,C,E) or *tkvA* ($n=80$ for Zip, $n=22$ for P-Sqh and $n=40$ for Actin) (B,D,F) follicles. The point at the Anterior AJ of StC undergoing flattening are marked with arrows in WT and with arrowheads in *Mad* or *tkvA* clones.

DISCUSSION

During stage 9 of oogenesis, the follicular epithelium exhibits morphogenetic rearrangements, including a cuboidal-to-squamous transition at the anterior pole of the follicle. Here, we investigate the role of TGF β signalling in this transition by first collecting detailed cellular metrics in WT and mutant conditions. We then use these metrics to generate databases in order to enable the quantitative phenotypic characterisation of various mutants, of interactions between these mutants, and of the extent of rescue by the forced expression of a gene in different mutant contexts. From these analyses on TGF β signalling, we conclude that the TGF β pathway: (i) is essential in controlling the timing, the dynamics and the degree of flattening; (ii) plays a role in determining the elongated, final shape of the StC, and (iii) does not control the direction of cell elongation or the A/P-oriented wave of flattening. We show that StC flattening is dependant on *dpp* expression in the StC and that the activation of the pathway occurs in an autocrine and paracrine manner, as WT cells can locally rescue cells impaired for Dpp production. As no phenotype is observed in absence of Gbb, Dpp homodimers are likely to be used to activate the pathway, rather than Dpp/Gbb heterodimers. All the other canonical TGF β components are necessary for StC flattening and their absence leads to severe defects of flattening, except for *sax*. Indeed, the contribution of *sax* to StC flattening is minor, when compared to that of *tkv*, which is in accordance with Sax being the primary receptor for Gbb signalling and with our data showing that *gbb* is not required (Bang and Wharton, 2006; Dorfman and Shilo, 2001; Singer et al., 1997). Thus, TGF β must signal principally through Tkv and Punt in the StC. Importantly, our data show that progressive TGF β activation along the A/P axis in WT follicles is irrelevant for the A/P-oriented flattening and suggests instead that the cue(s) responsible of this feature itself could activate TGF β signalling in a wave starting at the anterior tip of the follicle. In addition, the propagation of TGF β from anterior to posterior could be helped by the extra-cellular matrix, given that follicles are surrounded by a Collagen IV-enriched basement membrane. Indeed, recent data implicate Collagen IV in regulating the distribution of TGF β in the germarium and in the embryo (Wang et al., 2008). However, although it has been shown that the basal membrane is involved in shaping the follicle and that the shape of the follicle may in turn impact StC flattening (Haigo and Bilder, 2011), there is currently no direct evidence implicating any components of the basement membrane in this process. Elucidating the role of the basement membrane and its attendant physical characteristics on StC flattening could thus represent an exciting new avenue of research.

The transformation from a cuboidal to a squamous epithelium involves shrinking the lateral membrane as well as extending the basal and apical membranes. Shrinking the lateral membrane requires an adjustment of cell adhesion properties; in this regard, it has been shown that the reduction of Fas2 and the remodelling of AJ are required for the lateral shrinking of the StC (Gomez et al., 2012; Grammont, 2007). Our analyses reveal that TGF β signalling is responsible for AJ disassembly, for increasing actin filament formation and its local contractibility through the localization of the non-muscular Myosin II at the AJ undergoing remodelling, and for turning off Ncad. Thus, TGF β generates cell-autonomously internal forces that likely participate to remodel AJ and lead to the shrinkage of the lateral side of StC.

Until recently, the mechanism that leads to cell flattening in *Drosophila* follicles have remained unstudied, possibly because follicular cell stretching has long been considered as a passive event in response to germline growth. This possibility has been reinforced by the measurement of the compliance of the StC before, during and after the flattening, and by the analysis of *dic* mutant follicle, in which the germline growth is reduced (Kolahi et al., 2009). If StC were entirely passive during this process, it should be impossible to modulate this process, by manipulating gene expression in the soma, except if the genes encoded for direct cell shape regulators, such as Myosin, Actin, adhesion molecules etc. However, our data show first the TGF β signalling pathway is cell-autonomously required for StC flattening. Second, this pathway modulates expression and activity of direct cell shape regulators, which are known to produce internal forces. Third, StC flattening occurs prematurely when TGF β pathway is activated in the soma at young stages, demonstrating that providing TGF β is sufficient for the cells to flatten and that StC do not just flatten through a compliant process. Altogether, our data reveal that StC must be instructed by TGF β in order to respond to the global force generated by the germline growth and bring out the importance of local forces in shaping and flattening the StC.

Besides its role in regulating several cell shape cell effectors (Ecad, Ncad, Actin and Myosin), we also demonstrate that TGF β is essential for Notch expression. Our current and past results show that they are both required for the accumulation of the non-muscular Myosin II at the AJ that need to be remodelled, and for the down-regulation of Ncad. Whether TGF β acts on these targets entirely via its control of the Notch pathway or whether they both control common targets still need to be established. Importantly, we also observe that TGF β signalling negatively regulates Delta in the cells posterior to the row of StC undergoing flattening and that proper StC requires sequential Dl expression. Finding the mechanisms that protects Dl expression from the negative input exerted by TGF β signalling would help understanding the mechanism driving the sequential activation of Notch and the progression of the A/P wave of flattening.

The process of AJ remodelling may resemble, in part, some processes observed in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Zavadil and Böttinger, 2005). Indeed, EMT is characterized by remodelling of epithelial cell-cell and cell-matrix adhesion contacts and of their actin cytoskeleton, by losing epithelial polarity and by acquiring the capacity for individual motility. Although it is still unclear whether cell polarity is affected during StC flattening and to what extent cell-matrix contact are remodelled, StC flattening still shares two key characteristics with EMT: AJ disassembly and actomyosin remodelling. Interestingly, TGF β is known to be a strong

inducer of EMT (Miettinen et al., 1994) during developmental or oncogenic events, leading to the hypothesis that some of the processes observed during StC flattening could be controlled in a similar way to those observed during TGF β -dependent EMT.

Acknowledgements

We thank H. Bellen, R. Cagan, R. Kares, R. Leborgne, T. Lee, T. Tabata, P. ten Dijke, P. Therond, K. Wharton, the Developmental Studies Hybridoma Bank, the Bloomington Stock Center, for strains and antibodies; the Université Lyon I Imaging Facility (CTM), the ENS Lyon Imaging Facility (PLATIM) and the UMR5534 Drosophila Facility for technical help and P. Das for critical comments on the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Most experimental work was performed by I.B. J.L.D., J.C. and S.L.B. contributed experimental results. I.B. and J.L.C. contributed to the conception of the work and the preparation of the manuscript. M.G. designed the experiments and wrote the paper.

Funding

This work is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [07-JCJC_092-01b-01, Morphoepithe], the ANR [Blanc 12-SVSE-0023-01, MechInMorph], and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

- Baker, R. and Schubiger, G. (1996). Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development* **122**, 617–626.
- Bangli, E. and Wharton, K. (2006). Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *Dev. Biol.* **295**, 178–193.
- Bertet, C., Sulak, L. and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667–671.
- Blankenship, J. T., Backovic, S. T., Sanny, J. S., Weitz, O. and Zallen, J. A. (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. *Dev. Cell* **11**, 459–470.
- Cordero, J. B., Larson, D. E., Craig, C. R., Hays, R. and Cagan, R. (2007). Dynamic decapentaplegic signaling regulates patterning and adhesion in the *Drosophila* pupal retina. *Development* **134**, 1861–1871.
- de Celis, J. F. and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 3241–3251.
- Deng, W. M. and Bownes, M. (1997). Two signalling pathways specify localised expression of the Broad-Complex in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis. *Development* **124**, 4639–4647.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev.* **10**, 421–434.
- Dorfman, R. and Shilo, B. Z. (2001). Biphasic activation of the BMP pathway patterns the *Drosophila* embryonic dorsal region. *Development* **128**, 965–972.
- Furriols, M. and Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr. Biol.* **11**, 60–64.
- Gomez, J. M., Wang, Y. and Riechmann, V. (2012). Tao controls epithelial morphogenesis by promoting Fasciclin 2 endocytosis. *J. Cell Biol.* **199**, 1131–1143.
- González-Reyes, A. and St Johnston, D. (1998). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development* **125**, 2837–2846.
- Grammont, M. (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol.* **177**, 139–150.
- Grammont, M. and Irvine, K. D. (2001). fringe and Notch specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development* **128**, 2243–2253.
- Grammont, M. and Irvine, K. D. (2002). Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis. *Development* **129**, 5131–5140.
- Guichet, A., Peri, F. and Roth, S. (2001). Stable anterior anchoring of the oocyte nucleus is required to establish dorsoventral polarity of the *Drosophila* egg. *Dev. Biol.* **237**, 93–106.
- Haigo, S. L. and Bilder, D. (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science* **331**, 1071–1074.
- Harris, T. J. and Peifer, M. (2007). aPKC controls microtubule organization to balance adherens junction symmetry and planar polarity during development. *Dev. Cell* **12**, 727–738.
- Horne-Badovinac, S. and Bilder, D. (2005). Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Dyn.* **232**, 559–574.

- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A. and Schneuwly, S. (1997). GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell Tissue Res.* **290**, 1–10.
- Jacobsen, T. L., Brennan, K., Arias, A. M. and Muskavitch, M. A. (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4531–4540.
- Jordan, P. and Karsenti, R. (1997). Myosin light chain-activating phosphorylation sites are required for oogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **139**, 1805–1819.
- Klein, T., Brennan, K. and Arias, A. M. (1997). An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **189**, 123–134.
- Kolahi, K. S., White, P. F., Shreter, D. M., Classen, A. K., Bilder, D. and Mofrad, M. R. (2009). Quantitative analysis of epithelial morphogenesis in *Drosophila* oogenesis: New insights based on morphometric analysis and mechanical modeling. *Dev. Biol.* **331**, 129–139.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M. (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387–393.
- Melani, M., Simpson, K. J., Brugge, J. S. and Montell, D. (2008). Regulation of cell adhesion and collective cell migration by hindsight and its human homolog RREB1. *Curr. Biol.* **18**, 532–537.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S. (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485–1495.
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. and Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* **127**, 2021–2036.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. and Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* **7**, 1191–1204.
- Muzzopappa, M. and Wappner, P. (2005). Multiple roles of the F-box protein Slimb in *Drosophila* egg chamber development. *Development* **132**, 2561–2571.
- Nakao, A., Röijer, E., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Stenman, G., Heldin, C. H. and ten Dijke, P. (1997). Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 2896–2900.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357–368.
- Pérez-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.
- Peri, F., Technau, M. and Roth, S. (2002). Mechanisms of Gurken-dependent pipe regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* **129**, 2965–2975.
- Singer, M. A., Penton, A., Twombly, V., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M. (1997). Signaling through both type I DPP receptors is required for anterior-posterior patterning of the entire *Drosophila* wing. *Development* **124**, 79–89.
- Spradling, A. C. (1993). Development genetics of oogenesis. In *The Development of Drosophila Melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1–70. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- St Johnston, D. and Sanson, B. (2011). Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 540–546.
- Sutherland, D. J., Li, M., Liu, X. Q., Stefancsik, R. and Raftery, L. A. (2003). Stepwise formation of a SMAD activity gradient during dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* **130**, 5705–5716.
- Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J. and Tepass, U. (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* **151**, 891–904.
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W. and Gelbart, W. M. (1996). The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development* **122**, 1555–1565.
- Wang, X., Harris, R. E., Bayston, L. J. and Ashe, H. L. (2008). Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* **455**, 72–77.
- Wharton, K. A. (1995). How many receptors does it take? *BioEssays* **17**, 13–16.
- Wharton, K. and Derynck, R. (2009). TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* **136**, 3691–3697.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223–1237.
- Yakoby, N., Lembong, J., Schüpbach, T. and Shvartsman, S. Y. (2008). *Drosophila* eggshell is patterned by sequential action of feedforward and feedback loops. *Development* **135**, 343–351.
- Yoshida, S., Soustelle, L., Giangrande, A., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Awasaki, T., Ito, K., Sato, M. and Tabata, T. (2005). DPP signaling controls development of the lamina glia required for retinal axon targeting in the visual system of *Drosophila*. *Development* **132**, 4587–4598.
- Zartman, J. J., Kanodia, J. S., Cheung, L. S. and Shvartsman, S. Y. (2009). Feedback control of the EGFR signaling gradient: superposition of domain-splitting events in *Drosophila* oogenesis. *Development* **136**, 2903–2911.
- Zavadi, J. and Böttinger, E. P. (2005). TGF-β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764–5774.
- Zheng, X., Wang, J., Haerry, T. E., Wu, A. Y., Martin, J., O'Connor, M. B., Lee, C. H. and Lee, T. (2003). TGF-beta signaling activates steroid hormone receptor expression during neuronal remodeling in the *Drosophila* brain. *Cell* **112**, 303–315.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les MBs sont principalement composées de Collagène de type IV, de Perlecan et de Laminine. Elles forment un réseau sur lequel les cellules peuvent se fixer et se développer. Au cours de la morphogenèse des tissus, les MBs sont des structures dynamiques capables de moduler la signalisation et le devenir des cellules. Des défauts dans la production ou l'assemblage des constituants des MBs entraînent des pathologies complexes et graves dont certains mécanismes ne sont pas encore élucidés.

La morphogenèse est un processus durant lequel les cellules et les tissus changent de forme afin de créer une forme complexe caractéristique des organes et des tissus chez l'adulte. Les MBs participent physiquement à la régulation de la morphogenèse en modifiant l'adhésion cellulaire, en résistant aux forces exercées par les cellules elles-mêmes, ou en contraignant la croissance d'un tissu. Un certain nombre d'études in-vitro, en culture de cellules, montrent que des changements des propriétés physiques des MBs pouvaient influencer sur l'activité et la forme des cellules. Par exemple, les changements de la rigidité de la MB ou les adhésions cellules/MB affectent la contractilité et diminuent les signaux d'activation de voies de signalisation (Charras and Sahai, 2014). L'organisation ainsi que la composition des MBs peuvent aussi influencer sur la migration cellulaire (Kim et al., 2012), mais aussi sur le sens et la vitesse de la migration (Diehl et al., 2005 ; Provenzano et al., 2006 ; Tan and Saltzman, 2002). La Drosophile offre un très bon modèle d'étude du rôle des MBs au cours de morphogenèse.

Chez la Drosophile adulte, ce sont préférentiellement les hémocytes et les cellules du corps gras qui produisent tous les constituants des MBs. Cependant, chez la femelle, il a été caractérisé par la présence d'un épithélium synthétisant et sécrétant ses propres constituants : l'épithélium folliculaire (Van De Bor et al., 2015). Ces cellules synthétisent et sécrètent les constituants des MBs principalement lors de la rotation du follicule entre les stades 5 à 8.

Au cours de mon doctorat, j'ai pu montrer que les MBs se rigidifient durant l'ovogenèse au cours de la rotation du follicule. Nos résultats révèlent la présence d'un gradient A/P de rigidité de la MB au cours de la morphogenèse des CFs au stade 9.

Entre les stades 8 à 10, les follicules s'allongent dans l'axe A/P. Mes travaux permettent de compléter et de proposer un modèle de croissance du follicule et de valider la notion de corset moléculaire contraignant la croissance préférentiellement dans l'axe A/P. Ainsi, cette croissance n'est plus le fruit d'une migration postérieure des CFs, mais plutôt l'accumulation d'une croissance hétérogène de la lignée germinale selon un gradient A/P et d'un assouplissement de la MB en antérieur. La composition de la MB, ainsi que le lien entre les CFs et la MB semblent primordiaux à la croissance et la forme des follicules. En effet, les résultats obtenus avec un traitement collagénase ou un mutant Intégrines montrent l'importance de ces paramètres. Ces changements morphologiques du follicule interviennent en l'absence de divisions et morts cellulaires. Ils sont le reflet de mécanismes propres aux cellules, tels que la mécanotransduction, la migration et le réarrangement, mais aussi l'adhésion et le remodelage du cytosquelette (Mofrad and Kamm, 2009). Cependant de nombreuses questions restent sans réponses, notamment :

- Comment expliquer les différences régionales de la rigidité de la MB durant le stade 9 ?
- Quel est le rôle de la croissance de la lignée germinale sur la rigidité de la MB et donc de la morphogenèse des CFs ?

Partie I. Comment expliquer les différences régionales de la rigidité de la MB au cours de la morphogenèse ?

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'augmentation de la rigidité au cours de l'ovogenèse était concomitante à l'incorporation des constituants de la MB sécrétés par les CFs. Nos résultats suggèrent que la rigidité est directement due à cette incorporation. Au stade 9 nous notons une différence régionale de la rigidité ainsi qu'un changement dans l'organisation des constituants de la MB. Ces observations laissent sous-

entendre un remodelage régionalisé et régulé des constituants de la MB, permettant la morphogenèse des CFs, mais aussi la croissance et l'expansion A/P du follicule.

A. Régulation de la rigidité par l'action des MMPs

Chez les vertébrés, les MMPs sont capables de cliver des fragments de Collagène de type IV, de Perlecan (domaine V) et de Laminine (chaîne $\alpha 3$) et possèdent des propriétés anti-angiogéniques, c'est-à-dire bloquant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et par conséquent empêchant la progression et l'invasion des cellules tumorales lors des cancers.

Les cibles du remodelage sont principalement les protéases de régulation des constituants des MBs : les enzymes de la matrice, dont la famille des MMPs. Ces protéases sont produites par les tissus en contact avec les MBs afin de dégrader les liens entre les acteurs moléculaires des MBs.

Chez la *Drosophile*, nous pouvons compter deux MMPs : MMP1 et MMP2. Des études montrent que la sous-unité MMP1 agit préférentiellement dans la rupture des liaisons cellules/cellules alors que la sous-unité MMP2 est retrouvée au niveau des sites de clivage du domaine NC1 du Collagène de type IV, mais aussi du Perlecan. Des études de pertes de fonctions ont révélé qu'en plus du follicule ovarien, les MBs influent de manières critiques sur la morphogenèse de beaucoup d'autres organes et tissus chez la *Drosophile* : l'épithélium du disque imaginal de l'aile et la migration des cellules gliales du disque imaginal de l'œil.

Au niveau de l'aile, une dégradation locale de la MB est requise pour deux processus développementaux. Au cours du développement larvaire, le tissu trachéal adjacent doit envahir l'épithélium sous-jacent afin de former une ébauche de sac aérien. Ce processus nécessite une dégradation locale de la MB par MMP2 (Guha et al., 2009). Dans la puppe, le disque d'aile forme l'aile externe par un processus connu sous le nom d'inversion de disque. Cette morphogenèse requiert elle aussi la production de MMP2 (Strivastava et

al., 2007). C'est au cours de ce processus morphogénétique que nous pouvons observer un patron spécifique d'un clivage du réseau formé par le Collagène de type IV (Fessler et al., 1993).

Afin de tester de rôle des MMPs au cours de la morphogenèse épithéliale, nous avons réalisé une expérience préliminaire qui semble encourageante afin d'expliquer les différences régionales de rigidité de la MB. De façon intéressante, nous avons pu détecter une expression régionalisée d'un rapporteur GFP sous le contrôle du promoteur de MMP1 en live (Figure 41-A). Cette observation révèle l'activation du promoteur au stade 9 au niveau des futures cellules squameuses en antérieur. Afin de nous assurer que la protéase était bien retrouvée au niveau des cellules squameuses, nous avons observé en « live » l'expression de la protéase MMP1 fusionnée à la GFP (Figure 41 -B-B'-C) et réalisé un marquage à l'aide d'un anticorps anti-MMP1 (Figure 41-D') sur des follicules aux stades 9 et 10. Nous observons une expression de MMP1 en antérieur au stade 9 et 10. Le marquage anticorps présente une très forte expression localisée au pôle antérieur des follicules au stade 9. De manière surprenante, mais non systématique, nous observons un début de marquage au niveau d'un petit groupe de cellules en antérieur au stade 8. Cette observation au stade 8 s'expliquerait par la sécrétion de MMP1 au niveau des cellules de bordure, afin de dégrader localement la MB pour permettre leur migration au cours du stade 9 (Medioni and Noselli, 2005).

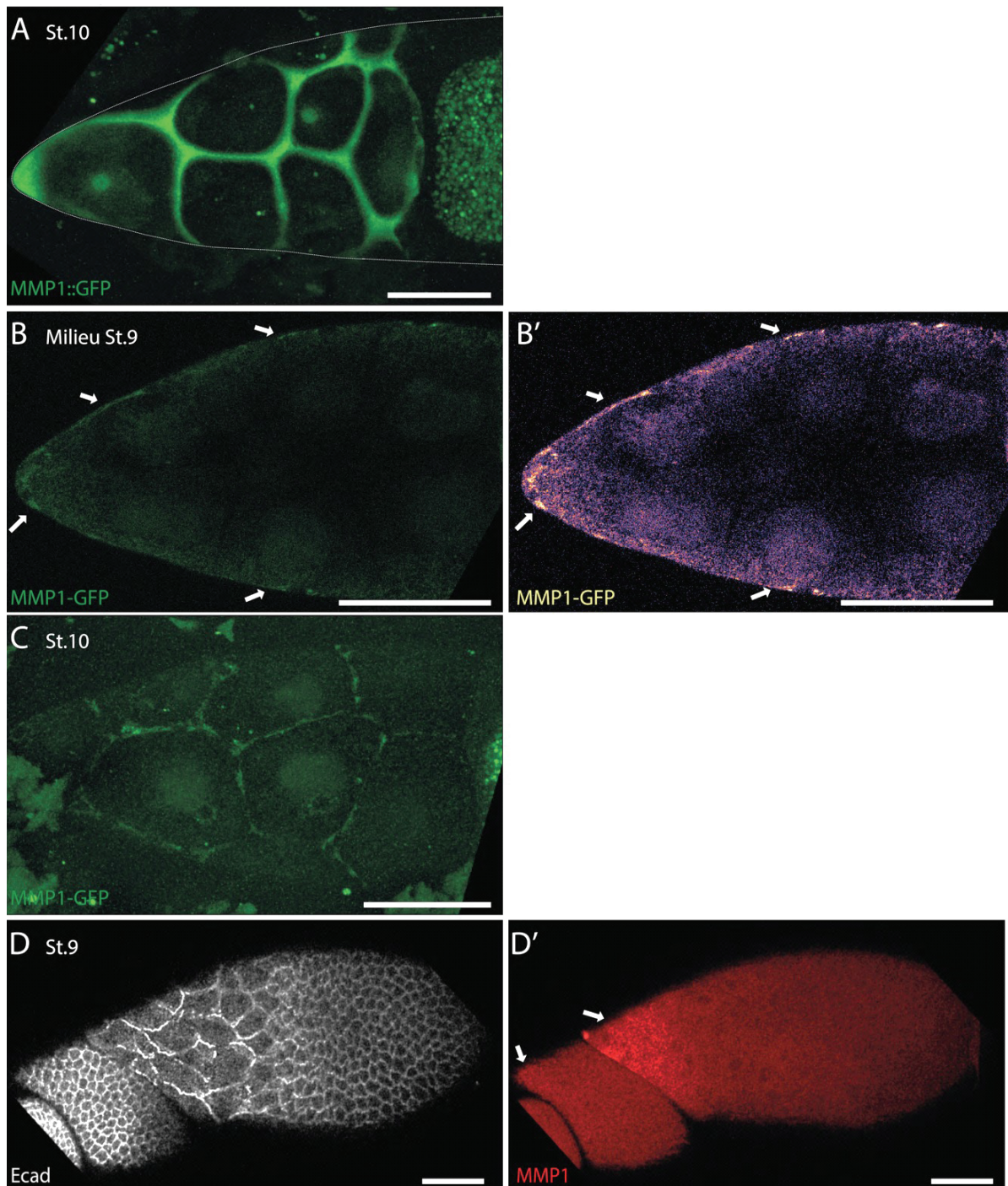


Figure 41 : Activité du promoteur et expression de MMP1 au cours de la morphogenèse des CFs

(A) Expression de la GFP sous le promoteur de MMP1 uniquement dans les cellules squameuses au stade 10. (B-C) Observation en live de la localisation de la protéine fusion MMP1-GFP au stade 9 et 10. (B-B') Forte intensité de GFP localisée dans les cellules squameuses (flèches). Utilisation d'un gradient de couleur (B'), afin de visualiser une différence d'intensité de GFP : du noir (pas d'accumulation) au jaune (forte accumulation). (D) Les jonctions d'adhérence sont marquées avec l'anticorps anti-Ecad (gris). (D') Localisation de la protéase MMP1 (rouge) en antérieur aux stades 7-8 et 9 (flèches).

En parallèle de cette observation, nous avons entrepris une analyse des cellules exprimant un RNAi contre MMP1 (Figure 42). Nos résultats préliminaires révèlent un retard ainsi qu'un défaut d'aplatissement des cellules squameuses exprimant le RNAi. La diminution de l'expression de MMP1 semble perturber l'aplatissement des cellules en antérieur.

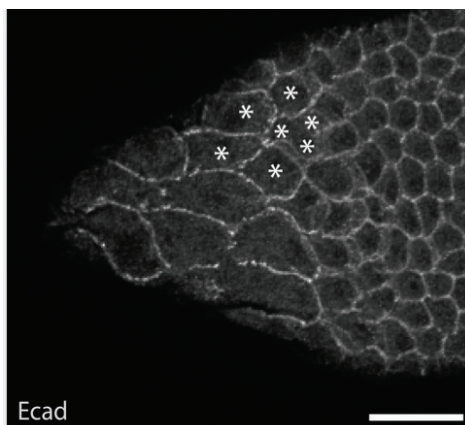


Figure 42 : MMP1 est requis pour la morphogenèse des CFs.

Follicule au stade 9, les CFs sont marquées par Ecad (gris) et les CFs exprimant un RNAi MMP1 sont marquées d'un astérisque.

Ces expériences semblent indiquer que MMP1 agit sur la morphogenèse en déstabilisant préférentiellement les jonctions cellules/cellules et secondairement le réseau de la MB. Des analyses approfondies seront appréciées concernant le rôle précis de MMP1 sur les jonctions cadhérines.

Il s'agit donc à présent de mesurer les propriétés mécaniques de la MB au niveau d'un follicule exprimant de manière ubiquitaire (traffic jam) un RNAi MMP1 ainsi que MMP2. Des analyses sont en cours au sein de l'équipe afin de mesurer les propriétés mécaniques de la MB par AFM. Les résultats préliminaires semblent montrer une augmentation significative de la rigidité de la MB lorsque l'expression de MMP1 est diminuée, au stade 8 et 9. Ainsi, l'expression régionalisée des MMPs sous-entend l'activation ou l'inhibition de voies spécifiques « antérieures » pouvant être la voie de signalisation TGF β / Décapentaplegic (Dpp) (Brigaud et al, 2015). Afin de mesurer l'implication de cette voie de signalisation, des analyses de l'expression de pmad sont

entreprises au sein de l'équipe sur des follicules exprimant des clones RNAi MMP1 et MMP2 ainsi que des mutants MMP1, aux stades 8, 9 et 10.

Le marquage Ac anti-MMP1 révèle une expression au stade 8, au moment où nous observons une augmentation du volume des cellules de la lignée germinale (MARS-ALT). Quel est le rôle de la lignée germinale dans le contrôle de la rigidité de la MB ?

B. Quel est le rôle de l'interaction des CFs avec la MB ?

Entre les stades 1 à 8 les surfaces basales des CFs se déforment et migrent perpendiculairement à l'axe A/P (Cetera et al., 2014 ; Haigo and Bilder, 2011), alors que leurs surfaces apicales restent physiquement attachées aux cellules de la lignée germinale, ce mouvement collectif dans un même sens provoque la rotation de la chambre d'œuf à l'intérieur du corset de MB qui reste stationnaire tout au long de la rotation. Au cours de cette rotation, les constituants des MBs s'orientent perpendiculairement à l'axe A/P. Ainsi les interactions cellules/MB doivent diminuer. Il existe de nombreux récepteurs de liaisons cellules/MB. Les plus connus et décrits sont les Intégrines. Ce sont des récepteurs transmembranaires constitués d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Chez les vertébrés, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent former 24 clusters d'Intégrines différents. Chez la Drosophile, il existe 5 sous-unités α (α PS 1-5) et 2 sous-unités β (β PS et β v) qui peuvent former 10 récepteurs différents.

Nos travaux ont pu montrer l'importance des Intégrines au cours de la morphogenèse. Haigo et Bilder en 2011 montrent que l'absence de la sous-unité β conduit à la production de follicules ronds. D'après ces résultats, le maintien des CFs à la MB par l'intermédiaire des Intégrines est primordial à l'homéostasie du follicule. Quels mécanismes peuvent maintenir et renforcer les récepteurs Intégrines au niveau des cellules squameuses ? Nous avons effectué des analyses préliminaires sur la protéine Transglutaminase (TG) qui a des rôles multiples tels que le cross-linking des Intégrines. Des études récentes montrent son rôle majeur dans l'adhésion et la migration des cellules épithéliales de la cornée (Tong et al., 2013). Le phénotype observé pour une surexpression de TG au niveau du follicule

ovarien est systématiquement un défaut d'aplatissement, avec dans 60 % des cas une augmentation de la surface apicale et une perte de l'homéostasie du follicule (n=6) (Figure 43). Les MMPs permettent de dégrader la MB en antérieur, alors que la TG permet de renforcer le cluster d'Intégrines aux points de contacts C/C. Il est possible que TG agisse de façon à maintenir à des points précis les Intégrines, permettant ainsi l'aplatissement préférentiel dans l'axe A/P. Cette hypothèse peut être vérifiée en utilisant un mutant TG, ainsi nous pourrions comparer l'anisotropie des cellules mutantes avec les cellules sauvages.

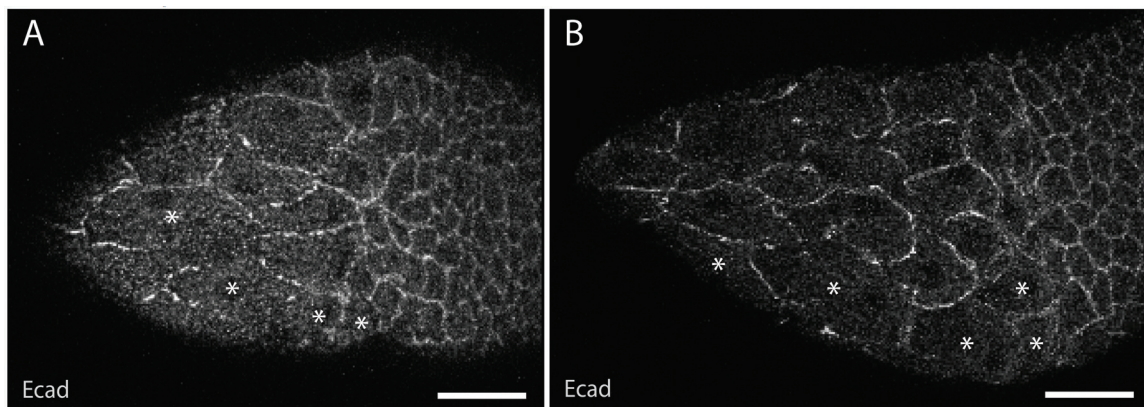


Figure 43 : La surexpression de TG augmente l'aplatissement des CFs.

(A-B) Follicule au stade 9. Les CFs sont marquées par Ecad (gris) et les CFs exprimant la surexpression de TG sont marquées d'un astérisque.

Partie II. Quel est le rôle de la croissance de la lignée germinale sur la rigidité de la MB ?

Kolahi et al., en 2009, présentent un modèle de morphogenèse des CFs intégrant deux contraintes : la pression exercée par la croissance des cellules nourricières et la tension présente dans les CFs. Avant le stade 5, ils expliquent la forme ronde du follicule par la présence d'un équilibre entre ces deux contraintes. L'allongement est donc une balance entre pression des cellules nourricières et tension des CFs. Le degré ainsi que le nombre de cellules squameuses sont affectés dans un mutant affectant la croissance de la lignée germinale : *dicephalic (dic)* (Kolahi et al., 2009). Ainsi les auteurs démontrent que le processus morphogénétique des CFs dépend entre autre des propriétés physiques d'un tissu interne. Nos analyses MARS-ALT ont permis d'actualiser les valeurs de surface, de

volume et de hauteur des CFs et des cellules nourricières au cours de l'ovogenèse et de les corréler avec celles trouvées par Kolahi et al., en 2009. Les valeurs décrites dans cette étude sont surestimées d'un facteur 1,5-2,5. Ces différences peuvent s'expliquer en raison de notre méthode d'acquisition n'affectant pas la forme des follicules. Les analyses sur les cellules nourricières révèlent que celles localisées en antérieur ont un volume plus faible que celles en postérieur. Malgré cette différence de taille, nous avons montré que la croissance des cellules antérieures était beaucoup plus forte que celles en postérieures entre les stades 8 à 9. Cette observation sous-entend une augmentation de la pression des cellules nourricières en antérieure entre les stades 8 à 9, ainsi qu'au cours du stade 9.

Dans l'équipe, des mesures de pressions de la lignée germinale ont été entreprises en utilisant l'AFM. Les mesures ont été effectuées sur des follicules au stade 9 et 10 sur des follicules sauvages et sur le mutant *dic* (Milani et al., données non publiées). Les résultats révèlent la présence d'un gradient de pression A/P. En effet, les cellules nourricières localisées en antérieur sont plus pressurisées que celles situées proche de l'ovocyte. Ce gradient s'accroît au fur et à mesure du stade 9 et 10. Ce gradient de pression est donc inverse au gradient de rigidité de la MB. Les analyses sur le mutant *dic* révèlent une homogénéité de pression de la chambre d'œuf et des valeurs moyennes plus basses que celles mesurées chez le sauvage.

Partie III. Modèle de la morphogenèse des CFs au cours du stade 9

Trois forces contraignent les CFs : la croissance de la lignée germinale, la présence du corset de la MB et la tension interne des CFs. Au cours de mon doctorat, j'ai quantifié la croissance de la lignée germinale au cours du stade 8 et 9 (MARS-ALT), et la présence d'un gradient de rigidité de la MB au début du stade 9 (AFM).

Ainsi, il semble que le premier signal de morphogenèse des CFs ait lieu au cours du stade 8. En effet, nos résultats révèlent une augmentation du volume des cellules nourricières antérieures, corrélé avec l'arrêt de la rotation et un changement de forme des CFs antérieures. Ce début d'aplatissement marque un assouplissement mesuré au début de stade 9 de la MB en antérieur avec la sécrétion de MMP1 par les futures cellules

squameuses uniquement. Au cours de ce stade, la lignée germinale continue de croître de manière hétérogène. Les cellules nourricières antérieures sont plus petites et pressurisées que celles localisées en postérieur. La morphogenèse des CFs est dépendante de nombreux facteurs extrinsèques, mais aussi intrinsèques tels que les voies de signalisation TGF β , Notch (Figure 44).

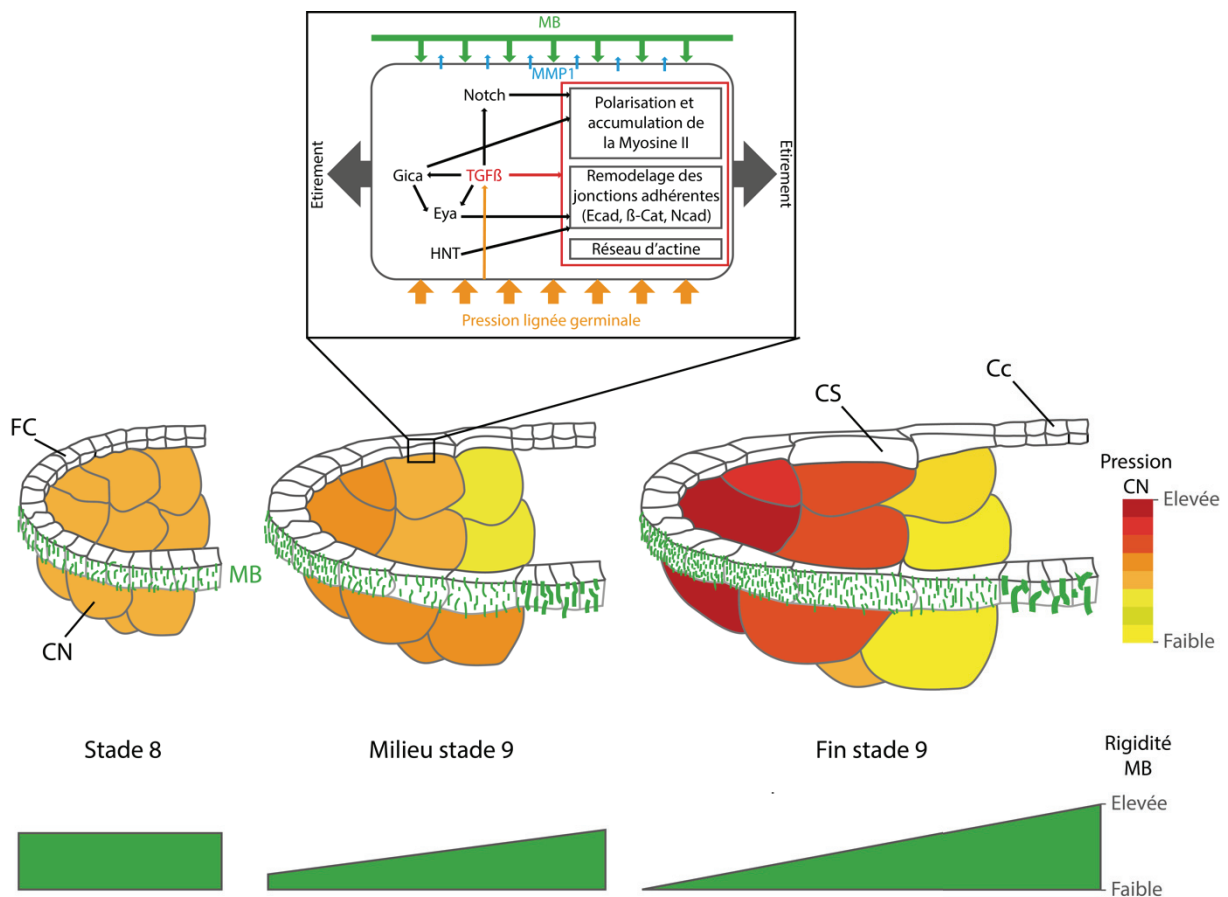


Figure 44 : Modèle de la morphogenèse des CFs.

CONCLUSION

Ces données mécaniques sur les MBs au cours de la morphogenèse s'intègrent dans la compréhension de la formation d'un organe multicouche. La poursuite de nos travaux permettra de créer un modèle informatique de la morphogenèse épithéliale, ainsi chaque valeur (rigidité, pression, voies de signalisation, hauteur cellulaire) pourra être implémentée de façon à recueillir les informations sur l'implication de nouveaux acteurs (moléculaire ou physique) sur ce processus de morphogenèse.

La morphogenèse épithéliale est un processus complexe nécessitant de nombreux changements : mécanique, cellulaire, activation de voies de signalisation... L'étude des propriétés mécaniques des MBs n'est qu'un niveau dans cette compréhension globale d'un processus. Dans notre étude, nous montrons que les variations observées de la structure, mais aussi de la mécanique des MBs se font de manière régionalisée et temporalisée. Ainsi, il est primordial de comprendre et de pousser les analyses sur la compréhension des facteurs régulant ces différentes variations.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aumailley, M. et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24**, 326–332 (2005).
- Bader, B. L. et al. Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6846–6856 (2005).
- Barresi, R. & Campbell, K. P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J. Cell. Sci.* **119**, 199–207 (2006).
- Bateman, J., Reddy, R. S., Saito, H. & Van Vactor, D. The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the Drosophila follicular epithelium. *Current Biology* **11**, 1317–1327 (2001).
- Belenkaya, T. Y. et al. Drosophila Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell* **119**, 231–244 (2004).
- Benny, P., Badowski, C., Lane, E. B. & Raghunath, M. Making more matrix: enhancing the deposition of dermal-epidermal junction components in vitro and accelerating organotypic skin culture development, using macromolecular crowding. *Tissue Eng Part A* **21**, 183–192 (2015).
- Binnig, null, Quate, null & Gerber, null. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
- Blumberg, B., MacKrell, A. J. & Fessler, J. H. Drosophila basement membrane procollagen alpha 1(IV). II. Complete cDNA sequence, genomic structure, and general implications for supramolecular assemblies. *J. Biol. Chem.* **263**, 18328–18337 (1988).
- Boll, W., Partin, J. S., Katz, A. I., Caplan, M. J. & Jamieson, J. D. Distinct pathways for basolateral targeting of membrane and secretory proteins in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8592–8596 (1991).
- Böse, K. et al. Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *J. Biol. Chem.* **281**, 39620–39629 (2006).
- Boutaud, A. et al. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 30716–30724 (2000).
- Brigaud, I. et al. Transforming Growth Factor β /activin signalling induces epithelial cell flattening during Drosophila oogenesis. *Biology Open* **4**, 345–354 (2015).
- Brown, N. H. Integrins hold Drosophila together. *Bioessays* **15**, 383–390 (1993).

Bunch, T. A. *et al.* Characterization of mutant alleles of myospheroid, the gene encoding the beta subunit of the Drosophila PS integrins. *Genetics* **132**, 519–528 (1992).

Bunt, S. *et al.* Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in Drosophila. *Dev. Cell* **19**, 296–306 (2010).

Butcher, D. T., Alliston, T. & Weaver, V. M. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 108–122 (2009).

Byron, A. *et al.* Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 953–966 (2014).

Callejo, A., Torroja, C., Quijada, L. & Guerrero, I. Hedgehog lipid modifications are required for Hedgehog stabilization in the extracellular matrix. *Development* **133**, 471–483 (2006).

Caplan, M. J. *et al.* Dependence on pH of polarized sorting of secreted proteins. *Nature* **329**, 632–635 (1987).

Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B. & Chung, A. E. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **256**, 5209–5214 (1981).

Cetera, M. *et al.* Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during Drosophila egg chamber elongation. *Nat Commun* **5**, 5511 (2014).

Chakravarti, S., Tam, M. F. & Chung, A. E. The basement membrane glycoprotein entactin promotes cell attachment and binds calcium ions. *J. Biol. Chem.* **265**, 10597–10603 (1990).

Chan, F. L., Inoue, S. & Leblond, C. P. The basement membranes of cryofixed or aldehyde-fixed, freeze-substituted tissues are composed of a lamina densa and do not contain a lamina lucida. *Cell Tissue Res.* **273**, 41–52 (1993).

Chao, S. & Nagoshi, R. N. Induction of apoptosis in the germline and follicle layer of Drosophila egg chambers. *Mech. Dev.* **88**, 159–172 (1999).

Cohen, I., Guillerault, F., Girard, J. & Prip-Buus, C. The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 contains an internal mitochondrial import signal and residues essential for folding of its C-terminal catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 5403–5411 (2001).

Daley, W. P. & Yamada, K. M. ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 408–414 (2013).

De Almeida, J. B. & Stow, J. L. Disruption of microtubules alters polarity of basement membrane proteoglycan secretion in epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **261**, C691–700 (1991).

Delon, I. & Brown, N. H. The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *J. Cell. Sci.* **122**, 4363–4374 (2009).

Denef, N., Chen, Y., Weeks, S. D., Barcelo, G. & Schüpbach, T. Crag regulates epithelial architecture and polarized deposition of basement membrane proteins in *Drosophila*. *Dev. Cell* **14**, 354–364 (2008).

Deng, W.-M. *et al.* Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Development* **130**, 173–184 (2003).

Diehl, K. A., Foley, J. D., Nealey, P. F. & Murphy, C. J. Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration. *J Biomed Mater Res A* **75**, 603–611 (2005).

DiPersio, C. M., Shao, M., Di Costanzo, L., Kreidberg, J. A. & Hynes, R. O. Mouse keratinocytes immortalized with large T antigen acquire alpha3beta1 integrin-dependent secretion of MMP-9/gelatinase B. *J. Cell. Sci.* **113** (Pt 16), 2909–2921 (2000).

Dobens, L. L. & Raftery, L. A. Integration of epithelial patterning and morphogenesis in *Drosophila* ovarian follicle cells. *Dev. Dyn.* **218**, 80–93 (2000).

Durbeej, M. & Ekblom, P. Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. *Exp. Lung Res.* **23**, 109–118 (1997).

Durbeej, M., Henry, M. D. & Campbell, K. P. Dystroglycan in development and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 594–601 (1998).

Durbeej, M. *et al.* Dystroglycan binding to laminin alpha1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation* **69**, 121–134 (2001).

Eastburn, D. J. & Mostov, K. E. Laying the foundation for epithelia: insights into polarized basement membrane deposition. *EMBO Rep.* **11**, 329–330 (2010).

Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174 (2002).

Ellisen, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649–661 (1991).

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).

Fernandez, R. *et al.* Imaging plant growth in 4D: robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nat. Methods* **7**, 547–553 (2010).

Fessler, J. H. & Fessler, L. I. Drosophila extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 309–339 (1989).

Fessler, L. I., Campbell, A. G., Duncan, K. G. & Fessler, J. H. Drosophila laminin: characterization and localization. *J. Cell Biol.* **105**, 2383–2391 (1987).

Fessler, L. I., Condic, M. L., Nelson, R. E., Fessler, J. H. & Fristrom, J. W. Site-specific cleavage of basement membrane collagen IV during Drosophila metamorphosis. *Development* **117**, 1061–1069 (1993).

Fogerty, F. J. et al. Tigrin, a novel Drosophila extracellular matrix protein that functions as a ligand for Drosophila alpha PS2 beta PS integrins. *Development* **120**, 1747–1758 (1994).

Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* **123**, 4195–4200 (2010).

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

Frisch, S. M. & Screaton, R. A. Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 555–562 (2001).

Frydman, H. M. & Spradling, A. C. The receptor-like tyrosine phosphatase lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within drosophila ovarian follicles. *Development* **128**, 3209–3220 (2001).

Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L. & Théron, P. P. Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in Drosophila epithelia. *Development* **133**, 407–418 (2006).

Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2506–2519 (2014).

Georgiou, M. & Baum, B. Polarity proteins and Rho GTPases cooperate to spatially organise epithelial actin-based protrusions. *J. Cell. Sci.* **123**, 1089–1098 (2010).

Gershlak, J. R. et al. Mesenchymal stem cells ability to generate traction stress in response to substrate stiffness is modulated by the changing extracellular matrix composition of the heart during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439**, 161–166 (2013).

Gilbert, P. M. et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* **329**, 1078–1081 (2010).

Ginsberg, M. H., O'Toole, T. E., Loftus, J. C. & Plow, E. F. Ligand binding to integrins: dynamic regulation and common mechanisms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **57**, 221–231 (1992).

Golic, K. G. & Lindquist, S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499–509 (1989).

Gomez, J. M., Wang, Y. & Riechmann, V. Tao controls epithelial morphogenesis by promoting Fasciclin 2 endocytosis. *J Cell Biol* **199**, 1131–1143 (2012).

Gong, Z. & Niklason, L. E. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J.* **22**, 1635–1648 (2008).

Gotwals, P. J., Paine-Saunders, S. E., Stark, K. A. & Hynes, R. O. *Drosophila* integrins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 734–739 (1994).

Grammont, M. Adherens junction remodeling by the Notch pathway in *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol.* **177**, 139–150 (2007).

Grobstein, C. & Cohen, J. Collagenase: effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro. *Science* **150**, 626–628 (1965).

Guha, A., Lin, L. & Kornberg, T. B. Regulation of *Drosophila* matrix metalloprotease Mmp2 is essential for wing imaginal disc:trachea association and air sac tubulogenesis. *Dev. Biol.* **335**, 317–326 (2009).

Guichet, A., Peri, F. and Roth, S. Stable anterior anchoring of the oocyte nucleus is required to establish dorsoventral polarity of the *Drosophila* egg. *Dev. Biol.* **237**, 93–106 (2001).

Gutzeit, H. O., Eberhardt, W. & Gratwohl, E. Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J. Cell. Sci.* **100** (Pt 4), 781–788 (1991).

Gutzeit, H. O., Eberhardt, W. & Gratwohl, E. Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *Journal of cell science* **100**, 781–788 (1991).

Haigo, S. L. Cellular and molecular mechanisms underlying tissue elongation of the developing egg in *Drosophila melanogaster*. (2011).

Hannezo, E., Prost, J. & Joanny, J.-F. Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 27–32 (2014).

Hassell, J. R. et al. Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 4494–4498 (1980).

He, L., Wang, X., Tang, H. L. & Montell, D. J. Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1133–1142 (2010).

Henry, M. D., Williamson, R. A. & Campbell, K. P. Analysis of the role of dystroglycan in early postimplantation mouse development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **857**, 256–259 (1998).

Holt, K. H., Crosbie, R. H., Venzke, D. P. & Campbell, K. P. Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett.* **468**, 79–83 (2000).

Hood, J. D. & Cheresh, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 91–100 (2002).

Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. & Timpl, R. Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J. Biochem.* **259**, 917–925 (1999).

Horne-Badovinac, S. The *Drosophila* egg chamber—a new spin on how tissues elongate. *Integr. Comp. Biol.* **54**, 667–676 (2014).

Horne-Badovinac, S. & Bilder, D. Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Dyn.* **232**, 559–574 (2005).

Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K. & Juliano, R. L. Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 220–231 (1998).

Humphries, M. J. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 632–640 (1996).

Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216–1219 (2009).

Jenkins, R. G. et al. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances $\alpha(v)\beta_6$ integrin-dependent TGF- β activation and promotes acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **116**, 1606–1614 (2006).

Jeon, H. et al. Pericytes from microvessel fragment produce type IV collagen and multiple laminin isoforms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 856–861 (1996).

Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 422–433 (2003).

Khoshnoodi, J. et al. Mechanism of chain selection in the assembly of collagen IV: a prominent role for the α_2 chain. *J. Biol. Chem.* **281**, 6058–6069 (2006).

King, R. C. *Ovarian development in *Drosophila melanogaster**. (Academic Press, 1970).

Knibiehler, M. & Lazdunski, C. Conformation of colicin A: apparent difference between cytoplasmic and extracellular polypeptide chain. *FEBS Lett.* **216**, 183–189 (1987).

Kolahi, K. S. et al. Quantitative analysis of epithelial morphogenesis in *Drosophila* oogenesis: New insights based on morphometric analysis and mechanical modeling. *Dev. Biol.* **331**, 129–139 (2009).

Koride, S. et al. Mechanochemical regulation of oscillatory follicle cell dynamics in the developing *Drosophila* egg chamber. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3709–3716 (2014).

Kuo, D. S., Labelle-Dumais, C. & Gould, D. B. COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum. Mol. Genet.* **21**, R97–110 (2012).

Kusche-Gullberg, M., Garrison, K., MacKrell, A. J., Fessler, L. I. & Fessler, J. H. Laminin A chain: expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *EMBO J.* **11**, 4519–4527 (1992).

Kusuma, S., Zhao, S. & Gerecht, S. The extracellular matrix is a novel attribute of endothelial progenitors and of hypoxic mature endothelial cells. *FASEB J.* **26**, 4925–4936 (2012).

Lamandé, S. R. & Bateman, J. F. Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 455–464 (1999).

Le Parco, Y., Cecchini, J. P., Knibiehler, B. & Mirre, C. Characterization and expression of collagen-like genes in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Cell* **56**, 217–226 (1986).

Le Parco, Y., Knibiehler, B., Cecchini, J. P. & Mirre, C. Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during *Drosophila melanogaster* development. *Exp. Cell Res.* **163**, 405–412 (1986).

Lerner, D. W. et al. A Rab10-dependent mechanism for polarized basement membrane secretion during organ morphogenesis. *Dev. Cell* **24**, 159–168 (2013).

Levental, K. R. et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**, 891–906 (2009).

Lewellyn, L., Cetera, M. & Horne-Badovinac, S. Misshapen decreases integrin levels to promote epithelial motility and planar polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **200**, 721–729 (2013).

Li, S. et al. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J. Cell Biol.* **157**, 1279–1290 (2002).

Li, S. et al. Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J. Cell Biol.* **169**, 179–189 (2005).

Lin, G. et al. Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **377**, 177–187 (2013).

Llano, E. et al. Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 23321–23329 (2002).

Longley, R. L. & Ready, D. F. Integrins and the development of three-dimensional structure in the *Drosophila* compound eye. *Dev. Biol.* **171**, 415–433 (1995).

Lunstrum, G. P. et al. *Drosophila* basement membrane procollagen IV. I. Protein characterization and distribution. *J. Biol. Chem.* **263**, 18318–18327 (1988).

Macdonald, P. R., Lustig, A., Steinmetz, M. O. & Kammerer, R. A. Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J. Struct. Biol.* **170**, 398–405 (2010).

Maquart, F. X., G. Bellon, S. Pasco and J. C. Monboisse. "Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation." *Biochimie* 87(3-4): 353-360 (2005).

Margolis, J. & Spradling, A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **121**, 3797–3807 (1995).

Martin-Bermudo, M. D. & Brown, N. H. Uncoupling integrin adhesion and signaling: the betaPS cytoplasmic domain is sufficient to regulate gene expression in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **13**, 729–739 (1999).

Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M. & Ringuette, M. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J. Cell. Sci.* **121**, 1671–1680 (2008).

McCall, A. S. et al. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* **157**, 1380–1392 (2014).

McKee, K. K., Capizzi, S. & Yurchenco, P. D. Scaffold-forming and Adhesive Contributions of Synthetic Laminin-binding Proteins to Basement Membrane Assembly. *J. Biol. Chem.* **284**, 8984–8994 (2009).

McKee, K. K., Harrison, D., Capizzi, S. & Yurchenco, P. D. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J. Biol. Chem.* **282**, 21437–21447 (2007).

Medioni, C. & Noselli, S. Dynamics of the basement membrane in invasive epithelial clusters in *Drosophila*. *Development* **132**, 3069–3077 (2005).

- Melani, M., Simpson, K. J., Brugge, J. S. & Montell, D. Regulation of cell adhesion and collective cell migration by hindsight and its human homolog RREB1. *Curr. Biol.* **18**, 532–537 (2008).
- Milani, P. et al. In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in Arabidopsis using atomic force microscopy. *Plant J.* **67**, 1116–1123 (2011).
- Mirre, C., Cecchini, J. P., Le Parco, Y. & Knibiehler, B. De novo expression of a type IV collagen gene in Drosophila embryos is restricted to mesodermal derivatives and occurs at germ band shortening. *Development* **102**, 369–376 (1988).
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. and Miyazono, K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* **7**, 1191-1204 (2002).
- Monson, J. M., Natzle, J., Friedman, J. & McCarthy, B. J. Expression and novel structure of a collagen gene in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 1761–1765 (1982).
- Montell, D. J. & Goodman, C. S. Drosophila laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **109**, 2441–2453 (1989).
- Morrissey, M. A. & Sherwood, D. R. An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. *J. Cell. Sci.* **128**, 1661–1668 (2015).
- Murdoch, A. D., Dodge, G. R., Cohen, I., Tuan, R. S. & Iozzo, R. V. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **267**, 8544–8557 (1992).
- Muzzopappa, M. and Wappner, P. Multiple roles of the F-box protein Slimb in Drosophila egg chamber development. *Development* **132**, 2561-2571 (2005).
- Myllyharju, J. & Kivirikko, K. I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* **20**, 33–43 (2004).
- Nakanishi, Y., Nogawa, H., Hashimoto, Y., Kishi, J. & Hayakawa, T. Accumulation of collagen III at the cleft points of developing mouse submandibular epithelium. *Development* **104**, 51–59 (1988).
- Nicosia, R. F., Bonanno, E., Smith, M. & Yurchenco, P. Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex. *Dev. Biol.* **164**, 197–206 (1994).
- Ortega, N. & Werb, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell. Sci.* **115**, 4201–4214 (2002).

Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 221–233 (2007).

Pastor-Pareja, J. C. & Xu, T. Shaping cells and organs in *Drosophila* by opposing roles of fat body-secreted Collagen IV and perlecan. *Dev. Cell* **21**, 245–256 (2011).

Paulsson, M. et al. Purification and structural characterization of intact and fragmented nidogen obtained from a tumor basement membrane. *Eur. J. Biochem.* **156**, 467–478 (1986).

Pickering, J. G. et al. Fibroblast growth factor-2 potentiates vascular smooth muscle cell migration to platelet-derived growth factor: upregulation of $\alpha 2\beta 1$ integrin and disassembly of actin filaments. *Circ. Res.* **80**, 627–637 (1997).

Pohar, N., Godenschwege, T. A. & Buchner, E. Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. *Genomics* **57**, 293–296 (1999).

Prasad, M., Jang, A. C.-C., Starz-Gaiano, M., Melani, M. & Montell, D. J. A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging. *Nat Protoc* **2**, 2467–2473 (2007).

Provenzano, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* **4**, 38 (2006).

Rozario, T. & DeSimone, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* **341**, 126–140 (2010).

Ruben, G. C. & Yurchenco, P. D. High resolution platinum-carbon replication of freeze-dried basement membrane. *Microsc. Res. Tech.* **28**, 13–28 (1994).

Saito, K. et al. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell* **136**, 891–902 (2009).

Sansilvestri-Morel, P. et al. Synthesis of collagen is dysregulated in cultured fibroblasts derived from skin of subjects with varicose veins as it is in venous smooth muscle cells. *Circulation* **106**, 479–483 (2002).

Sawala, A., Sutcliffe, C. & Ashe, H. L. Multistep molecular mechanism for bone morphogenetic protein extracellular transport in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 11222–11227 (2012).

Schneider, M. et al. Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the *Drosophila* follicular epithelium to maintain epithelial organization. *Development* **133**, 3805–3815 (2006).

Senior, R. M., Gresham, H. D., Griffin, G. L., Brown, E. J. & Chung, A. E. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin. *J. Clin. Invest.* **90**, 2251–2257 (1992).

Sgambato, A. & Brancaccio, A. The dystroglycan complex: from biology to cancer. *J. Cell. Physiol.* **205**, 163–169 (2005).

Shibata, T. *et al.* Protein crosslinking by transglutaminase controls cuticle morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS ONE* **5**, e13477 (2010).

Six, E. M. *et al.* The notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration. *J. Biol. Chem.* **279**, 55818–55826 (2004).

Smyth, N. *et al.* The targeted deletion of the LAMC1 gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **857**, 283–286 (1998).

Song, I. S. *et al.* Heat shock protein 27 phosphorylation is involved in epithelial cell apoptosis as well as epithelial migration during corneal epithelial wound healing. *Exp. Eye Res.* **118**, 36–41 (2014).

Sorrosal, G., Pérez, L., Herranz, H. & Milán, M. Scarface, a secreted serine protease-like protein, regulates polarized localization of laminin A at the basement membrane of the *Drosophila* embryo. *EMBO Rep.* **11**, 373–379 (2010).

Spradling, A. C. Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* **133**, 361–373 (1993).

Srivastava, A., Pastor-Pareja, J. C., Igaki, T., Pagliarini, R. & Xu, T. Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2721–2726 (2007).

Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516 (2001).

Stratman, A. N. & Davis, G. E. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microsc. Microanal.* **18**, 68–80 (2012).

Suzanne, M., Perrimon, N. & Noselli, S. The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of the egg dorsal appendages and micropyle. *Dev. Biol.* **237**, 282–294 (2001).

Tan, J. & Saltzman, W. M. Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry. *Biomaterials* **23**, 3215–3225 (2002).

- Tanner, K. Regulation of the basement membrane by epithelia generated forces. *Phys Biol* **9**, 065003 (2012).
- Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H. & Wick, G. Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur. J. Biochem.* **137**, 455–465 (1983).
- Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. & Kühn, K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.* **120**, 203–211 (1981).
- Tse, J. R. & Engler, A. J. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS ONE* **6**, e15978 (2011).
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W. and Gelbart, W. M. The TGF-beta signaling pathway is essential for Drosophila oogenesis. *Development* **122**, 1555–1565 (1996).
- Urbano, J. M. *et al.* Drosophila laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* **136**, 4165–4176 (2009).
- Van Ijzendoorn, S. C. D., Mostov, K. E. & Hoekstra, D. Role of rab proteins in epithelial membrane traffic. *Int. Rev. Cytol.* **232**, 59–88 (2003).
- Van De Bor, V. *et al.* Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Rep* **13**, 546–560 (2015).
- Vartanian, K. B. *et al.* Distinct extracellular matrix microenvironments of progenitor and carotid endothelial cells. *J Biomed Mater Res A* **91**, 528–539 (2009).
- Venditti, R. *et al.* Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle. *Science* **337**, 1668–1672 (2012).
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration--the actin connection. *J. Cell. Sci.* **122**, 199–206 (2009).
- Viktorin, G., Chiuchitu, C., Rissler, M., Varga, Z. M. & Westerfield, M. Emx3 is required for the differentiation of dorsal telencephalic neurons. *Dev. Dyn.* **238**, 1984–1998 (2009). 158.
- Viktorinová, I. & Dahmann, C. Microtubule polarity predicts direction of egg chamber rotation in Drosophila. *Curr. Biol.* **23**, 1472–1477 (2013).
- Vu, T. H. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* **14**, 2123–2133 (2000).

- Wang, H., Lacoche, S., Huang, L., Xue, B. & Muthuswamy, S. K. Rotational motion during three-dimensional morphogenesis of mammary epithelial acini relates to laminin matrix assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 163–168 (2013).
- Wang, Q., Feng, J. J. & Pismen, L. M. A Cell-Level Biomechanical Model of *Drosophila* Dorsal Closure. *Biophysical Journal* **103**, 2265–2274 (2012).
- Wang, X., Harris, R. E., Bayston, L. J. & Ashe, H. L. Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* **455**, 72–77 (2008).
- Wang, Y. & Riechmann, V. The role of the actomyosin cytoskeleton in coordination of tissue growth during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Biol.* **17**, 1349–1355 (2007).
- Wharton, K. A. How many receptors does it take? *BioEssays* **17**, 13–16 (1995).
- White, S. R., Wojcik, K. R., Gruenert, D., Sun, S. & Dorscheid, D. R. Airway epithelial cell wound repair mediated by alpha-dystroglycan. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 179–186 (2001).
- Willem, M. *et al.* Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* **129**, 2711–2722 (2002).
- Wilson, D. G. *et al.* Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. *J. Cell Biol.* **193**, 935–951 (2011).
- Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J. & Hinz, B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **179**, 1311–1323 (2007).
- Yamada, S., Brown, K. E. & Yamada, K. M. Differential mRNA regulation of integrin subunits alpha V, beta 1, beta 3, and beta 5 during mouse embryonic organogenesis. *Cell Adhes. Commun.* **3**, 311–325 (1995).
- Yarnitzky, T. & Volk, T. Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **169**, 609–618 (1995).
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A. & Dearolf, C. R. viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* **198**, 17–25 (1997).
- Yee, G. H. & Hynes, R. O. A novel, tissue-specific integrin subunit, beta nu, expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Development* **118**, 845–858 (1993).
- Yelian, F. D., Edgeworth, N. A., Dong, L. J., Chung, A. E. & Armant, D. R. Recombinant entactin promotes mouse primary trophoblast cell adhesion and migration through the Arg-Gly-Asp (RGD) recognition sequence. *J. Cell Biol.* **121**, 923–929 (1993).

Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. & Ruben, G. C. Self-assembly of a high molecular weight basement membrane heparan sulfate proteoglycan into dimers and oligomers. *J. Biol. Chem.* **262**, 17668–17676 (1987).

Zusman, S., Patel-King, R. S., French-Constant, C. & Hynes, R. O. Requirements for integrins during *Drosophila* development. *Development* **108**, 391–402 (1990).

Les membranes basales (MB) jouent un rôle majeur au cours des processus morphogénétiques. Elles et sont principalement composées de Collagène de type IV, de Perlecan et de Laminine. Les récepteurs d'adhésions/signalisations (Intégrines / Dystroglycans) localisés au pôle basal des cellules épithéliales, interagissent directement avec les MBs. De nombreuses études montrent l'importance de la composition des MBs dans le devenir cellulaire. Cependant, le rôle mécanique de la MB au cours du développement d'un organe multicouche n'est pas connu. Comme modèle de morphogenèse épithéliale, nous avons choisi d'étudier l'épithélium du follicule ovarien chez *Drosophila melanogaster*. La MB entoure chaque follicule ovarien qui est composé d'une monocouche de cellules épithéliales cuboïdes entourant un groupe interne formé de 16 cellules de la lignée germinale (15 cellules nourricières en postérieur et 1 ovocyte en antérieur). Au cours du développement folliculaire, les cellules épithéliales s'aplatissent suivant une vague antéro-postérieur. Cette transition cellulaire cuboïde – aplatie dépend du remodelage des jonctions d'adhérence et du cytosquelette. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude du rôle mécanique et moléculaire de la MB au cours de la morphogenèse épithéliale chez la Drosophile. J'ai ainsi pu montrer (i) que la rigidité de la MB augmente au fur et à mesure du développement du follicule, (ii) que l'aplatissement dépend de la structure de la MB et de la liaison à cette MB grâce aux intégrines (iii) que la MB s'assouplit lors de la transition cuboïde-squameux et que cette assouplissement dépend de ce processus. Ces résultats démontrent un dynamisme mécanique et moléculaire de la MB au cours de l'ovogenèse et de la morphogenèse, révélant le rôle central de la MB lors de ces processus. Parallèlement j'ai développé une approche par segmentation cellulaire afin d'extraire les valeurs métriques (hauteur, anisotropie, surface basale, volume) des cellules épithéliales et de mesurer les variations de ces paramètres au cours de la morphogenèse épithéliale (MARS-ALT).

Mots clés : Membrane Basale, Morphogenèse, Développement, Collagène de type IV, Cellules folliculaires.