

# Tables des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	iv
Tables des matières.....	v
Liste des figures .....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations et acronymes.....	x
Remerciements .....	xiv
<b>Chapitre 1 - Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Présentation du modèle d'étude : <i>Drosophila melanogaster</i> .....	1
1.1.1 Le cycle de vie.....	1
1.1.2 Embryogenèse .....	2
1.1.3 Système UAS-GAL4.....	5
1.2 Les épithéliums .....	6
1.3 Les jonctions intercellulaires.....	8
1.4 La polarité apicobasale .....	11
1.4.1 Le domaine apical .....	13
1.4.1.1 Le module Par.....	13
1.4.1.2 Le module Crb.....	15
1.4.2 Le domaine basolatéral .....	18
1.4.2.1 Le module Scrib .....	18
1.4.2.2 Le groupe Yrt .....	20
1.4.3 Relation entre les déterminants apicaux et basolatéraux .....	22
1.5 La protéine Girdin.....	24
1.5.1 Présentation de la famille Girdin.....	24
1.5.2 Structure des protéines de la famille Girdin .....	26
1.5.3 Fonctions de Girdin .....	29
1.5.3.1 Liaison aux protéines G.....	29
1.5.3.2 Girdin et les voies de signalisation .....	30
1.5.3.3 Remodelage du cytosquelette d'actine.....	30
1.5.3.4 Régulation des microtubules .....	31
1.5.3.5 Régulation du transport vésiculaire .....	32
1.5.3.6 Girdin et les jonctions intercellulaires .....	32

1.5.3.7 Girdin et la polarité épithéliale .....	33
1.6 Polarité épithéliale et le cancer.....	34
1.6.1 Dérégulation de la polarité et TEM .....	34
1.6.2 Rôles des déterminants de la polarité dans le cancer .....	36
1.6.2.1 Les déterminants du domaine apical et la progression tumorale .....	36
1.6.2.2 Les déterminants du domaine basolatéral et la progression tumorale ..	38
1.6.3 Girdin et progression tumorale .....	40
1.7 Hypothèse et objectifs .....	42
<b>Chapitre 2 – Matériel et méthodes .....</b>	<b>43</b>
2.1 Immunobuvardage de type « Western Blot ».....	43
2.2 Immunoprécipitation .....	44
2.3 Essai phosphatase .....	45
2.4 Préparation de cuticule.....	46
2.5 Fixation de cellules S2, embryons et ovaires de drosophile .....	46
2.6 Immunofluorescence sur cellules S2, embryons et ovaires de drosophile .....	48
2.7 Microscopie, imagerie cellulaire et traitement des images .....	49
2.8 Génétique des drosophiles.....	49
2.9 Extraction d'ADNg de drosophiles .....	51
2.10 Anticorps .....	51
<b>Chapitre 3 – Exploration de la relation fonctionnelle entre <i>girdin</i> et les principaux déterminants du domaine basolatéral .....</b>	<b>52</b>
3.1 <i>girdin</i> et <i>lgl</i> .....	53
3.2 Girdin et Yrt.....	56
<b>Chapitre 4 – Précision des mécanismes par lesquels Girdin régule le domaine basolatéral .....</b>	<b>63</b>
4.1 Girdin et les JA : un rôle commun dans la polarité épithéliale? .....	64
4.2 Girdin et aPKC .....	66
4.3 Girdin et Crb.....	71
4.4 Girdin et Baz .....	74
<b>Chapitre 5 – Discussion et conclusion.....</b>	<b>76</b>
5.1 Discussion.....	76
5.1.1 Girdin et les déterminants basolatéraux .....	76
5.1.2 La polarité, Girdin et les JA .....	81
5.1.3 Girdin et les déterminants apicaux .....	82
5.2 Perspectives .....	86

5.3 Conclusion .....	90
<b>Bibliographie</b> .....	<b>xvi</b>

## Liste des figures

**Figure 1.1** : Cycle de vie de *Drosophila melanogaster* à 25 °C.

**Figure 1.2** : Les stades de l'embryogenèse de la drosophile.

**Figure 1.3** : Illustration du principe du système UAS-GAL4.

**Figure 1.4** : Les stades de l'embryogenèse chez la drosophile.

**Figure 1.5** : Principales composantes du complexe cadhérine-caténine.

**Figure 1.6** : Structure polarisée des cellules épithéliales.

**Figure 1.7** : Phénotype associé à la perte des déterminants apicaux aPKC ou Crb.

**Figure 1.8** : Phénotype associé à la perte du module basolatéral Scrib.

**Figure 1.9** : Dynamique de Yrt au cours de la différenciation épithéliale.

**Figure 1.10** : Antagonisme mutuel entre les régulateurs de la polarité épithéliale.

**Figure 1.11** : Structure des protéines de la famille Girdin chez l'humain et chez *D. melanogaster*.

**Figure 1.12** : Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

**Figure 3.1** : *girdin* présente un lien fonctionnel avec *lgl*.

**Figure 3.2** : *girdin* et *yrt* présentent un lien fonctionnel et agiraient dans la même voie.

**Figure 3.3** : Flag-Girdin et HA-Yrt colocalisent à la membrane dans les cellules S2.

**Figure 3.4** : Girdin se lie à Yrt ou ses partenaires.

**Figure 4.1** : Le rôle de *girdin* dans la régulation des fonctions de *lgl* serait en partie indépendant de son rôle dans la stabilisation des JA.

**Figure 4.2** : Gir régule négativement le niveau de phosphorylation de Yrt et Lgl ainsi que le niveau d'expression de Yrt.

**Figure 4.3** : *girdin* régule négativement les fonctions d'*aPKC*.

**Figure 4.4** : Gir interagit avec Crb pour le réguler négativement.

**Figure 4.5** : La surexpression de Girdin n'affecte pas la localisation de Crb ni l'activité d'aPKC dans l'épithélium folliculaire.

**Figure 4.6** : Interaction entre Girdin et Baz.

**Figure 5.1** : Modèle proposé de Girdin dans la polarité épithéliale.

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Liste des anticorps utilisés dans cette étude.

## Liste des abréviations et acronymes

**2D** : Deux dimensions  
**3D** : Trois dimensions  
 **$\alpha$ -Cat**: Alpha-Caténine  
 **$\beta$ -Cat** : Beta-Caténine  
 **$\beta$ -Tub** : Beta-Tubuline  
**AC** : Anticorps  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNg** : Acide désoxyribonucléique génomique  
**AJs** : *Adherens junctions*  
**AMP** : Adénosine monophosphate  
**AMPK** : *AMP-activated protein kinase*  
**AP-2** : *Adaptor protein 2*  
**APC** : *Adenomatous polyposis coli*  
**aPKC** : *Atypical protein kinase C*  
**Arf6** : *ADP-ribosylation factor 6*  
**Arm** : Armadillo  
**Baz** : Bazooka  
**BCA** : *BiCinchoninic acid Assay*  
**BioID** : Biotinylation de proximité  
**CBD** : domaine de liaison aux caténines (*catenin binding domain*)  
**B.D.S.C** : *Bloomington Drosophila Stock Center*  
**CCC**: Complexe cadhérine-caténine  
**Cdc42** : *Cell division cycle 42*  
**CDK5** : *Cyclin-dependent kinase 5*  
**CHC** : Carcinomes hépatocellulaires  
**CK1** : Caseine kinase 1  
**CLASP2** : Cytoplasmic linker associated protein 2  
**ConA** : *Concanavalin A from Canavalia ensiformis* (Jack bean)  
**Cora** : Coracle  
**Crb** : Crumbs  
**CREB** : C-AMP Response Element-binding protein  
**DaG4** : Daugtherless-GAL4  
**Daple** : *Dishevelled-associating protein with a high frequency of leucine residues*  
**DE-Cad** : *Drosophila melanogaster epithelial cadherin*  
**Dlg** : Discs Large  
**Dlg5** : Discs large homolog 5  
**Dsh** : Dishevelled (drosophile)  
**Dvl** : Dishevelled (mammifères)  
**E-Cad** : *Epithelial cadherin*  
**EDTA** : acide éthylène-diamine-tétraacétique acide édétique  
**EGF** : Facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)  
**EGFR** : Récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor receptor*)  
**EHM2** : *Expressed in highly metastatic cells 2*  
**EPB4.1L5** : *Erythrocyte protein band 4.1-like 5*

**ERK** : *Extracellular signal-regulated kinases*  
**ESCC** : Carcinomes des cellules squameuses de l'œsophage  
**DE-Cad** : *Drosophila epithelial cadherin*  
**enGAL4** : engrailed-GAL4  
**Fas3** : Fasciclin 3  
**FBS** : *Fetal bovine serum*  
**FDB** : FERM-domain binding site  
**FERM** : *Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin*  
**FLP** : Flippase  
**fMLPR**, Récepteur à formylmethionylleucylphenylalanine  
**FRT** : *Flippase recognition target*  
**Fz** : Frizzled  
**FZDR** : Récepteurs Frizzled  
**G $\alpha$ i** : *Inhibitory G protein alpha subunit*  
**G $\alpha$ s** : *Stimulatory G protein alpha subunit*  
**G $\beta\gamma$**  : Complexe G beta-gamma  
**GAP** : *GTPase-activating protein*  
**GBD** : Site de liaison aux protéines G (*G protein binding domain*)  
**GDI** : *Guanosine nucleotide dissociation inhibitor*  
**GEF** : *Guanine nucleotide exchange factors*  
**GFP** : *Green fluorescent protein*  
**Gipie** : *GRP78-interacting protein induced by endoplamic reticulum stress*  
**GLC** : *Germ line clone*  
**GPCR** : Récepteurs couplés aux protéines G (*G protein coupled receptor*)  
**GRP78** : 78-kDa glucose-regulated protein  
**GSK3 $\beta$**  : Glycogen synthase kinase 3 beta  
**Gir** : Girdin  
**HBS** : *HEPES- Buffered Saline*  
**HIF-1 $\alpha$**  : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*  
**HRP** : *Horseradish peroxidase*  
**HsFlp** : *Heat shock FLP*  
**IGF1R** : *Insulin-like growth factor 1 receptor*  
**IgG** : Immunoglobuline G  
**InsR** : Récepteur à l'insuline (*insulin receptor*)  
**IRE1 $\alpha$**  : *Endoplasmic reticulum stress sensor inositol-requiring protein 1*  
**IP** : Immunoprécipitation  
**JA** : Jonctions adhérentes  
**JNK** : c-Jun N-terminal kinase  
**JS** : Jonctions serrées  
**JSep** : Jonctions septées  
**Lgl** : Lethal giant larvae  
**LPAR** : *Lysophosphatidic acid receptor*  
**LRP-5-6** : Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 et 6  
**MAGUK** : guanylate kinase associée à la membrane (*membrane associated guanylate kinase*)  
**MAPK** : *Mitogen-activated protein kinases*

**MBD** : *Membrane binding domain*  
**MBH** : Motif basique et hydrophobe  
**MDCK** : *Madin–Darby canine kidney*  
**mTor** : *Mammalian target of rapamycin*  
**M/Z** : maternel/zygotique  
**NaF** : Sodium fluoride  
**NGS** : *Normal goat serum*  
**NMuMG** : *Normal murine mammary epithelial cells*  
**O/N** : Sur une nuit (*overnight*)  
**ON** : Ouverture numérique  
**PA** : *Punctum adherens*  
**Par3** : Partitioning-defective Protein 3  
**Par6** : Partitioning-defective Protein 6  
**PARD6A** : *partitioning defective 6 homolog alpha*  
**PARD6B** : *partitioning defective 6 homolog beta*  
**PARD6G** : *partitioning defective 6 homolog gamma*  
**Patj** : PALS1-associated tight junction protein  
**PCR** : Réaction polymérase en chaîne (*polymerase chain reaction*)  
**PCP** : Polarité cellulaire planaire  
**PDB** : *PDZ-domain binding site*  
**PDGFR** : *Platelet-derived growth factor receptor*  
**PDZ** : Postsynaptic density-95/Discs large/Zonula occludens1  
**PFA** : Paraformaldéhyde  
**PIP** : Phosphoinositides  
**PIP(4)P** : Phosphatidylinositol 4phosphate  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase  
**PKA** : Protéine kinase A  
**PMSF** : Phenylmethylsulfonyl fluoride  
**PP2A** : Protéine phosphatase 2A  
**Ppase** : Protéine phosphatase  
**RMS** : *Rostral migratory stream*  
**RNAi** : *RNA interference*  
**Rpm** : Rotations par minutes  
**RTK** : Récepteur tyrosine kinase  
**S2** : Schneider 2  
**Scrib** : Scribbled  
**Scutellarin** : 4',5,6-trihydroxyflavone-7-O-glucuronoside  
**SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel électrophorèse  
**Sdt** : Stardust  
**SH2** : Src Homology 2  
**SH3** : Src Homology 3  
**Shg** : Shotgun  
**shRNA** : *short hairpin RNA*  
**STAT** : *Signal Transduced and Activator of Transcription*  
**TAZ** : *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*  
**TGFβR** : *Transforming growth factor β receptors*  
**Tks5** : *Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains*



**VEGF** : Facteur de croissance vasculaire endothélial (*vascular endothelial growth factor*)

**Wg** : Wingless

**Wnt** : *Wingless-related integration site*

**WT** : De type sauvage

**YAP** : *Yes-associated protein*

**YMO1** : *Yurt/Mosaic eyes-like 1*

**Yrt** : Yurt

**ZEB1** : *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*

**Zw3** : *Zeste white 3*

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Patrick Laprise, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et soutenue tout au long de ma maîtrise. En effet, au cours des deux années et demie passées au sein de son laboratoire, il a su me pousser à persévérer et me motiver à surmonter les défis rencontrés lors de l'avancement de mon projet. J'ai pu, grâce à son encadrement et son enseignement, développer mon esprit critique, mes connaissances scientifiques et mon intérêt pour la recherche. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa patience, sa compréhension et sa confiance en mon projet même dans les moments les plus difficiles. Finalement, je le remercie de m'avoir donné l'occasion de participer à plusieurs congrès et journées scientifiques où j'ai pu développer mes aptitudes de communication à l'oral ainsi que découvrir différentes sphères de la science, un aspect non-négligeable de ma formation.

J'aimerais ensuite remercier mes collègues de laboratoire que j'ai côtoyé tout au long de cette aventure. Tout d'abord, merci à notre professionnelle de recherche Alexandra Jetté qui est arrivée en même temps que moi au laboratoire et qui a su répondre à mes multiples questions, m'apprendre plusieurs techniques et me donner des conseils judicieux. Un énorme merci à Clémence Gamblin pour son expertise, son aide irremplaçable et sa volonté d'aider les autres qui m'a permis de sauver plusieurs expériences! Merci au Dr Helori Gaudé, mon voisin de bench breton pour ses nombreux conseils, son soutien moral et son humour. Merci à Justine Woszczyk pour son aide et les petites attentions de tous les jours fort appréciées. Merci à tous les stagiaires qui ont séjourné dans notre équipe, et tout particulièrement Frédérique Parent-Prévost pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Je remercie Carl St-Pierre de l'Unité d'Imagerie Cellulaire, où j'ai passé d'innombrables heures depuis mon arrivée au centre de recherche, pour son soutien technique et les discussions à thèmes variés. Je tiens aussi à remercier les autres collègues du centre avec qui j'ai développé une amitié interculturelle enrichissante et épanouissante au cours des années. Je remercie particulièrement Alexandra Roux qui a été mon mentor lors de mon premier stage au centre de recherche, qui

a grandement contribué à me faire découvrir la beauté de la science et qui n'a jamais cessé de m'encourager dans tous les aspects de ma vie.

Pour terminer, je souhaite remercier les membres de ma famille pour leur patience et surtout mes parents pour leurs conseils scientifiques, leur compréhension et leurs encouragements appréciés. Je remercie mes amies de la boîte de céréales et particulièrement Mariline pour son aide dans mes expériences et pour avoir cru en moi. Finalement, je remercie tout spécialement Cornélia pour son aide précieuse autant sur le plan scientifique que personnel, son soutien inconditionnel, sa présence dans les bons et les mauvais moments et son humour irremplaçable.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 Présentation du modèle d'étude : *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster*, de son nom commun drosophile ou mouche à fruit, est un organisme largement étudié et possédant une génétique hautement malléable, ce qui en fait un modèle puissant pour la compréhension des mécanismes moléculaires liés aux maladies humaines. En effet, il a été estimé que plus de 75% des gènes associés aux maladies humaines ont des orthologues fonctionnels chez la drosophile (Reiter *et al.*, 2001). On retrouve beaucoup de similitudes entre les drosophiles et les vertébrés au niveau du développement puisque les mécanismes biologiques fondamentaux sont très bien conservés au cours de l'évolution (Johnston, 2002). D'autres aspects intéressants du modèle sont que le génome de *Drosophila melanogaster* a été entièrement séquencé depuis l'année 2000 (Adams *et al.*, 2000), qu'il existe souvent plusieurs gènes homologues ou paralogues chez l'humain par rapport à un seul orthologue chez la drosophile (ce qui élimine la redondance fonctionnelle) et qu'il s'agit d'un modèle peu coûteux à entretenir. De plus, beaucoup d'outils génétiques puissants ont été élaborés au fil du temps chez la drosophile (Johnston, 2002) et il existe d'énormes banques de lignées de drosophiles accessibles de partout dans le monde comme le *Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University* (B.D.S.C), le *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) ou le *Kyoto Stock Center* (DGGR) afin de favoriser les découvertes scientifiques avec la drosophile.

### 1.1.1 Le cycle de vie

La drosophile a un cycle de vie d'une durée de 10 à 12 jours à une température de 25 °C (28 jours à 18 °C) et est divisé en 4 stades principaux : embryonnaire,

larvaire, pupal et adulte. Le stade embryonnaire est sous-divisé en 17 stades (voir section 1.1.2), le stade larvaire est séparé en 3 stades se terminant tous par une mue et le stade de pupe dure environ 3 à 4 jours. La rapidité du cycle de vie de *Drosophila melanogaster* en comparaison aux modèles murins, qui prennent de 3 à 4 mois à produire une descendance, est un autre avantage considérable de ce modèle.

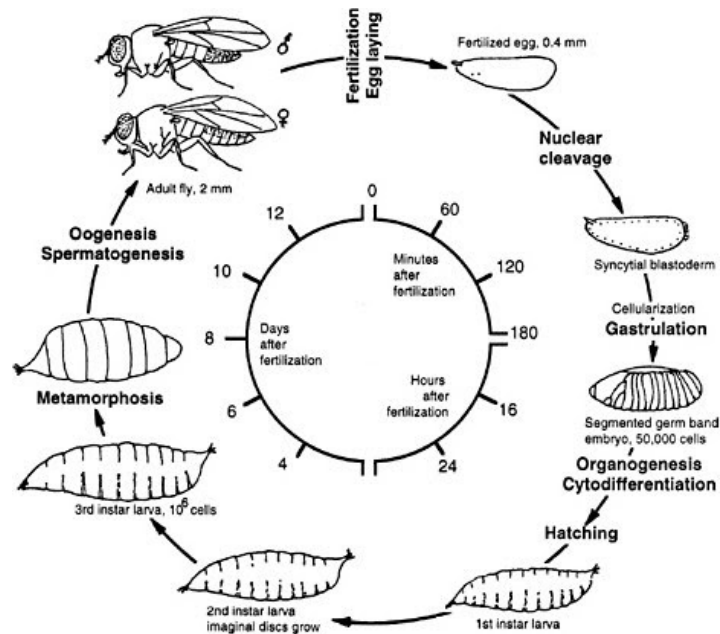


Figure 1.1: **Cycle de vie de *Drosophila melanogaster* à 25 °C.** Tout d’abord, l’oeuf est fertilisé et traverse les stades de l’embryogenèse pour éclore en larve environ 24h plus tard. La larve passe alors par les premier, deuxième et troisième stades larvaires qui se terminent tous par une mue. Durant le stade de pupe, la majorité des tissus larvaires sont détruits et remplacés par les tissus adultes dérivés des disques imaginaux qui se développaient dans la larve. *Image tirée de Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment (2000) p.162, adaptée de Wolpert et al. (1998)*

### 1.1.2 Embryogenèse

Au cours de ce projet de recherche, nous nous sommes concentrés sur l’étude du développement embryonnaire de la drosophile. L’embryogenèse s’étale sur

environ 21-24 heures à 25 °C et est divisée en 17 stades (figure 1.2 A). Comme chez la plupart des insectes, le développement de *D. melanogaster* débute avec une succession de divisions nucléaires dans un cytoplasme commun sans nouvelle membrane cellulaire (sans cytotdiérèse). Les premières divisions nucléaires sont coordonnées, faisant en sorte que les noyaux se divisent simultanément en un cycle. Chez la drosophile, il y a 13 cycles de divisions nucléaires qui s'effectue au cours des stades 1 à 4, débutant par une fusion pronucléaire (stade 1) et se terminant par la formation du blastoderme syncytial (stade 4). La cellularisation du blastoderme (stade 5) marque le début des divisions cellulaires asynchrones et se fait par l'invagination de la membrane plasmique de l'oocyte le long des sillons. Le blastoderme cellulaire est formé environ 3 heures après la fertilisation et est composé à cette étape de 6000 cellules longeant la périphérie du zygote (Hales *et al.*, 2015). La gastrulation (stades 6-7) sert à spécifier les 3 feuilletts embryonnaires de l'animal (mésoderme, endoderme et ectoderme) et est caractérisée par des décisions cellulaires et changements de forme qui amènent les cellules à se déplacer en groupes à différentes régions de l'embryon. Aux stades 8 à 10 se produit l'extension graduelle de la bande germinale, composée d'une couche interne mésodermique et externe ectodermique, le long du côté dorsal de l'embryon. Au stade 11, la bande germinale se divise en segments et l'invagination des fosses trachéales débute (Campos-Ortega et Hartenstein, 1985). À ce stade commence aussi la rétractation de la bande germinale qui se termine au stade 13, suivi de la fermeture dorsale de l'intestin moyen et de l'épiderme (stades 13-15). La fermeture dorsale est le processus d'élongation de l'ectoderme latéral de l'embryon le long de l'axe dorso-ventral jusqu'à ce que la surface dorsale de l'embryon soit couverte. Alors que la segmentation de l'épiderme se termine, l'involution de la tête commence (stade 15). Au stade 16, un dépôt de cuticule et des denticules avancés sont visibles, les organes du système gastrique et les organes sensoriels apparaissent et le patron musculaire somatique de la larve se distingue (Campos-Ortega et Hartenstein, 1985). Finalement, le stade 17 est caractérisé par la trachée qui se remplit d'air et par la complétion de l'organogenèse. Le stade 17 se termine par l'éclosion de l'embryon en premier stade larvaire.

Les œufs sont recouverts de deux enveloppes : une membrane vitelline homogène interne et un chorion externe plus solide et opaque. Le chorion est une structure complexe à deux couches qui permet de maximiser les échanges gazeux et de minimiser la perte d'eau (Tyler, 2000, p.8-14). Les embryons tardifs possèdent aussi une structure appelée crochet buccal qui servira lors des stades larvaires pour faciliter le transport de la nourriture à la bouche. On peut aisément observer les structures de l'embryon par préparation de cuticule (figure 1.2 B). La cuticule reflète l'intégrité des épithéliums car elle est sécrétée par l'épithélium sous-jacent.

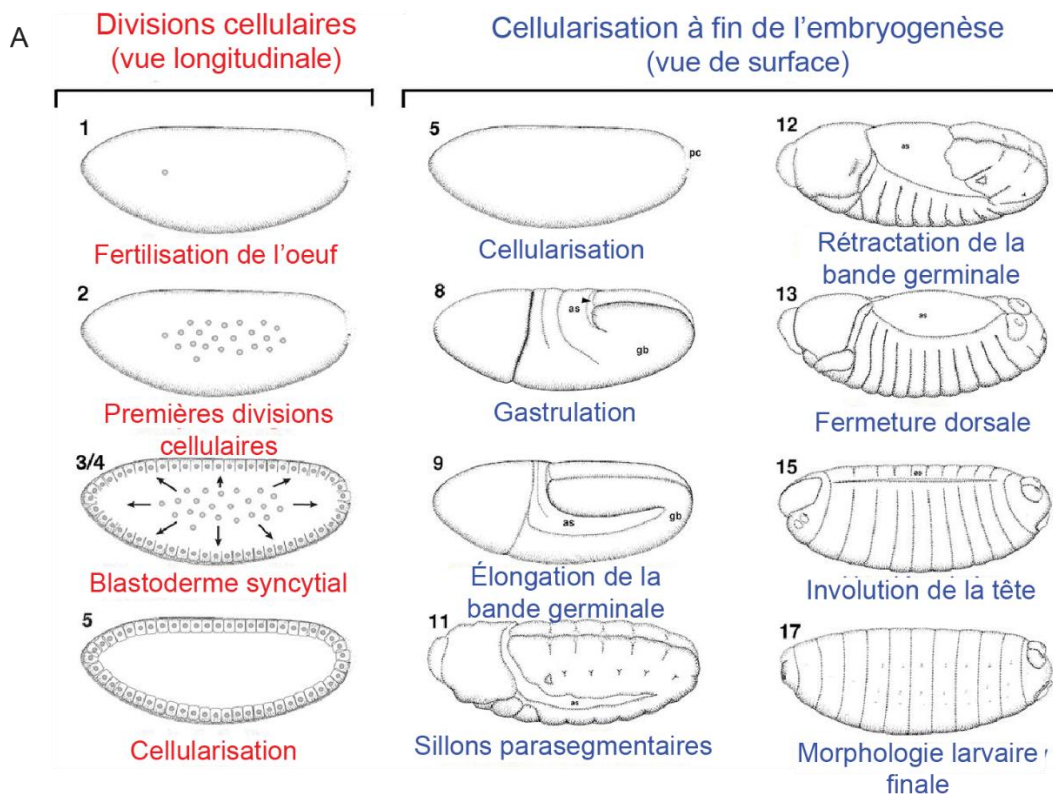


Figure 1.2: **Les stades de l'embryogenèse de la drosophile.** (A) Le développement embryonnaire débute avec un syncytium caractérisé par une série de divisions nucléaires sans cytotélière (stades 1 à 4) se terminant par une migration des noyaux à la périphérie. La cellularisation du blastoderme s'effectue au stade 5, suivi de la gastrulation (stade 6-8) qui détermine les 3 feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). Des mouvements morphogénétiques majeurs modifient le plan corporel de l'embryon alors que les cellules convergent pour permettre l'allongement du tissu sur l'axe antéro-postérieur (stade 8-10). Il y a ensuite rétractation du côté postérieur (rétractation de la bande germinale; stade 11) et les cellules de l'épiderme latéral migrent vers la ligne médiane dorsale (fermeture dorsale; stades 13-14). Les structures de la tête sont recouvertes par l'épiderme (involution de la tête; stade 15), puis la larve atteint finalement le stade (Stade 17) où elle peut éclore. (B) Préparation de cuticule montrant un embryon WT possédant les caractéristiques structurales d'un épithélium intègre. La flèche rouge pointe le crochet buccal et les flèches noires pointent les ceintures de denticules. *Image en (A) adaptée de (Hales et al., 2015) et de l'Atlas of Drosophila Development (Hartenstein 1993)*

### 1.1.3 Système UAS-GAL4

L'essentiel des travaux sur la drosophile se base sur un système développé en 1993 par Brand et Perrimon. Il permet de diriger l'expression génique en induisant l'activation sélective d'un transgène de manière tissu-spécifique. Le gène codant pour l'activateur transcriptionnel GAL4 de la levure est inséré de manière aléatoire dans le génome de la drosophile afin de permettre l'expression du GAL4 à partir d'un des divers activateurs génomiques. Un gène cible x est construit en clonant la séquence d'intérêt dans un plasmide contenant des séquences UAS dont l'activation dépend de la liaison de GAL4. Le gène cible est donc silencieux en absence de GAL4 et pour l'activer, les mouches portant la cible (UAS- gène x) dans leur génome sont croisées avec des mouches exprimant le GAL4 (figure 1.3) (Brand et Perrimon, 1993).



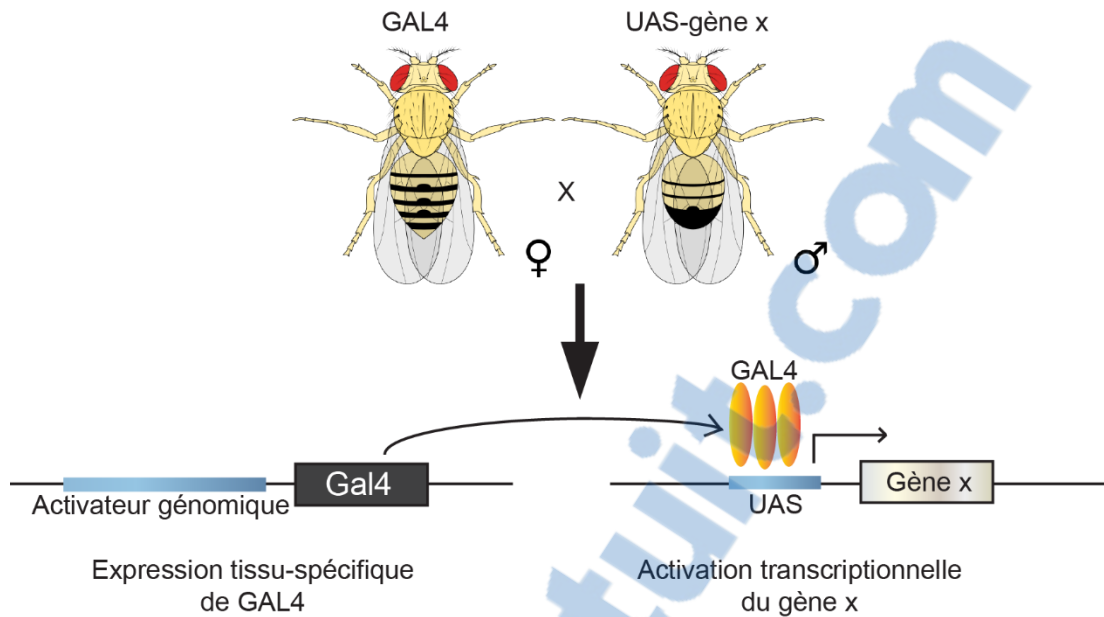


Figure 1.3: **Illustration du principe du système UAS-GAL4.** Des mouches exprimant le GAL4 sont croisées avec des mouches possédant un gène *x* contrôlé par une séquence UAS. Chez la descendance, l'activateur transcriptionnel GAL4, dont l'expression est contrôlée par un promoteur tissu-spécifique, pourra se lier à la séquence UAS et permettre l'activation du gène *x*. *Image adaptée de Brand et Perrimon, 1993.*

## 1.2 Les épithéliums

Les tissus épithéliaux, l'un des 4 types de tissus de base composant le corps humain, recouvrent les surfaces et les cavités internes de l'organisme. Leur propriété principale est leur capacité à s'organiser en feuillets, ce qui leur permet d'être modelés sous différentes formes et d'agir comme barrière de diffusion sélective et dynamique entre les compartiments du corps ainsi qu'entre l'environnement extérieur et l'espace interne de l'organisme. Les épithéliums, classés selon la forme et le nombre de couches cellulaires qui les composent (figure 1.4), sont cruciaux pour le transport vectoriel, la sécrétion orientée dans l'espace et la sous-division du corps en différents compartiments morphologiquement et physiologiquement distincts. Les tissus épithéliaux reposent sur une membrane basale qui agit comme échafaudage sur lequel l'épithélium peut croître, se régénérer

suite aux blessures et être plus résistant aux stress mécaniques (McConnell et Thomas, 2006, p.55). Puisque les tissus épithéliaux ne sont pas vascularisés, les nutriments doivent être acheminés par diffusion ou absorption à partir des tissus sous-jacents ou de la surface. La membrane basale agit comme membrane perméable sélective (Freshney et Freshney, 2004).

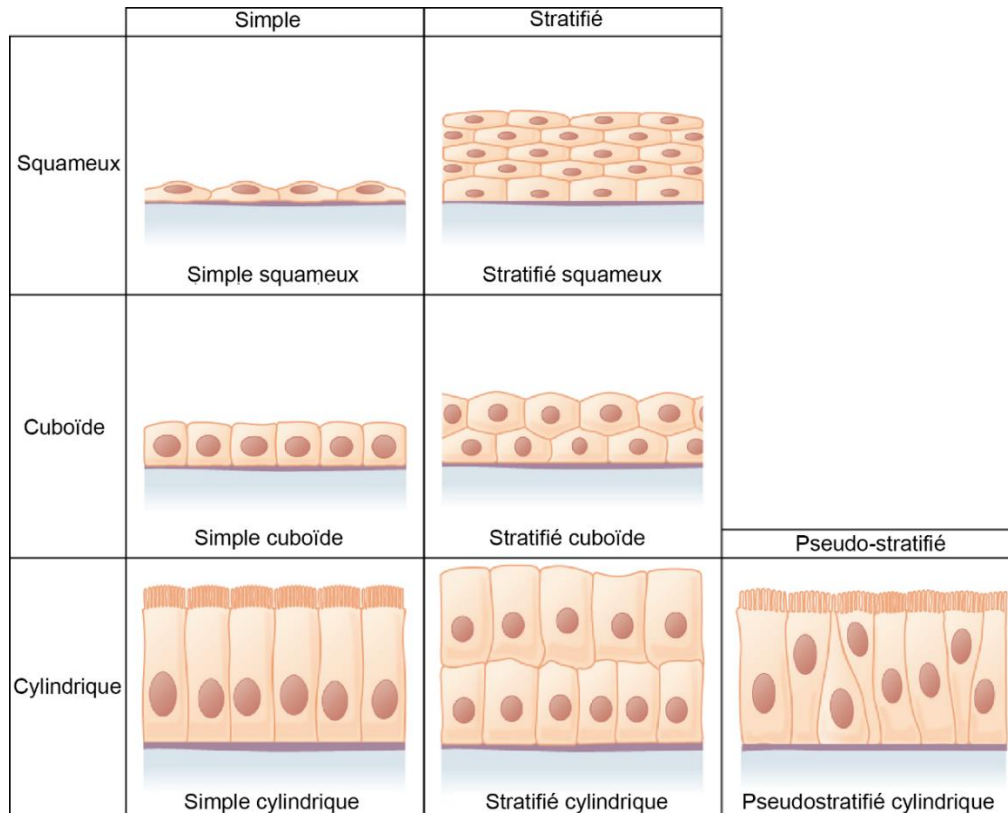


Figure 1.4: **Classification des tissus épithéliaux.** Schéma illustrant en vue latérale les différents types de tissus épithéliaux. Les tissus épithéliaux simples sont organisés en une seule couche de cellules alors que les épithéliums stratifiés sont composés de plusieurs couches cellulaires. Les tissus pseudostratifiés sont formés par une simple couche de cellules de formes irrégulières donnant l'apparence d'une multicouche. La classification varie aussi en fonction de la morphologie des cellules, qui sont soit squameuses, cuboïdes ou cylindriques. *Image tirée et traduite de OpenStax, Anatomy & Physiology, 2016.*

## 1.3 Les jonctions intercellulaires

La structure des tissus épithéliaux est générée et maintenue par des forces d'adhésion entre les cellules médiées par les complexes jonctionnels. Le complexe jonctionnel des cellules épithéliales des vertébrés comprend différentes structures dont les jonctions serrées (JS) ou *zonula occludens* (ZO) ainsi que les jonctions adhérentes (JA) qui incluent les *zonula adherens* (ZA) (Franke, 2009). Ces structures jonctionnelles sont conservées chez la drosophile, mais ce sont les jonctions septées (JSep) qui jouent le rôle fonctionnel des JS. Les JS et la ZA forment une ceinture autour de l'apex des cellules, leur permettant de se relier en un feuillet continu (Tepass, 2012). Plus précisément, les JS, situées en position apicale par rapport à la ZA (ou en position basale par rapport à la ZA pour les JSep chez la drosophile), scellent l'espace intercellulaire pour contrôler la diffusion d'ions ou de molécules à travers le feuillet épithélial. La ZA sépare la membrane apicale de la membrane basolatérale et forment des complexes d'adhésion cellule-cellule cruciaux pour l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus (Harris et Tepass, 2010). En effet, la ZA s'associe aux faisceaux de filaments d'actine parallèles à la membrane plasmique (Hull et Staehelin, 1979) et la contraction de ces faisceaux d'actine par interaction avec la myosine II mène à la constriction apicale typiquement observée lors de la morphogenèse épithéliale durant le développement (Yonemura, 2011). C'est au cours de la cellularisation de l'épithélium du blastoderme que les ZA commencent à s'assembler sous forme de « spots » ou *punctum adherens* (PA) (Tepass et Hartenstein, 1994). Les PA sont retrouvés aux stades de développement précoces des jonctions et sont transformés en ZA dans les cellules épithéliales hautement polarisées (Yonemura *et al.*, 1995).

Un complexe protéique faisant partie intégrale des JA est le groupe Nectines/Echinoid. Les Nectines modulent l'adhésion cellule-cellule et facilitent l'établissement de la polarité apico-basale en liant la région cytoplasmique d' Afadine, une protéine de liaison à l'actine qui ancre les Nectines au cytosquelette d'actine (Campbell *et al.*, 2017). Cette interaction Nectine-Afadine est essentielle

pour la maturation des JA car sa perte retarde la localisation de la cadhérine aux jonctions cellule-cellule et affaiblit les JA (Sato *et al.*, 2006). Les cadhérines sont des récepteurs d'adhésion homophiles et transmembranaires. Dans les cellules épithéliales, la E-Cadhérine (E-Cad; DE-cadhérine chez la drosophile) est une composante centrale et essentielle de la ZA (Takeichi, 1991). Comme toutes les cadhérines, E-Cad possède des répétitions de cadhérine conservées au niveau du domaine extracellulaire avec des sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  qui stabilisent la structure d'E-Cad. Ces sites modulent les interactions homotypiques avec les autres molécules de cadhérine exprimées à la surface des cellules voisines (engagement en *trans*) (Coopman et Djiane, 2016). Les E-Cad peuvent aussi interagir en *cis* avec d'autres molécules d'E-Cad via leur domaine cadhérine extracellulaire. Puisque leur liaison est faible, il y a multimérisation des E-Cad pour renforcer l'adhésion cellule-cellule. Chez la drosophile, le gène *shotgun* (*shg*) encode la DE-Cad (Tepass *et al.*, 1996). Les E-Cadhérines possèdent une queue cytoplasmique hautement conservée qui interagit avec un groupe défini de protéines cytoplasmiques nommées caténines via son domaine carboxy-terminal de liaison aux caténines (CBD) (Van Roy et Berx, 2008). Les E-Cadhérines peuvent donc se lier indirectement aux microfilaments d'actine et au cytosquelette de microtubules via leur liaison à des protéines adaptatrices cytoplasmiques dont les principales sont la caténine p120 et la  $\beta$ -Caténine [ $\beta$ -Cat; Armadillo (Arm) chez la drosophile] (Van Roy et Berx, 2008; Desai *et al.*, 2013). La p120 caténine contribue à la stabilisation d'E-Cad en inhibant son endocytose et en favorisant sa liaison aux microtubules (Davis *et al.*, 2003; Shahbazi *et al.*, 2013). Toutefois, la fonction de p120-caténine est dispensable chez *Drosophila melanogaster*, suggérant que p120 n'est pas un composant essentiel des ZA comme les cadhérines et les autres caténines (Myster *et al.*, 2003). La  $\beta$ -Cat, elle, se lie à l' $\alpha$ -Caténine ( $\alpha$ -Cat) pour former le complexe cadhérine-caténine (CCC), l'unité fonctionnelle centrale des ZA (figure 1.5), et réorganiser le cytosquelette d'actine en régulant la machinerie de l'acto-myosine (Perez-Moreno et Fuchs, 2006; Bertocchi *et al.*, 2017). L' $\alpha$ -Cat peut lier à la fois la  $\beta$ -Cat et les filaments d'actine lorsque les cellules sont sous tension (Buckley *et al.*, 2014), mais il reste à déterminer si la réorganisation de l'actine est due à la liaison

directe de l' $\alpha$ -Cat aux filaments d'actine, à l'activation d' $\alpha$ -Cat par la tension et/ou via d'autres partenaires de la  $\beta$ -Cat pouvant se lier à l'actine (Kourtidis *et al.*, 2017).

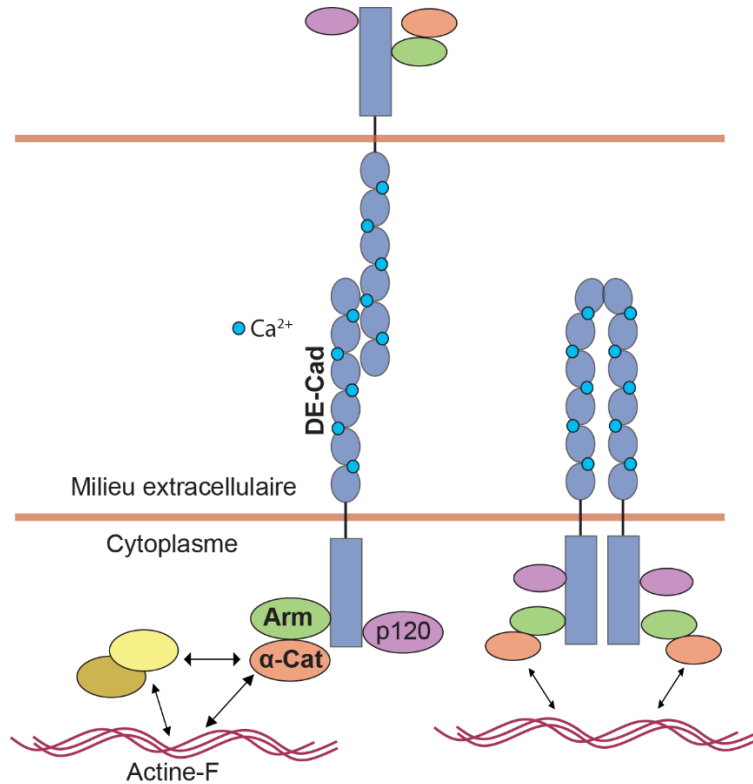


Figure 1.5: **Principales composantes du complexe cadhérine-caténine.** Schéma simplifié résumant la dynamique du complexe cadhérine-caténine chez *Drosophila melanogaster*. La glycoprotéine transmembranaire DE-Cadhérine possède des domaines cadhérines conservés au niveau du domaine extracellulaire et des sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ , qui stabilise la structure de la DE-Cad. Via leur domaine extracellulaire, les DE-Cad sont capables d'interagir en *trans* et en *cis* avec d'autres molécules de cadhérine. E-Cad possède aussi une queue intracellulaire à laquelle se lient les caténines p120 et Arm ( $\beta$ -Caténine chez les mammifères). Le lien entre DE-Cad et le cytosquelette d'actine est médié principalement par Arm via son association à  $\alpha$ -Cat qui se lie directement à l'actine-F ou qui recrute d'autres protéines de liaison à l'actine. La caténine p120 contribue à la stabilisation de la DE-Cad, mais est dispensable chez la drosophile.

## 1.4 La polarité apicobasale

Pour que les cellules épithéliales puissent s'organiser en feuillets et effectuer leur fonction de transport actif bidirectionnel, leurs constituants cellulaires doivent être distribués de manière asymétrique le long d'un axe apico-basal. Cette organisation structurale, appelée la polarité épithéliale, résulte de la régionalisation de la membrane plasmique en domaines apical, latéral et basal. Le domaine apical fait face à l'environnement extérieur ou à un lumen alors que le domaine latéral s'étend le long du plan de l'épithélium et est en contact avec les cellules voisines. Le domaine basal est liée à la membrane basale, une structure formée de glycoprotéines et de collagène (figure 1.6) (OpenStax, 2016).

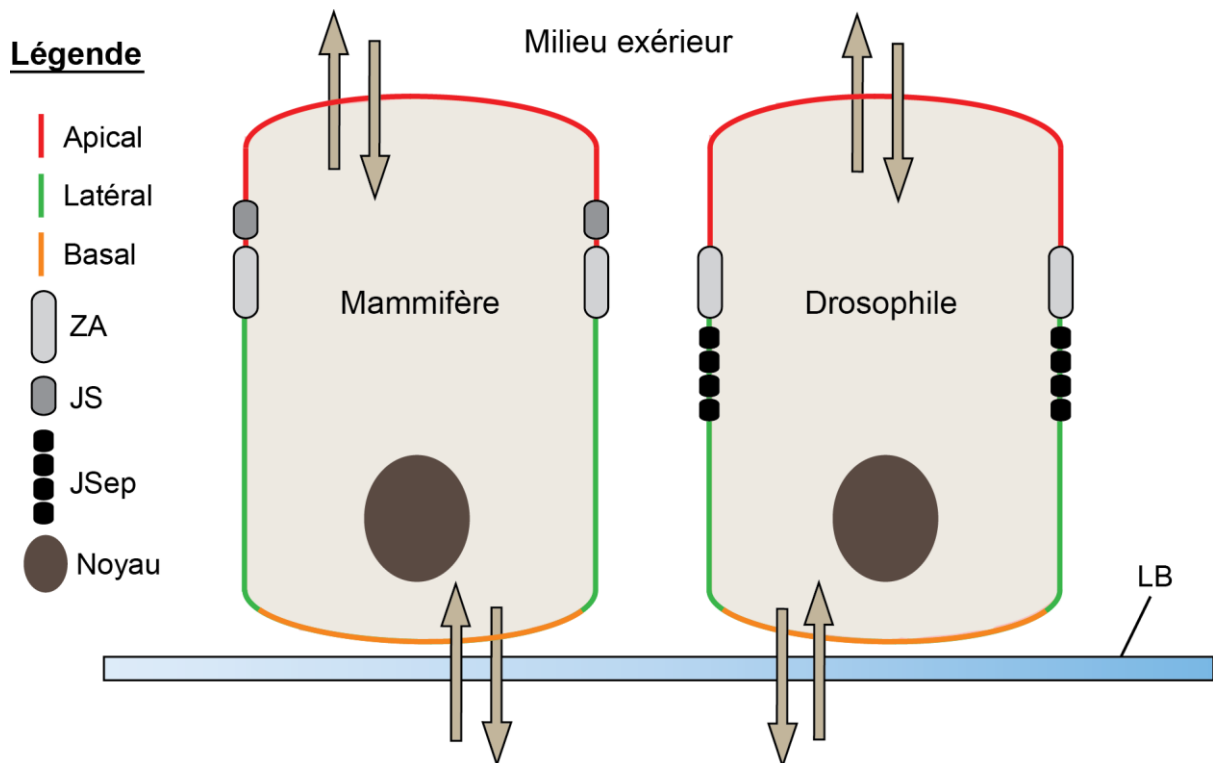


Figure 1.6: **Structure polarisée des cellules épithéliales.** Schéma montrant les différents domaines membranaires et complexes jonctionnels d'une cellule épithéliale chez les mammifères et chez la drosophile. Les cellules épithéliales sont polarisées le long de l'axe apico-basal, permettant ainsi le transport uni- et bidirectionnel de molécules entre les cellules et leur environnement. Le domaine apical fait face au milieu extérieur ou au lumen, le domaine latéral est en contact avec les cellules adjacentes et le domaine basal est attaché à la lame basale. La *zonula adherens* (ZA), une jonction adhérente associée à un anneau d'actine cortical, permet aux cellules d'adhérer entre elles et de former des feuilletts épithéliaux continus. Les jonctions serrées (JS) chez les mammifères et les jonctions septées (JSep) chez la drosophile empêchent la diffusion paracellulaire. Abréviations: JS: jonctions serrées, JSep: jonctions septées, LB: lame basale, ZA: zonula adherens. *Image adaptée de Laprise, 2011.*

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses protéines impliquées dans la polarité épithéliale ont été identifiées par criblages génétiques dans des organismes modèles comme *C. elegans* et *Drosophila melanogaster* (Laprise et Tepass, 2011). La plupart de ces protéines de polarité sont conservées à travers l'évolution, des espèces les plus primitives comme l'éponge aux plus complexes comme l'humain, reflétant ainsi l'importance de la polarité épithéliale au sein des organismes vivants (Tepass, 2012). L'épithélium embryonnaire, les disques imaginaux larvaires et l'épithélium folliculaire ovarien sont des tissus simples non-différenciés fréquemment utilisés pour analyser les protéines de la polarité chez la drosophile. Ces dernières sont organisées en différents modules fonctionnels, associés à des domaines membranaires distincts. Le domaine apical contient la protéine kinase atypique PKC ( $\alpha$ PKC), son unité régulatrice Partitioning-defective Protein 6 (Par6), la petite GTPase Cdc42 et la protéine d'échafaudage Bazooka (Baz; Par3 chez les mammifères) qui sont souvent regroupées en un module nommé le module Par (*partition defective*), car ces protéines fonctionnent ensemble (Laprise et Tepass, 2011). Toutefois, Baz peut aussi agir indépendamment de ces protéines dans la polarité épithéliale. Un deuxième module apical est le module Crumbs (Crb) qui comprend les protéines Crb, Stardust (Sdt; PALS1 chez les mammifères) et Patj (Tepass, 2012). Les régulateurs du domaine basolatéral sont le groupe Scrib, composé des protéines Lethal giant larvae (Lgl), Discs large (Dlg) et Scribbled

(Scrib) (Bilder *et al.*, 2000) ainsi que le groupe Yurt (Yrt)/Coracle (Cora) composé de Yrt, Cora, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase et Neurexin IV (Nrx-IV) (Laprise *et al.*, 2009). De plus, la kinase Par1 agit avec 14-3-3 à la membrane basolatérale pour supporter la polarité épithéliale (Benton et St Johnston, 2003).

## 1.4.1 Le domaine apical

### 1.4.1.1 Le module Par

Chez la drosophile, le module Par est composé des protéines aPKC/Baz/Par6/Cdc42, et ce complexe ainsi que ses fonctions dans la polarité épithéliale sont conservés chez les mammifères (Suzuki *et al.*, 2001; Rosse *et al.*, 2010). La famille des PKC, qui sont des protéines sérine/thréonine (S/T) kinases, peut être divisée en trois sous-familles dont celle des aPKC, qui sont dites atypiques en raison de leur voie d'activation différente des autres sous-familles de PKC (Liu et Heckman, 1998). aPKC contient 3 isoformes chez les mammifères, nommées PKC  $\iota/\lambda$  (iota/lambda) et  $\zeta$  (zeta), qui partagent plus de 73% d'identité de séquence entre eux (Selbie *et al.*, 1993; Liu et Heckman, 1998). Dans le contexte des cellules épithéliales, aPKC est une kinase apicale jouant un rôle indispensable dans la régulation de la polarité (Tabuse *et al.*, 1998; Goldstein et Macara, 2007; Morais-De-Sá, Mirouse et Johnston, 2010). En effet, sa perte chez la drosophile entraîne une létalité embryonnaire associée à des défauts de polarité comme le montre le phénotype d'affaiblissement du domaine apical au détriment du domaine basolatéral se traduisant par la formation de grains de cuticule (figure 1.7) (Wodarz *et al.*, 2000; Rolls *et al.*, 2003). aPKC est connue pour phosphoryler plusieurs protéines contribuant à la polarité, et la majorité de ces cibles de phosphorylation sont conservées de la mouche à l'humain. Parmi ces cibles conservées, on compte Baz/Par3 (Nagai-Tamai *et al.*, 2002), Crb (Sotillos *et al.*, 2004), ainsi que les protéines basolatérales Lgl (Betschinger *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Yamanaka



*et al.*, 2003), Yrt (Gamblin *et al.*, 2014) et Par1 (Hurov *et al.*, 2004), qui seront discutée plus loin. De plus, aPKC, avec Cdc42 et Par6, contrôle la polarité épithéliale et l'intégrité des JA en régulant les cytosquelettes d'actine et de microtubules ainsi que le trafic vésiculaire (Harris et Peifer, 2007; Georgiou *et al.*, 2008; Harris et Tepass, 2008; Leibfried *et al.*, 2008).

La famille des gènes Par6 chez les mammifères comporte trois membres, soit *partitioning defective 6 homolog alpha* (PARD6A), *beta* (PARD6B) et *gamma* (PARD6G) (Joberty *et al.*, 2000), chacun exprimé de manière tissu spécifique (Noda *et al.*, 2001). Chez la drosophile, il n'existe qu'un homologue de la protéine adaptatrice Par6 qui agit en tant que sous-unité d'aPKC en régulant l'activité kinase d'aPKC et en contrôlant sa localisation. Le recrutement apical et la fonction de Par6 dépend de son interaction avec la GTPase Cdc42 active (chargée en GTP), mais la manière dont Cdc42 est recrutée à la membrane apicale n'a pas encore été élucidée (Tepass, 2012).

La protéine d'échafaudage Baz comprend un seul orthologue chez la drosophile alors qu'il en existe 2 chez les mammifères : Par3 $\alpha$  et Par3 $\beta$  (Assémat *et al.*, 2008). Par3 $\alpha$  a été originalement découvert comme partenaire de liaison à aPKC (Izumi *et al.*, 1998), alors que Par3 $\beta$  est incapable de se lier à Par6 ou aPKC, mais est tout de même localisé aux JS (Kohjima *et al.*, 2002). Ceci suggère que les deux homologues auraient des fonctions légèrement différentes. Le rôle de Baz varie spatialement et temporellement au cours du développement, selon sa localisation et ses interacteurs. Ses partenaires de liaison incluent la protéine des JA Arm (Wei *et al.*, 2005), ainsi que Par6 (Lin *et al.*, 2000), qui se lient tous au domaine PDZ (postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens1) central de Baz. De plus, Baz interagit avec Sdt (Krahn *et al.*, 2010b), aPKC (Nagai-Tamai *et al.*, 2002), Par1 (Benton et St Johnston, 2003b), les phosphoinositols membranaires (Krahn *et al.*, 2010a) et les protéines 14-3-3 (Benton et St Johnston, 2003b) dont le rôle sera discuté dans la section 1.4.3. Baz joue un rôle crucial dans l'établissement du domaine apical des cellules épithéliales via des interactions transitoires avec aPKC et Par6 lors des stades initiaux de la polarisation (Tabuse *et al.*, 1998). Ainsi, au

cours de la cellularisation, Par6 et aPKC se lient à Bazooka (Baz) pour former le module Par (Tepass, 2012). Ces interactions sont requises pour le recrutement initial de Par6/aPKC à la membrane apicale (Harris et Peifer, 2005; Horikoshi *et al.*, 2009), et doivent être dissociées pour le positionnement de Baz aux JA et d'aPKC/Par6 à la membrane apicale (Harris et Peifer, 2005; Horikoshi *et al.*, 2009; McCaffrey et Macara, 2009; Morais-De-Sá, Mirouse et Johnston, 2010; Walther et Pichaud, 2010). La dissociation de l'interaction aPKC-Baz s'effectue via la phosphorylation de Baz par aPKC, ce qui permet à Baz de se positionner aux JA, alors que l'interaction Baz-Par6 est dissociée par la liaison de Par6 à Crb, ce qui contribue au maintien apical d'aPKC/Par6 (Morais-De-Sá *et al.*, 2010; Walther et Pichaud, 2010). La phosphorylation de Baz par aPKC est aussi cruciale pour défaire l'interaction Baz-Sdt, et permettre la formation du complexe Crb-Sdt (voir section 1.4.1.2) (Krahn *et al.*, 2010b; Morais-De-Sá *et al.*, 2010). Baz, quoiqu'indispensable à l'établissement de la polarité épithéliale via ses interactions avec Par6 et aPKC, possède aussi des fonctions indépendantes du module Par critiques pour la polarisation des cellules (Harris and Peifer, 2004, 2005; Simões *et al.*, 2010). En effet, Baz agit comme repère pour la détermination du site de formation des JA (Harris et Peifer, 2004, 2005; Franz et Riechmann, 2010), et le contrôle de sa distribution subcellulaire est cruciale pour la ségrégation des composantes des JA de la membrane apicale (Krahn *et al.*, 2010a; Morais-De-Sá *et al.*, 2010). Baz reste enrichie aux JA au cours de l'embryogenèse alors que Par6 et aPKC s'accumulent au domaine apical avec Crb (Tepass, 2012). Baz peut ainsi recruter les complexes cadhérine-caténine (CCC) impliqués dans la formation des JA (McGill *et al.*, 2009), un événement régulé notamment par la p120-caténine qui facilite l'endocytose et le recyclage du complexe E-Cad-Baz (Bulgakova and Brown, 2016).

#### **1.4.1.2 Le module Crb**

Le module Crb, composé de Crb, PALS1/Sdt et PATJ/Patj, joue un rôle clé dans l'architecture des cellules épithéliales en promouvant la formation de la membrane apicale et est conservé de la drosophile à l'humain, comme la majorité des

déterminants de la polarité (Assémat *et al.*, 2008). Crb est la seule protéine transmembranaire parmi les déterminants apicaux de la polarité épithéliale et, chez la drosophile, est exprimée dans la plupart des épithéliums (Tepass *et al.*, 1990). Chez l'humain, le génome code pour trois orthologues de Crb nommés Crumbs homolog-1 (CRB1), Crumbs homolog-2 (CRB2) et Crumbs homolog-3 (CRB3). CRB1 est localisé dans l'épithélium pigmenté de la rétine de l'oeil et des mutations dans son gène ont été reliées à des dystrophies rétiniennes (den Hollander *et al.*, 2004), tout comme Crb de drosophile est impliqué dans la morphogenèse des photorécepteurs de l'oeil (Pellikka *et al.*, 2002; Chartier *et al.*, 2012). CRB2 est exprimée dans plusieurs organes et est important pour l'embryogenèse (van den Hurk *et al.*, 2005). Finalement, le gène *Crb3* est exprimé dans la majorité des tissus épithéliaux mammifères (Makarova *et al.*, 2003) et CRB3 est typiquement localisée au niveau apical et aux JS pour favoriser la formation des jonctions intercellulaires ainsi que la polarité épithéliale (Laprise, 2011). Chez la drosophile, Crb est cruciale pour la polarisation de l'ectoderme, qui est formée après la gastrulation, comme le montrent des défauts de cuticule dans les mutants *crb* (figure 1.7) (Tepass *et al.*, 1990). La perte de Crb génère une perte de l'identité de la membrane apicale (Wodarz *et al.*, 1993) alors qu'à l'inverse, sa surexpression entraîne une augmentation de la taille de la membrane apicale au dépend de la membrane basolatérale (Wodarz *et al.*, 1995). De plus, Crb est requise pour la formation et la régulation de la ZA (Tepass, 1996).

Les domaines intracellulaires de toutes les protéines humaines CRB et Crb de drosophile sont conservés et contiennent un domaine de liaison aux protéines FERM (Four point one protein, Ezrin, Radixin, Moesin) nommé *FERM-domain binding site* (FDB), leur permettant de lier notamment Yrt et ses orthologues mammifères *Yurt/Mosaic eyes-like 1* (YMO1) et *Expressed in highly metastatic cells 2* (EHM2), ainsi qu'un domaine de liaison au domaine PDZ (*PDZ-domain binding site* ;PDB) pouvant lier PAR6/Par6 et PALS1/Sdt. De plus, Crb est phosphorylée par aPKC chez la drosophile, ce qui semble contribuer à l'activité de Crb (Sotillos *et al.*, 2004). Toutefois, l'effet de cette phosphorylation serait dispensable pour le développement des embryons, puisqu'il a été montré que des mouches possédant un domaine

intracellulaire de Crb non-phosphorylable par aPKC sont viables homozygotes et d'apparence normale (Cao *et al.*, 2017). Le site PDB de Crb est crucial pour la détermination de l'identité de la membrane apicale et la maintenance de la polarité apico-basale, alors que le site FDB semble plutôt lié à l'intégrité des JA (Klebes et Knust, 2000; Izaddoost *et al.*, 2002), à la régulation de l'abondance de Crb aux surfaces (Laprise *et al.*, 2006) et à la régulation de la croissance des tissus (Chen *et al.*, 2010; Grzeschik *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010b; Robinson *et al.*, 2010).

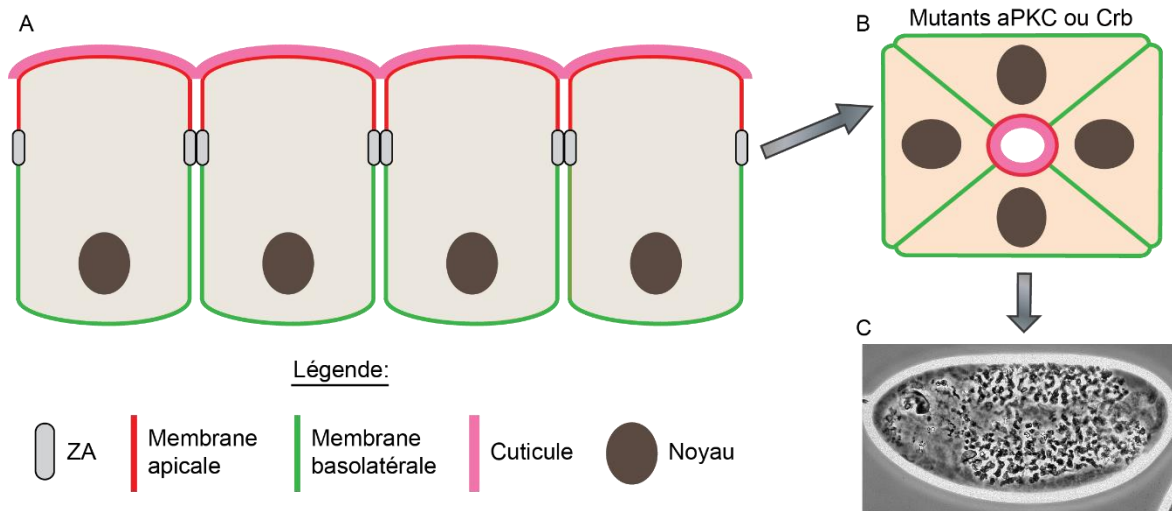


Figure 1.7: **Phénotype associé à la perte des déterminants apicaux aPKC ou Crb.** (A) Représentation de 4 cellules épithéliales organisées en un feuillet, reliées par leur ZA et sécrétant de la cuticule via leur membrane apicale. (B) Schéma illustrant l'effet de la perte d'aPKC ou de Crb sur ces 4 cellules épithéliales. Le domaine apical est atrophié, forçant ainsi les cellules à s'organiser en rosettes. Une importante vague d'apoptose a aussi lieu dans ces embryons. De ce fait, le tissu est composé de rosettes isolées. (C) Préparation de cuticule représentant le phénotype classique des embryons dépourvus d'aPKC ou de Crb, c'est-à-dire une perte de l'intégrité épithéliale où la cuticule sécrétée par la membrane apicale ne forme plus que des grains ectopiques de cuticule. Ceci met en évidence le rôle essentiel d'aPKC et de Crb dans le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux.

PALS1/Sdt et, de manière moins importante, PATJ/Patj, jouent des rôles cruciaux en tant qu'effecteurs et/ou régulateurs en aval de CRB3/Crb. En effet, la liaison de Sdt à Crb permet de stabiliser Crb à la membrane apicale (Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2002). De plus, Sdt peut interagir avec Patj et Par6, et ainsi relier le complexe Crb-Sdt-Patj au complexe Par6/aPKC (Tepass,

2012). Toutefois, les domaines de liaison de Sdt à Par6 ne sont pas cruciaux pour la polarité épithéliale (Koch *et al.*, 2016). Il a d'ailleurs été montré chez les mammifères que la liaison de PALS1 à CRB semble être d'une affinité nettement plus élevée que celle de PAR6 à CRB (Whitney *et al.*, 2016). Chez la drosophile, les mutants de perte de fonction pour *sdt* phénocopient la perte de Crb. De plus, il a été démontré que Sdt se lie à Baz au niveau des JA, et que cette interaction est affaiblie par la phosphorylation de Baz par aPKC, ce qui permet à Sdt de se dissocier de Baz pour aller lier Crb (Krahn *et al.*, 2010b).

PATJ peut connecter le complexe CRB3 aux protéines des jonctions serrées et contrôle la délivrance de CRB3 au domaine apical (Adachi *et al.*, 2009). Chez la drosophile, Patj joue un rôle dans la stabilisation du complexe Crb à la membrane apicale (Laprise, 2011). Plus précisément, Patj est recrutée par Sdt à la région subapicale pour supporter le complexe Crb-Sdt dans la formation des JA et la morphogénèse (Roh *et al.*, 2002; Tepass, 2012). La caractérisation de la mutation nulle de *patj* chez la drosophile indique que Patj joue un rôle mineur dans la polarisation de l'épithélium et dans la stabilisation de Crb à la surface des cellules (Zhou and Hong, 2012).

## 1.4.2 Le domaine basolatéral

### 1.4.2.1 Le module Scrib

Lgl, Dlg et Scrib sont des suppresseurs de tumeurs associés à la membrane latérale et conservés au cours de l'évolution qui agissent dans une voie commune pour réguler la structure épithéliale et la prolifération cellulaire (Bilder *et al.*, 2000; Elsum *et al.*, 2012). Il existe un seul homologue humain pour Scrib, cinq pour Dlg (Dlg1-5) et deux pour Lgl (Lgl1 et Lgl2) (Elsum *et al.*, 2012). Chez *Drosophila melanogaster*, le module Scrib agit au début de l'embryogenèse pour empêcher l'expansion des déterminants apicaux à la membrane latérale et pour favoriser la formation de la ZA (Bilder et Perrimon, 2000; Bilder *et al.*, 2000). Des analyses génétiques ont révélées que l'activité des trois gènes *scrib*, *dlg* et *lgl* est requise pour

la localisation adéquate de Lgl au cortex et de Scrib et Dlg aux jonctions septées (Bilder *et al.*, 2000). D'ailleurs, la perte de Scrib, Lgl ou Dlg chez la drosophile entraîne un effet identique sur l'épithélium, c'est-à-dire un affaiblissement du domaine latéral et une surcroissance du domaine apical (figure 1.8) (Bilder *et al.*, 2000). Concordant avec ces observations, il a été montré que l'inhibition mutuelle entre aPKC apicale et Lgl basolatérale est cruciale pour le maintien de la polarité (Hutterer *et al.*, 2004; Chalmers *et al.*, 2005). En effet, Lgl, chez la drosophile comme chez les mammifères, est phosphorylée par aPKC sur trois résidus sérines conservés, ce qui l'empêche de s'accumuler à la membrane apicale et la restreint au domaine basolatéral (Betschinger *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003). Plus précisément, Lgl fait compétition à Par3 chez les mammifères pour la formation d'un complexe avec Par6/aPKC. Durant la polarisation cellulaire, Lgl est initialement localisée avec Par6/aPKC à la région des contacts cellule-cellule, puis Lgl est phosphorylée par aPKC et ségréguée de Par6/aPKC apical à la membrane basolatérale, ce qui permet à Par3 de s'associer à Par6/aPKC (Yamanaka *et al.*, 2003). De plus, des expériences *in vitro* ont montré que la phosphorylation d'au moins un des 3 résidus sérines conservés dans l'homologue mammifère Lgl2 résulte en sa liaison à Dlg4 (Zhu *et al.*, 2014), démontrant pour la première fois que Lgl et Dlg peuvent interagir physiquement et directement ensemble. Toutefois, la signification de ces interactions reste à être évaluée *in vivo*. Par opposition à son exclusion apicale, Lgl et son complexe limitent aPKC et Crb au domaine apical et les excluent du domaine basolatéral (Bilder et Perrimon, 2000; Tanentzapf et Tepass, 2003; Chalmers *et al.*, 2005), maintenant ainsi l'équilibre apico-basal.

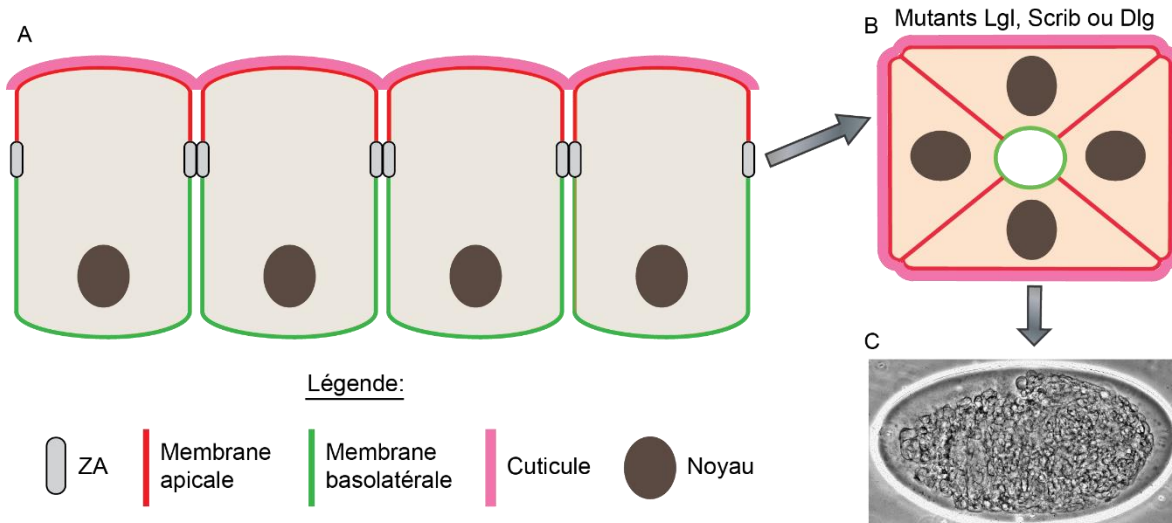


Figure 1.8: **Phénotype associé à la perte du module basolatéral Scrib.** (A) Représentation de 4 cellules épithéliales organisées en un feuillet, reliées par leur ZA et sécrétant de la cuticule via le domaine apical. (B) Schéma illustrant l'effet de la perte de Lgl, Scrib ou Dlg sur ces 4 cellules épithéliales. À l'inverse de la perte d'aPKC ou de Crb, on observe une surcroissance du domaine apical. (C) Préparation de cuticule représentant le phénotype d'une perte de Lgl, Scrib ou Dlg sur les embryons, c'est-à-dire une perte de l'intégrité épithéliale où la cuticule sécrétée par la membrane apicale forme des circonvolutions de cuticule. Ceci met en évidence le rôle essentiel du module Scrib dans le maintien de l'équilibre apico-basal dans la polarité épithéliale.

#### 1.4.2.2 Le groupe Yrt

La protéines Yrt et ses orthologues humains EHM2 et YMO1 sont des régulateurs multifonctionnels de l'organisation de la polarité épithéliale jouant un rôle crucial dans la morphogénèse épithéliale (Hoover et Bryant, 2002; Tepass, 2009). De manière similaire au module Scrib, le groupe Yrt/Cora agit comme régulateur négatif de la machinerie moléculaire apicale, à la fois en tant que déterminant basolatéral (Laprise *et al.*, 2009) et en tant que partenaire de liaison à Crb et Sdt/PALS1 (Hsu *et al.*, 2006; Laprise *et al.*, 2006; Gosens *et al.*, 2007; Ohata *et al.*, 2011). Pour ce faire, lors de la différenciation de l'épithélium, Yrt est initialement restreinte au domaine latéral et préserve l'identité membranaire latérale en réprimant l'activité du module Crb (Laprise *et al.*, 2006, 2009). Cette restriction latérale est possible grâce à la phosphorylation de Yrt par aPKC, ce qui prévient une localisation apicale prématurée de Yrt (figure 1.9) (Gamblin *et al.*, 2014). La phosphorylation de Yrt est une fonction critique d'aPKC, puisqu'une forme de Yrt non-phosphorylable

perturbe le domaine apical. En retour, l'association entre Yrt et aPKC permet à Yrt d'inhiber l'activité d'aPKC afin de prévenir la surapicalisation, conférant ainsi à Yrt un rôle crucial dans le maintien de la polarité apico-basale aux stades de mi-embryogenèse (stades 11-13) (Gamblin *et al.*, 2014). Aux stades tardifs de l'embryogenèse, lorsque l'épithélium devient mature (stade 14 et après), Yrt peut se lier directement à la queue cytoplasmique de Crb et est recrutée à la membrane apicale, ce qui lui permet de contrôler négativement l'activité de Crb à la membrane et la croissance du domaine apicale (figure 1.9) (Laprise *et al.*, 2006). D'ailleurs, les mutants *yrt* montrent un phénotype de membrane apicale élargie similaire à celui associé à la surexpression de Crb et les doubles mutants nuls *crb yrt* présentent le même phénotype que les mutants *crb*, suggérant ainsi que Yrt agit en tant que régulateur négatif de l'activité de Crb dans la formation de la membrane apicale, et ce en amont de Crb (Laprise *et al.*, 2006).

Yrt, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Cora et Neurexin-IV (Nrx-IV) coopèrent et ont des fonctions critiques dans le maintien de la polarité épithéliale au début de l'organogenèse (stades 11-13), avant l'assemblage des jonctions septées (JSep) et avant le recrutement apical de Yrt (stade 14) (Tepass et Hartenstein, 1994; Laprise *et al.*, 2009). Ensuite, (stade 14 et après) en parallèle de son recrutement au domaine apical, Yrt devient fortement enrichie aux JSep à la membrane latérale avec la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase et d'autres composantes des JSep (Wu and Beitel, 2004). À ce moment, Yrt contrôle la perméabilité des JSep mais non leur assemblage, en contraste avec Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase et Nrx-IV qui sont requises pour l'assemblage des JSep (Baumgartner *et al.*, 1996; Genova et Fehon, 2003; Paul *et al.*, 2003; Laprise *et al.*, 2009).



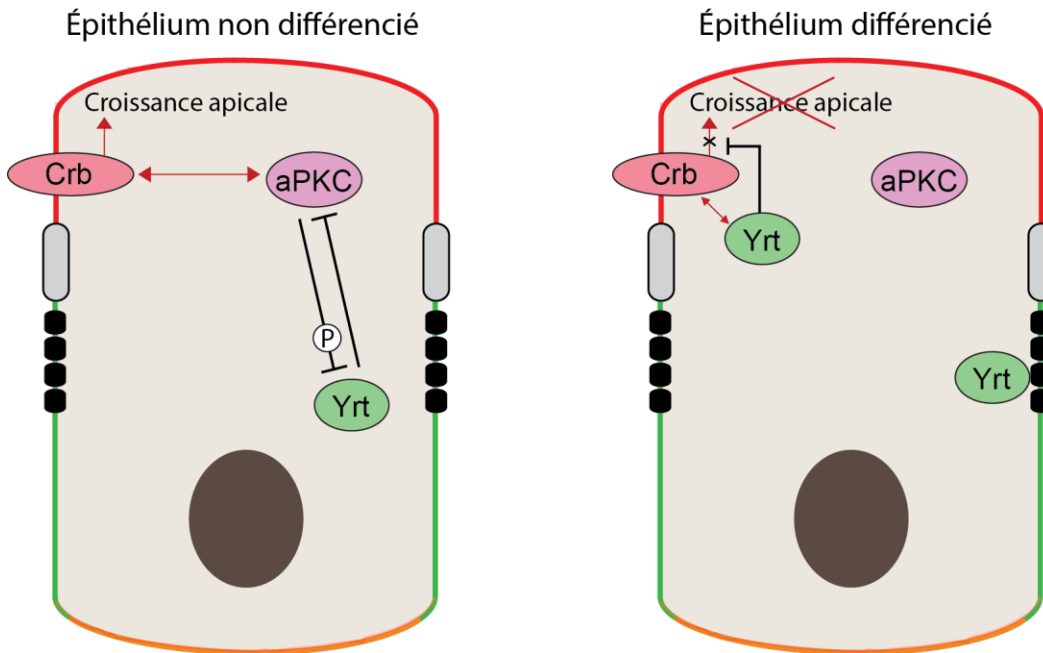


Figure 1.9: **Dynamique de Yrt au cours de la différenciation épithéliale.** Lors de la différenciation des cellules épithéliales, Yrt est phosphorylée et restreinte au domaine basolatéral par aPKC. En retour, Yrt régule négativement aPKC pour prévenir la surapicalisation. Aux stades plus tardifs de l'embryogenèse, Yrt n'est plus phosphorylée par aPKC et est recrutée au domaine apical où elle se lie à la queue cytoplasmique de Crb et inhibe son activité au niveau de la croissance de la membrane apicale. En parallèle, Yrt est enrichie aux jonctions septées où elle régule la perméabilité de ces jonctions occlusives.

### 1.4.3 Relation entre les déterminants apicaux et basolatéraux

Un thème récurrent dans la régulation de l'axe apico-basal est l'antagonisme mutuel entre les protéines apicales et basolatérales discutées précédemment. On a pu constater que lorsque les déterminants apicaux s'assemblent pour former le domaine apical, il devient nécessaire de limiter leur activité impliquée dans la formation du domaine, un rôle effectué par les déterminants basolatéraux. En même temps, il est crucial que les déterminants apicaux excluent les déterminants basolatéraux du domaine apical. Ces régulations négatives de longue portée sont basées sur de des interactions moléculaires compétitives et sont centrées sur des événements de phosphorylation. En effet, aPKC phosphoryle Lgl, Yrt et Par-1 pour

les empêcher de s'associer à la membrane apicale alors que Par-1 phosphoryle Baz pour prévenir l'assemblage basolatéral du module Baz/Par6/aPKC (Tepass, 2012). Au niveau moléculaire, la phosphorylation de Baz par Par1 confinée latéralement crée des sites de liaison à la protéine 14-3-3. La liaison de 14-3-3 avec Baz vient inhiber sa liaison à aPKC et exclue Baz de la membrane basolatérale (Benton et St Johnston, 2003a, 2003b). Cette phosphorylation de Baz par Par1 est inhibée par la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui interagit avec Patj et déphosphoryle Baz (Krahn *et al.*, 2009). Ainsi, l'exclusion latérale et apicale de Baz par Par1 et aPKC, respectivement, est importante pour que Baz puisse diriger l'assemblage des JA. En parallèle, le complexe Crb/Sdt restreint la localisation de Baz à la région subapicale (Benton and St Johnston, 2003b), et la perte des deux voies perturbe la polarité épithéliale.

Les groupes Scrib et Yrt/Cora ont chacun un rôle dans la stabilisation de la membrane latérale en contrant les déterminants apicaux, mais ne semblent pas interagir fonctionnellement. Au contraire, ces deux groupes opèrent en tant que modules indépendants durant différentes périodes de la différenciation épithéliale (Laprise *et al.*, 2006, 2009). De ce fait, durant la gastrulation, quand le réseau de la polarité vient d'être établi, Crb est limité au domaine apical par Lgl, Dlg et Scrib (Bilder et Perrimon, 2000; Tanentzapf et Tepass, 2003). En contraste, le groupe de Lgl n'est plus essentiel à la maintenance de la polarité épithéliale au cours de l'organogenèse, alors que le groupe Yrt/Cora restreint les déterminants apicaux à leur domaine pour maintenir la polarité basolatérale (Laprise *et al.*, 2009; Gamblin *et al.*, 2014).

À noter qu'il est parfois nécessaire pour certains processus de la morphogenèse épithéliale qu'un changement contrôlé dans la balance entre les déterminants apicaux et basolatéraux se produise. Par exemple, il a été observé chez la drosophile que la diminution de Par1 entraîne un repositionnement basal des JA via une augmentation de Baz, ce qui initie la constriction apicale et l'invagination des cellules dorsales (Wang *et al.*, 2012).

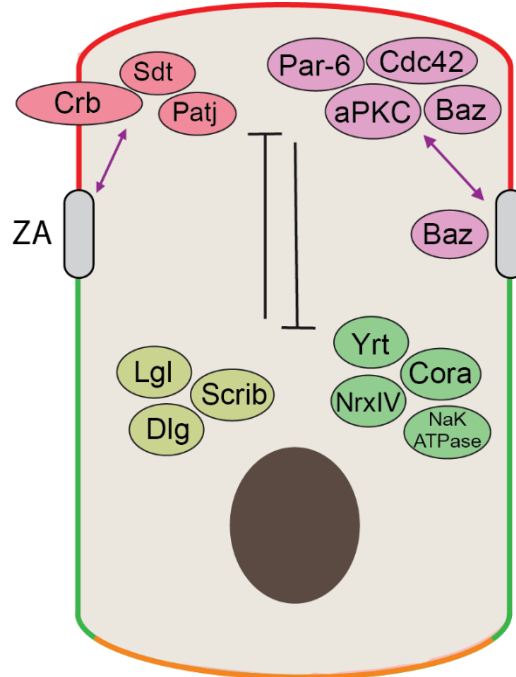


Figure 1.10: **Antagonisme mutuel entre les régulateurs de la polarité épithéliale.** Les déterminants de la polarité peuvent être regroupés en 2 grandes catégories: les déterminants apicaux et basolatéraux. On retrouve deux groupes de déterminants apicaux, soit le module Crb composé des protéines Crb-Sdt-Patj et le module Par formé par aPKC-Par6-Cdc42-Baz, qui sont cruciaux pour la croissance et la détermination du domaine apical ainsi que pour l'établissement et le maintien des ZA. Parmi les déterminants basolatéraux, il existe deux groupes principaux: le module Scrib composé de Lgl-Scrib-Dlg et le groupe Yrt-Cora qui contient les protéines Yrt-Cora-NrxIV-NaK ATPase, qui sont indispensables au développement et à la stabilisation du domaine basolatéral. Le maintien d'un ratio adéquat entre les domaines apical et basal repose sur les interactions entre les régulateurs apicaux et les ZA ainsi que sur l'antagonisme mutuel entre les régulateurs apicaux et basolatéraux. Baz est enrichi aux ZA avec le complexe cadhérine-caténine et peut fonctionner indépendamment du module Par pour réguler les ZA. Ces groupes et leurs interactions sont conservés de la drosophile à l'humain.

## 1.5 La protéine Girdin

### 1.5.1 Présentation de la famille Girdin

La protéine Girdin fait partie de la famille Girdin qui comprend Girdin, Daple et Gipie chez les mammifères et un seul orthologue chez la drosophile nommée Girdin (Enomoto *et al.*, 2006) que je nommerai parfois dGirdin au cours de cet écrit afin de

faciliter la distinction entre Girdin humain et de drosophile. Girdin et Daple sont des protéines exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus mammifères (Le-Niculescu *et al.*, 2005; Enomoto *et al.*, 2006). Girdin a été reportée dans la littérature pour la première fois en 2005 par quatre groupes de recherche indépendants lui conférant des rôles au sein de la voie Akt, de l'activation des protéines G trimériques, du remodelage du cytosquelette d'actine et de la régulation des microtubules et de la dynamine (Anai *et al.*, 2005; Enomoto *et al.*, 2005; Le-Niculescu *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2005). Puisque chaque groupe de recherche l'a nommée différemment, Girdin (pour *girders of actin filament*) est aussi connue sous les noms d'*Akt phosphorylation enhancer* (APE), *G $\alpha$ -interacting-vesicle-associated protein* (GIV) et *Hook-related protein 1* (HkRP1). Les souris déficientes en Girdin survivent à l'embryogenèse mais présentent des défauts dans l'angiogenèse post-natale (Kitamura *et al.*, 2008) et dans la formation des neurones à l'âge adulte (Enomoto *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011), suggérant que la fonction de Girdin serait particulièrement importante pour les événements prenant place dans les périodes post-natales et adultes plutôt qu'embryonnaire chez les mammifères. Or, on observe dans les mutants *gir M/Z* chez la drosophile des défauts majeurs entraînant de la létalité embryonnaire (Houssin *et al.*, 2015). Ceci suggère l'existence d'une certaine redondance fonctionnelle entre les trois paralogues mammifères.

Daple (*Dishevelled-associating protein with a high frequency of leucine residues*) est une protéine d'échafaudage qui se lie à Dishevelled (Dvl) et régule négativement la voie Wnt canonique (Oshita *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005), une voie essentielle pour le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus. En plus de lier Dvl, Daple contient un motif de liaison aux protéines G ayant une activité GEF et est capable de lier les récepteurs Frizzled (FZDR), des récepteurs activés par les ligands Wnt, ce qui lui permet d'initier la voie Wnt non-canonique (Aznar *et al.*, 2015). Puisque Daple active la voie Wnt non-canonique et inhibe les réponses Wnt canoniques, il y a présence d'une boucle de rétrocontrôle positive en faveur des signaux Wnt non-canonique (Aznar *et al.*, 2015). Daple régule aussi la dynamique des microtubules et la polarité planaire des cils motiles (Takagishi *et al.*, 2017).

Pour ce qui est de Gipié (*GRP78-interacting protein induced by endoplasmic reticulum stress*), il s'agit de la moins connue des protéines de la famille Girdin. Gipié est un régulateur du stress au réticulum endoplasmique dans les cellules des muscles vasculaires lisses et contribue au processus de remodelage vasculaire (Noda *et al.*, 2015). Elle est localisée au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi où, dans les cellules endothéliales, elle stabilise l'interaction entre GRP78, une protéine chaperonne régulant la réponse des protéines à l'état déplié, et IRE1 $\alpha$ , une protéine transmembranaire senseur de stress, ce qui permet de réduire la mort cellulaire induite par le stress au réticulum endoplasmique (Matsushita *et al.*, 2011).

### 1.5.2 Structure des protéines de la famille Girdin

Chez l'humain, Girdin est une protéine d'échafaudage de 1870 acides aminés (figure 1.11) dont la structure assume une conformation  $\alpha$ -hélicoïdale *coiled-coil*, similaire au domaine *coiled-coil* des chaînes lourdes de myosine, impliquée dans l'homo/oligomérisation de Girdin (Enomoto *et al.*, 2006). En position N-terminale, Girdin possède un domaine Hook pouvant possiblement lier les microtubules, ainsi qu'un domaine permettant la liaison directe de Girdin avec la GTPase Dynamine-2 (Simpson *et al.*, 2005). Le domaine N-terminal de Girdin est aussi impliqué dans sa liaison avec DISC1 et les intégrines (Enomoto *et al.*, 2009; Legate *et al.*, 2009). Il existe une région d'environ 80 acides aminés très bien conservée au sein du domaine C-terminal des protéines de la famille Girdin, mais aucune fonction n'y a encore été associée (Enomoto *et al.*, 2006). Le domaine C-terminal de Girdin contient aussi un domaine de liaison aux protéines G (GBD), qui lie constitutivement les protéines G $\alpha$ , ainsi qu'un motif GEF qui est nécessaire et suffisant pour lier et activer les sous-unités G $\beta\gamma$  (Le-Niculescu *et al.*, 2005; Garcia-Marcos *et al.*, 2009). Ce même motif GEF de Girdin joue aussi un rôle de GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*) pour G $\alpha_s$ , qui permet d'inactiver G $\alpha_s$  aux endosomes et de limiter la prolifération cellulaire (Beas *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2016). De plus, Girdin possède un domaine qui lie les phosphoinositol 4-phosphate (PI4-P) à la membrane plasmique et au Golgi (Enomoto *et al.*, 2005). Cette interaction est régulée par la phosphorylation de Girdin par Akt qui vient dissocier Girdin des membranes (Anai *et*

*al.*, 2005; Enomoto *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2008). Girdin est aussi phosphorylée près de son motif GEF par la kinase CDK5, un événement qui affecte les signaux de la voie Akt (Bhandari *et al.*, 2015). En outre, Girdin contient des domaines clés lui permettant de lier et de remodeler les filaments d'actine (Enomoto *et al.*, 2006) ainsi que de lier les récepteurs tyrosine kinase (RTK) activés (Ghosh *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014), les PI3 kinases (PI3K) de Classe I (Lin *et al.*, 2011), les récepteurs EGFR et GPCR (Ghosh *et al.*, 2010; Garcia-Marcos *et al.*, 2015), la protéine régulatrice des microtubules CLASP2, et le déterminant de la polarité PAR-3 (Ohara *et al.*, 2012; Ota *et al.*, 2013). Girdin est aussi phosphorylée par de multiples tyrosines kinases réceptrices et non-réceptrices au sein d'une série d'environ 100 acides aminés possédant une plasticité structurale qui, en présence des ligands phosphotyrosines, permet leur repliement en un domaine « SH2-like » (Lin *et al.*, 2011, 2014).

Concernant la protéine Daple, il est connu que cette protéine se lie à Dvl via ses trois derniers acides aminés GCV (Glycine-Cystéine-Valine) pour réguler la voie Wnt (figure 1.11) (Oshita *et al.*, 2003). Son domaine C-terminal peut aussi lier directement les récepteurs FZDR activés, créant ainsi des complexes FZDR-Gai à la membrane plasmique. Son motif de liaison et d'activation des protéines G (GBD) est requis pour l'activation de la voie PI3K-Akt (Ghosh *et al.*, 2008; Aznar *et al.*, 2015). De plus, Daple peut se lier aux phosphatidylinositols PtdIns(3)P et PtdIns(3,5)P2, et est phosphorylée par Akt pour réguler la voie Wnt (Aznar *et al.*, 2017).

Gipie possède des fonctions distinctes de Girdin en raison de la faible homologie de séquence entre leurs domaines C-terminal. Gipie forme un complexe avec GRP78 et IRE1 $\alpha$  via son domaine C-terminal et stabilise l'interaction entre ces deux protéines afin de réguler la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Noda *et al.*, 2015)

Chez *Drosophila melanogaster*, la structure générale de la protéine est conservée de la drosophile à l'humain. La plus grande variation de séquence se situe dans le domaine C-terminal qui spécifie les partenaires de liaison des

protéines. Les domaines N-terminal et coiled-coil de l'orthologue dGirdin présentent une forte homologie à Girdin, indiquant que la famille des protéines Girdin origine fort probablement d'événements de duplication génique tôt dans l'évolution à partir d'une seule protéine Girdin (Enomoto *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2010). Le domaine de liaison aux protéines G (GBD) ainsi que les trois derniers acides aminés (GCV) retrouvés chez Daple pour sa liaison à Dvl sont conservés chez dGirdin.

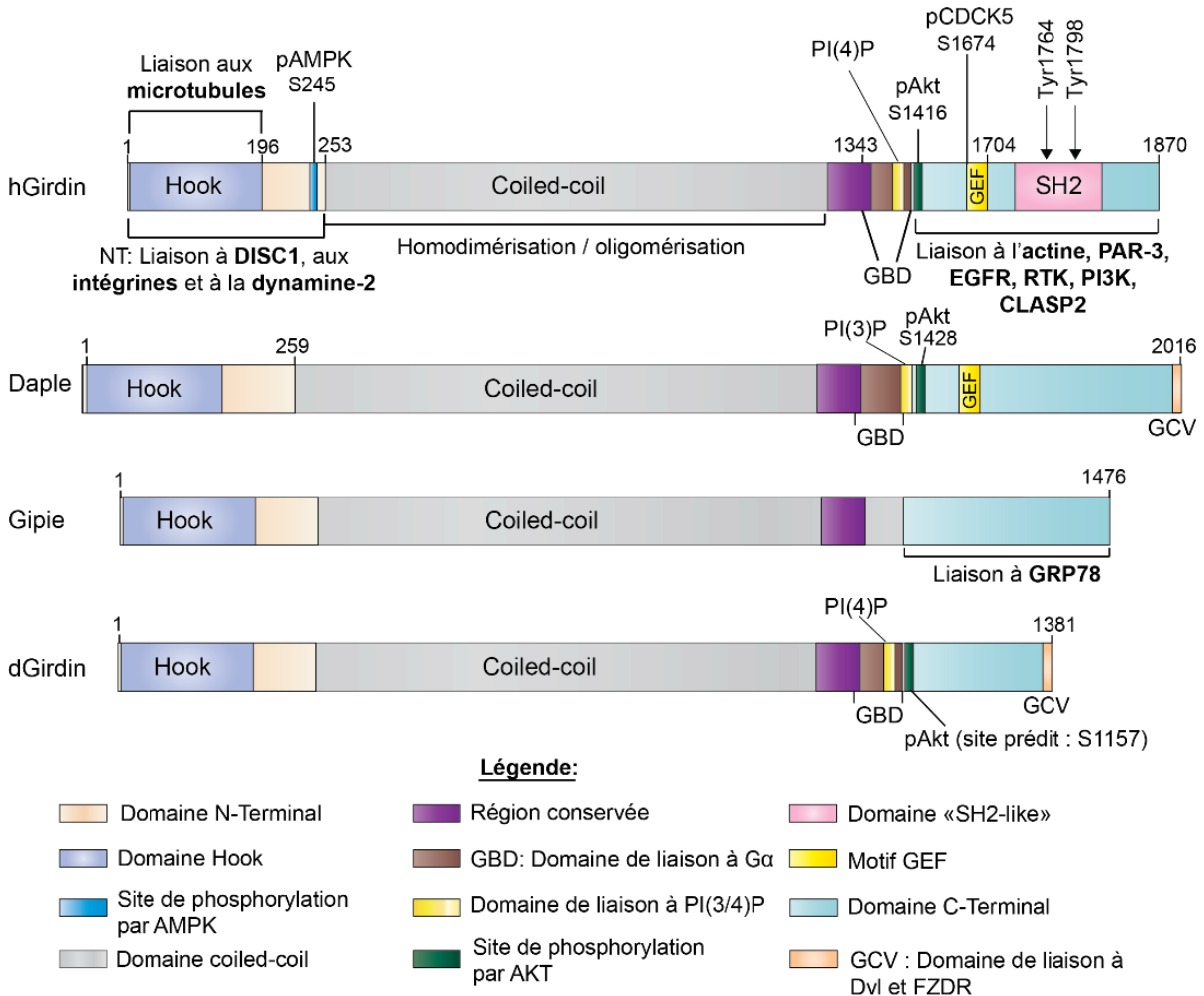


Figure 1.11: **Structure des protéines de la famille Girdin chez l'humain et chez *D. melanogaster*.** Chez les humains, la famille Girdin est composée de trois protéines, Girdin, Daple et Gippie, alors qu'il n'existe qu'un seul orthologue chez la drosophile nommé Girdin. Les domaines NT, coiled-coil, de liaison aux protéines G (GBD) et une région d'environ 80 acides aminés en CT sont conservés de la drosophile à l'humain. Les fonctions associées aux différents domaines sont indiqués vis-à-vis les domaines et/ou dans la légende de l'image. Les chiffres situés au-dessus des protéines indiquent la position en acides aminés. Abréviations: Dvl: Dishevelled, FZDR: récepteurs Frizzled, GBD: *G-protein binding domain*, GCV: Glycine-Cystéine-Valine, MBD: *membrane binding domain*, NT: N-terminal.

### 1.5.3 Fonctions de Girdin

Pour la suite, nous nous concentrerons sur la protéine Girdin humaine, ainsi que sur son orthologue dGirdin chez la drosophile. Girdin est, à ce jour, la plus étudiée des protéines de la famille Girdin et ses fonctions l'impliquent dans une multitude de processus cellulaires.

#### 1.5.3.1 Liaison aux protéines G

Les protéines G hétérotrimériques sont décrites traditionnellement comme étant des « interrupteurs » moléculaires qui transmettent le flot d'information provenant des signaux extracellulaires, captés par les récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR), à une large variété de protéines effectrices intracellulaires afin de contrôler les réponses et comportements cellulaires (Liebmann et Böhmer, 2000). Les GPCR fonctionnent comme facteur d'échange nucléotidique de la guanine (GEF; *guanine nucleotide exchange factor*), c'est-à-dire qu'ils lient directement les sous-unités  $G\alpha$  au repos (liées au GDP, en complexe avec les sous-unités  $G\beta\gamma$ ) afin de faciliter l'échange de GDP pour du GTP sur  $G\alpha$ . L'activation de  $G\alpha$  déclenche le relâchement des sous-unités  $G\beta\gamma$ , ce qui résulte en différents signaux agissant sur les effecteurs en aval (Gilman, 1987). Cette signalisation est terminée par l'activité GTPase intrinsèque de  $G\alpha$  qui entraîne sa réassociation avec  $G\beta\gamma$ . Les protéines G sont essentielles au mécanisme de transduction des signaux et constituent des nœuds de signalisation largement utilisés et couplés à une quantité remarquable de cascades signalétiques. La signalisation des protéines G trimériques peut être activée, en plus des GPCR, par des GEF non-réceptrices cytosoliques, une famille en pleine expansion possédant des domaines de liaison et d'activation des protéines G hétérotrimériques (GBD) (Cismowski *et al.*, 2000). Girdin fait partie de cette famille en agissant sur les protéines  $Gai1/2/3$  et  $Gas$ , d'où l'origine de son nom alternatif *G $\alpha$ -interacting vesicle-associated protein* (GIV) (Le-Niculescu *et al.*, 2005; Garcia-Marcos *et al.*, 2009).



### 1.5.3.2 Girdin et les voies de signalisation

L'activité GEF de Girdin lui permet de moduler plusieurs réseaux signalétiques clés en aval d'une multitude de récepteurs dont les RTK et les GPCR. Notamment, Girdin est impliquée dans l'activation de la voie PI3K-Akt pour induire la migration cellulaire (Anai *et al.*, 2005; Garcia-Marcos *et al.*, 2009). L'activité GEF de Girdin contrôle aussi les voies signalétiques mTOR et SMAD2/3 parmi d'autres (Garcia-Marcos *et al.*, 2015a). Cette fonction lui permet d'influencer le destin des cellules en agissant sur des processus cellulaires, mais aussi sur son propre destin. En effet, via son activité GEF, Girdin peut réguler positivement sa propre transcription en favorisant l'activation du facteur de transcription STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) (Dunkel *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2015).

Le mécanisme moléculaire qui permet à Girdin de coupler les protéines G aux récepteurs est, à ce jour, mieux compris dans le contexte de la signalisation en aval des RTK. Les RTK sont des protéines tyrosines kinases transmembranaires pouvant propager les signaux à l'intérieur de la cellule via le recrutement de protéines adaptatrices (Gschwind *et al.*, 2004). Girdin a la capacité de lier à la fois les RTK activés et les protéines G avec un haut degré de spécificité et d'affinité, en plus de posséder une région en C-terminal pouvant se replier en un domaine « SH2-like » en présence des ligands des RTK (Lin *et al.*, 2014). Girdin peut donc, grâce à ses particularités structurale et à son activité GEF intrinsèque, activer les protéines G en aval des RTK (Ghosh *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014; Midde *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016). L'activité GEF de Girdin est modulée par plusieurs kinases, dont CDK5, une kinase pro-migratoire pouvant activer l'activité GEF de Girdin (Bhandari *et al.*, 2015).

### 1.5.3.3 Remodelage du cytosquelette d'actine

Girdin promeut l'organisation de l'actine tant chez les mammifères que chez la drosophile (Enomoto *et al.*, 2005; Puseenam *et al.*, 2009; Houssin *et al.*, 2015). Chez les mammifères, il a été montré qu'en absence de stimulation par les facteurs de croissance dans les cellules quiescentes, Girdin lie les filaments d'actine pour

générer des faisceaux ancrés à la membrane plasmique de la région corticale des cellules. Dans les cellules en migration, la phosphorylation de Girdin par Akt au site S1416 entraîne la dissociation de Girdin avec la membrane, ce qui permet à Girdin de se positionner au front de migration afin de lier les courts filaments d'actine nouvellement générés et ainsi faciliter la formation de lamellipodes, une structure requise pour la migration cellulaire (Enomoto *et al.*, 2005, 2006). Chez la drosophile, dGirdin régule l'organisation de l'actine ainsi que la taille et le nombre de cellules dans les disques imaginaires de l'aile sous le contrôle de la voie Akt (Puseenam *et al.*, 2009). De plus, dGirdin est exprimée transitoirement durant la morphogenèse des dendrites ciliées dans trois structures d'actine entourant le segment intérieur des cils des neurones sensoriels ce qui fait de dGirdin une composante essentielle pour la formation des cils sensoriels via sa régulation des structures d'actine (Ha *et al.*, 2015). Finalement, il a été démontré au laboratoire que la perte de dGirdin altère l'intégrité et la cohésion des tissus épithéliaux ainsi que le processus de fermeture dorsale au cours de l'embryogenèse (Houssin *et al.*, 2015). Ces défauts suggèrent que dGirdin est essentielle pour la morphogenèse des tissus épithéliaux et que cette protéine partage une fonction conservée avec Girdin mammifère au cours de l'évolution dans la coordination de la migration cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette d'actine.

#### **1.5.3.4 Régulation des microtubules**

Un nom alternatif de Girdin est *Hook-related protein 1* (HkRP1) en raison de son domaine Hook qui démontre une homologie de séquence significative avec le domaine de liaison aux microtubules de la famille des protéines Hook (Simpson *et al.*, 2005). L'association directe entre Girdin et les microtubules n'a encore jamais été démontrée, mais des études ont suggéré l'existence d'une association fonctionnelle entre Girdin et les microtubules (Enomoto *et al.*, 2006). Girdin est aussi impliquée dans la division cellulaire en modulant les interactions entre l'actine et les microtubules, qui forment des structures cytosquelettiques importantes pour le remodelage de la forme de la cellule et pour la dynamique des fuseaux mitotiques

(Mao *et al.*, 2012). Finalement, une analyse protéomique de Girdin a révélé que son domaine C-terminal pouvait se lier à CLASP2 (*cytoplasmic linker associated protein 2*), une protéine s'accumulant à l'extrémité positive des microtubules et contrôlant leur dynamique ainsi que leur connexion avec le cytosquelette d'actine, appuyant le rôle de Girdin dans la régulation de la dynamique des microtubules (Ota *et al.*, 2013).

#### **1.5.3.5 Régulation du transport vésiculaire**

Des études d'immunofluorescence ont montré que le domaine C-terminal de Girdin colocalise avec un marqueur des endosomes précoces, suggérant un rôle pour Girdin au sein de l'endocytose (Enomoto *et al.*, 2006). De plus, Girdin est impliquée dans l'inhibition de la prolifération en favorisant l'assemblage de complexes Girdin-G $\alpha$ s dans les endosomes (Beas *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2016). En parallèle, Girdin interagit avec la Dynamine-2, une GTPase qui joue un rôle crucial dans la scission des vésicules d'endocytose de la membrane plasmique (Simpson *et al.*, 2005). Plus précisément, Girdin fonctionne comme une GAP (*GTPase-activating protein*) de la Dynamine-2, ce qui l'implique dans l'internalisation des transferrines et d'E-Cad (Weng *et al.*, 2014). Ces fonctions cargo-sélectives de Girdin dans l'endocytose sont possibles via la formation contrôlée du manteau de clathrine ainsi que via une compétition d'interaction entre la Dynamine, Girdin et les cargos (Weng *et al.*, 2014).

#### **1.5.3.6 Girdin et les jonctions intercellulaires**

Chez les mammifères, Girdin contrôle la formation des jonctions serrées grâce à son habileté à lier PAR3 (Ohara *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2015). De plus, Girdin régule la balance entre la livraison, l'endocytose et le recyclage de la E-cadhérine (voir section 1.5.3.5), ce qui est important pour la bonne formation et le maintien de la ZA (Harris et Tepass, 2010; Kowalczyk et Nanes, 2012). Chez la drosophile, dGirdin est largement exprimée dans les tissus embryonnaires, est concentrée à la ZA dans les cellules épithéliales, co-précipite avec  $\alpha$ -Cat, puis interagit fonctionnellement avec *shg*, le gène codant pour la DE-Cad (Houssin *et al.*, 2015).

Il est connu que Girdin joue un rôle dans l'organisation de l'actine (voir section 1.5.3.4) et que l'association de DE-Cad, Arm et  $\alpha$ -Cat avec le cytosquelette diminue en absence de dGirdin chez la drosophile (Houssin *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que Girdin renforce l'adhésion cellule-cellule en favorisant l'ancrage du complexe cadhérine-caténine au cytosquelette et que Girdin pourrait réaliser cette fonction en contrôlant la polymérisation et l'organisation de l'anneau d'actine-F cortical associé à la ZA (Houssin *et al.*, 2015)

### **1.5.3.7 Girdin et la polarité épithéliale**

Il est connu que Girdin interagit directement avec le régulateur de la polarité PAR-3 et co-immunoprécipite avec PAR-6 et PKC $\lambda$  (Ohara *et al.*, 2012). L'interaction Girdin/PAR-3 est importante pour la polarisation des fibroblastes en migration et la formation d'acinus dans les cellules épithéliales de mammifères (Ohara *et al.*, 2012). De plus, PAR-3 et PKC $\lambda$  régulent positivement l'expression protéique de Girdin au niveau transcriptionnel alors que Lgl-1/-2 la régule négativement en inhibant le complexe Par (Sasaki *et al.*, 2015). Girdin contrôle le développement du domaine apical dans les kystes en formation et l'organisation de l'actine en aval de PAR-3 (Sasaki *et al.*, 2015). Les auteurs de cette étude proposent que PAR-3 et aPKC transduisent les signaux de polarité au facteur de transcription AP-2 nucléaire pour activer la transcription de *girdin* dans les cellules en polarisation, une séquence d'événements qui est supprimée par la régulation négative du complexe Par par Lgl. En plus de se lier directement à PAR3, Girdin se lie au régulateur de la polarité Dlg5 (Tomiyama *et al.*, 2014). Cette liaison implique Girdin dans le contrôle de la migration cellulaire des cellules cancéreuses de la prostate et dans les carcinomes hépatocellulaires (Tomiyama *et al.*, 2014; Ke *et al.*, 2017). Parmi les partenaires de liaison de Girdin impliqués dans la polarité épithéliale s'ajoute potentiellement le déterminant basolatéral Yrt chez la drosophile, selon des données préliminaires de spectrométrie de masse obtenues au laboratoire (Laprise P., données non publiées). D'autres études supportent un rôle pour Girdin dans la régulation de la polarité

épithéliale. Tout d'abord, trois études publiées en 2006-2007 (Zhang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Zheng et Cantley, 2007) ont démontré simultanément que l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), un senseur métabolique activé durant le stress énergétique, joue un rôle dans la maintenance de la polarité épithéliale et des jonctions cellulaires spécifiquement en condition de stress énergétique. Suite à cela, Girdin a été identifié chez les mammifères comme étant un nouveau substrat d'AMPK (Aznar *et al.*, 2016), démontrant ainsi l'existence d'un axe de signalisation AMPK-Girdin impliquée dans la protection de l'épithélium via la stabilisation des JS en condition de stress énergétique. En se basant sur ces observations, le rôle de Girdin dans la polarité épithéliale peut être résumé comme suit: lorsque les cellules épithéliales sont exposées à un stress énergétique, la déplétion en ATP cellulaire entraîne une accumulation d'AMP et, par conséquent, l'activation de l'AMPK. AMPK activée vient lier et phosphoryler Girdin sur son résidu S245, ce qui stimule sa localisation aux jonctions cellule-cellule (JS) via une augmentation de son habileté à lier les microtubules associées aux JS (Aznar *et al.*, 2016). Une fois localisées aux JS, Girdin se lie à l' $\alpha$ -,  $\beta$ -caténine et l'E-Cad afin de relier le complexe cadhérine-caténine au cytosquelette d'actine (Houssin *et al.*, 2015). Girdin se lie aussi au complexe aPKC/Par3/Par6 (Ohara *et al.*, 2012) pour relier ces protéines aux protéines G et au cytosquelette d'actine (Sasaki *et al.*, 2015). Ceci met en évidence l'étroite relation qui existe entre la régulation des jonctions cellulaires et le maintien de l'équilibre apico-basal dans les cellules épithéliales.

## **1.6 Polarité épithéliale et le cancer**

### **1.6.1 Dérégulation de la polarité et TEM**

Chez l'humain, plus de 80 % des tumeurs originent des tissus épithéliaux (Siegel *et al.*, 2017). Une caractéristique de presque toutes les tumeurs métastatiques est la perte de la polarité et de la morphologie épithéliale combinée à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par un processus nommé la transition épithélio-

mésenchymateuse (TEM) (figure 1.12) (Thompson et Newgreen, 2005). En temps normal, la TEM est un processus physiologique qui permet les mouvements cellulaires pour diriger de multiples mécanismes biologiques comme la morphogénèse, le développement embryonnaire, le maintien de l'homéostasie des tissus et le renouvellement et la cicatrisation des tissus (Gandalovičová *et al.*, 2016). Toutefois, la TEM est aussi associée à la perte de l'adhésion cellule-cellule et à l'acquisition de propriétés migratoires et invasives (Thiery *et al.*, 2009). D'ailleurs, des perturbations dans le complexe E-Cadhérines/caténines entraînent la perte des jonctions intercellulaires associées à une perte de la différenciation épithéliale et à l'initiation de l'invasion (Vermeulen *et al.*, 1996). De plus, de nombreuses études ont démontré que l'expression des régulateurs de la polarité est altérée dans plusieurs cancers (Kalluri et Weinberg, 2009; Huang et Muthuswamy, 2010). Ainsi, la perte ou la surexpression des déterminants de la polarité et leur relation avec les jonctions cellulaires sont des événements clés dans la progression tumorale. C'est pourquoi il est important de mieux comprendre les protéines régulatrices de la polarité épithéliale et leur mode de fonctionnement afin d'appliquer ces connaissances à de nouvelles avenues thérapeutiques.

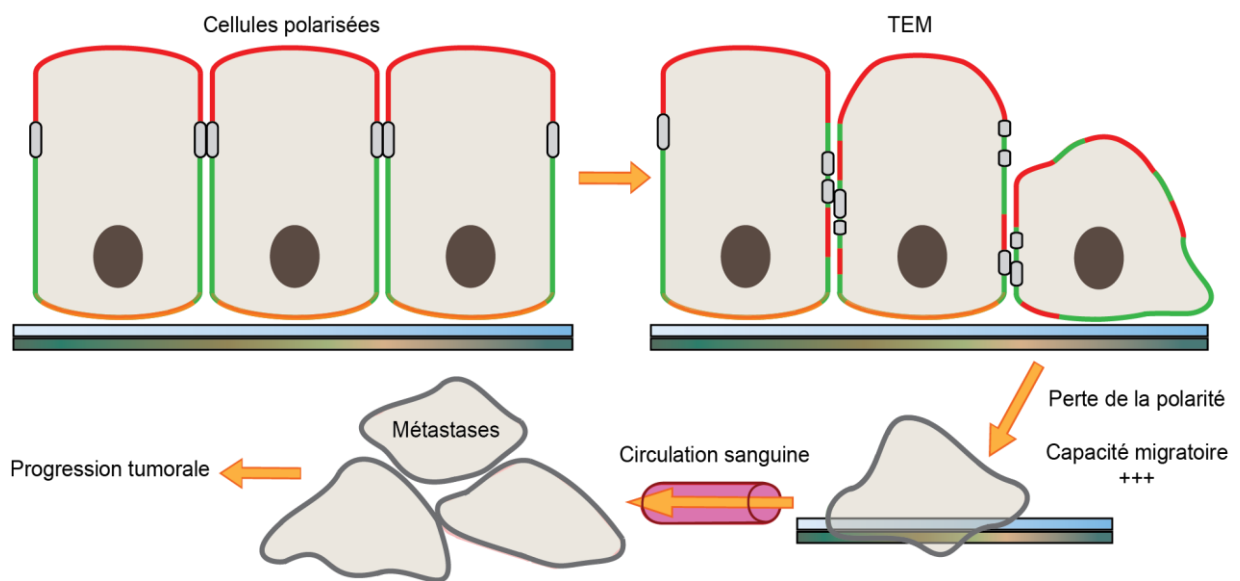


Figure 1.12: **Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)**. La TEM est caractérisée par une perte de l'adhésion intercellulaire, de la polarité des cellules et de la morphologie épithéliale en faveur de l'acquisition de propriétés mésenchymateuses telles une haute capacité migratoire et invasive. Dans les cancers, les cellules épithéliales peuvent s'évader dans la circulation sanguine et favoriser la formation de métastases via ce processus.

## 1.6.2 Rôles des déterminants de la polarité dans le cancer

### 1.6.2.1 Les déterminants du domaine apical et la progression tumorale

#### Le module Par et la progression tumorale

Le module PKC $\zeta$ /PAR3/PAR6 est connu pour jouer un rôle clé dans la régulation de la polarité épithéliale chez les humains, et la dissociation ou la suppression de ce module favorise le désassemblage des jonctions serrées, la TEM et la progression tumorale (Ozdamar *et al.*, 2005a). Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent contribuer à la dissociation de ce module comme l'hypoxie dans les cancers du poumon (Zhou *et al.*, 2017) ou la phosphorylation de PAR6 par aPKC, qui a été démontrée comme pouvant induire la TEM et augmenter le potentiel migratoire des cellules épithéliales cancéreuses du poumon et de glandes mammaires (Ozdamar *et al.*, 2005; Gunaratne et Di Guglielmo, 2013). De plus, une étude a récemment montré que l'oncoprotéine phosphatase Shp2 se lie à PAR3, ce qui inhibe la phosphorylation de PAR3 par aPKC et empêche la formation du module Par, favorisant ainsi la formation de métastases dans les cellules de la prostate (Zhang *et al.*, 2016).

Le rôle d'aPKC dans les cancers diffère en fonction de l'isoforme impliqué. En effet, les isoformes  $\iota/\lambda$  sont essentiellement des oncogènes comme le montrent plusieurs études observant que PKC  $\iota/\lambda$  sont fréquemment activés et surexprimés dans différents types de cancers (Yao *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2014). L'isoforme PKC $\zeta$  semble plutôt avoir un rôle de suppresseur de tumeur, mais peut aussi agir

comme oncogène lorsque son niveau d'activation ou sa localisation est ectopique, ce qui suggère que PKC $\zeta$  peut affecter simultanément différents aspects de la progression du cancer (Garg *et al.*, 2014; Antal *et al.*, 2015; Archibald *et al.*, 2015). PAR6 est surexprimée dans les cellules du cancer du sein et induit la prolifération cellulaire en interagissant avec aPKC et Cdc42 (Nolan *et al.*, 2008; Warner *et al.*, 2010).

Pour ce qui est de PAR3, cette protéine semble agir comme suppresseur de tumeur. Par exemple, le potentiel invasif des cellules du cancer du sein est plus élevé dans les cellules où PAR3 n'est pas exprimé, car la perte de PAR3 inhibe la stabilisation des jonctions par E-Cad, perturbe la dynamique membranaire et de l'actine aux jonctions cellule-cellule, puis diminue la cohésion intercellulaire (Xue *et al.*, 2012). De plus, la perte de PAR3 dans les cellules épithéliales transformées peut mener à l'activation de PKC $\iota$  et entraîner la formation de tumeurs et métastases dans le sein (McCaffrey et Macara, 2009; McCaffrey *et al.*, 2012). Dans les carcinomes des cellules squameuses de l'œsophage (ESCC), l'expression protéique de PAR3 est fréquemment perdue, une caractéristique associée à l'invasion tumorale et une faible espérance de vie chez les patients atteints d'ESCC (Kitaichi *et al.*, 2017). Toutefois, le rôle de PAR3 varie en fonction du type de cancer comme le démontrent des études observant une surexpression de PAR3 entraînant sa délocalisation dans les tumeurs du rein et du foie, corrélée à un faible pronostic de survie (Jan *et al.*, 2013; Dugay *et al.*, 2014).

### Le module Crb et la progression tumorale

Parmi les trois protéines CRB humaines, seule CRB3 est largement exprimée dans les cellules épithéliales (Li *et al.*, 2015). Des expériences dans la drosophile ont suggérées que Crb pouvait agir comme suppresseur de tumeur dans les épithélium des disques imaginaux via la régulation de la voie Hippo (Ling *et al.*, 2010a). Par la suite, il a été démontré sur des cellules épithéliales immortelles de reins de souris que la perte d'expression de Crb3 favorise la progression tumorale alors que la



restauration de Crb3 restreint la migration cellulaire et les métastases (Karp *et al.*, 2008). De plus, d'autres études ont montré un rôle de CRB3 comme suppresseur de tumeur chez l'humain. Les patients atteints de carcinomes rénaux présentant une perte d'expression de CRB3 survivent moins longtemps que les patients ayant une expression positive de CRB3, faisant ainsi de CRB3 un facteur pronostic favorable pour cette maladie (Mao *et al.*, 2015). De même, significativement moins ou aucune expression de CRB3 n'a été détectée dans les tissus humains de cancer du sein comparativement aux tissus normaux (Li *et al.*, 2017). Il est connu que la TEM affecte la transcription de plusieurs gènes épithéliaux via des facteurs de transcription dont Snail et *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1) (Gandalovičová *et al.*, 2016). Plus précisément, Snail et ZEB1 répriment l'expression des gènes *Crumbs3* (Whiteman *et al.*, 2008), *patj* et *pals1* dans les cellules de carcinomes colorectaux et dans les cellules non-différenciées de tumeurs du sein (Aigner *et al.*, 2007; Spaderna *et al.*, 2008). Pals1 est cruciale pour la prolifération cellulaire dans les précurseurs de neurones granulaires du cervelet chez la souris (Park *et al.*, 2016), et PATJ interagit avec *Yes-associated protein* (YAP), un effecteur central de la voie Hippo, afin d'assurer l'organisation adéquate de la machinerie de la mitose (Bui *et al.*, 2016). Toutefois, PALS1 et PATJ n'ont pas encore un rôle bien défini dans la progression tumorale.

### 1.6.2.2 Les déterminants du domaine basolatéral et la progression tumorale

#### Yrt et la progression tumorale

Tel que mentionné précédemment, il existe 2 orthologues humains de Yrt : EHM2 et YMO1, aussi connue sous le nom d'*Erythrocyte protein band 4.1-like 5* (EPB4.1L5). Plusieurs études suggèrent qu'EPB4.1L5 joue un rôle varié au sein de la progression tumorale et que son expression est diminuée ou augmentée en fonction du type de cancer. En effet, la sous-expression d'EPB4.1L5 est observée dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires (HCC) hautement métastatiques, dans les tissus tumoraux humains et indique un mauvais pronostic pour les patients atteints de

HCC (Chang *et al.*, 2016). Inversement, une forte expression d'EPB4.1L5 est associée à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de carcinomes urothéliaux (Daimon *et al.*, 2017). Dans les cancers du rein et du sein, ZEB1 est l'inducteur principal de l'expression d'*epb4.1l5* (A. Hashimoto *et al.*, 2016; S. Hashimoto *et al.*, 2016).

Le deuxième orthologue de Yrt, Ehm2, a été découvert en 1996 comme étant exprimé dans les cellules de mélanomes murins hautement métastatiques, suggérant qu'Ehm2 est impliquée dans certaines étapes menant au cancer (Hashimoto *et al.*, 1996). De ce fait, il a été confirmé qu'EHM2 est hautement exprimée dans les lignées cellulaires de cancer du sein et dans le cancer de la prostate, et cette forte expression corrèle avec la formation de métastases et un mauvais pronostic de survie (Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010). L'absence d'EHM2 augmente le potentiel apoptotique et diminue les propriétés invasives *in vitro* des cellules du cancer du sein (Yu *et al.*, 2010).

Ces études mettent en évidence un rôle potentiel d'EHM2 et d'EPB4.1L5 dans la progression tumorale via l'altération des propriétés de migration cellulaire, ce qui concorde avec ce qu'on observe chez la drosophile, c'est-à-dire que Yrt est requise pour la migration des cellules épithéliales durant l'embryogenèse et que Yrt contrôle négativement Crb, un répresseur de la TEM (Hoover et Bryant, 2002; Laprise *et al.*, 2006).

### Le module Scrib et la progression tumorale

Le module Scrib a été originalement identifié comme un groupe de suppresseurs de tumeurs chez la drosophile (Bilder *et al.*, 2000) et, en accord avec cette observation, leur rôle de suppression de la progression tumorale a été confirmé chez les mammifères. La protéine Scrib est délocalisée et sous-exprimée dans le cancer cervical, du colon, de l'endomètre et de la prostate (Ellenbroek *et al.*, 2012). Il a aussi été montré que la perte ou la délocalisation de Scrib dans les cellules épithéliales mammifères bloque la polarité des tissus lors de la morphogenèse 3D

(Zhan *et al.*, 2008). De plus, Scrib stabilise le couplage entre l'E-Cad et les caténines, maintien l'adhésion cellule-cellule et prévient la TEM dans les cellules *Madin–Darby canine kidney* (MDCK) (Qin *et al.*, 2005). Suivant la même logique, la surexpression de Lgl1 et Lgl2 inhibe la migration des cellules épithéliales transformées et la perte de leur expression corrèle avec la progression tumorale (Schimanski *et al.*, 2005; Ellenbroek *et al.*, 2012). De plus, l'expression de Lgl est supprimée par les facteurs de transcription ZEB1 et Snail (Aigner *et al.*, 2007; Spaderna *et al.*, 2008; Ellenbroek *et al.*, 2012). Tout comme pour Scrib et Lgl, la perte de Dlg est fréquemment observée dans diverses tumeurs épithéliales incluant les tumeurs cervicales et du colon (Matsumine *et al.*, 1996; Ishidate *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2002). Un mécanisme contribuant à la formation de tumeurs est la dérégulation de la  $\beta$ -caténine qui entraîne la dégradation de Dlg chez l'humain (Subbaiah *et al.*, 2012). On peut donc voir un thème récurrent parmi les nombreuses études sur Lgl, Scrib et Dlg chez les mammifères qui met en évidence leur rôle de suppresseur des tumeurs par la régulation négative de différents oncogènes et en maintenant l'adhésion cellule-cellule. L'expression et la localisation de ces protéines doivent être finement régulées afin de prévenir la TEM et la progression tumorale.

### **1.6.3 Girdin et progression tumorale**

Une expression élevée ou modérée de Girdin a été observée dans plusieurs tumeurs malignes humaines (Jiang *et al.*, 2008). Par exemple, l'expression de Girdin est significativement associée à la grosseur des tumeurs et à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer invasif du sein (Jiang *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2017). Girdin est aussi surexprimée dans les gliomes et les tissus de carcinomes hépatocellulaires (CHC) humains et est associée à un faible taux de survie chez les patients atteints de CHC (Gu *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2015, 2016; Wu *et al.*, 2016). Toujours dans les CHC, une étude récente a démontré que Girdin est impliquée, via son interaction avec Dlg5, dans la régulation de la formation d'invadopodes, des protusions de la membrane enrichies en actine retrouvées dans les cellules

cancéreuses invasives et associées à la dégradation de la matrice extracellulaire (Ke *et al.*, 2017). De plus, la liaison de Girdin à Dlg5 dans les cellules cancéreuses de la prostate inhibe la phosphorylation de Girdin par Akt (Tomiya *et al.*, 2014), ce qui fait de Dlg5 un répresseur de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate via Girdin. Girdin est aussi impliquée dans l'inhibition de l'autophagie, un processus catabolique majeur responsable de l'élimination des protéines agrégées et des organelles endommagés (Garcia-Marcos *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013). Il a aussi été montré que la phosphorylation de Girdin par Akt régule l'angiogenèse post-natale en favorisant la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Kitamura *et al.*, 2008). Finalement, il a été démontré que Girdin est impliquée dans la signalisation des intégrines dans les cellules cancéreuses (Leyme *et al.*, 2015). Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques qui modulent l'adhésion à la matrice extracellulaire en recrutant, suite à leur activation, des protéines intracellulaires impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la transduction du signal (Legate *et al.*, 2009). Ainsi, la dérégulation de la fonction des intégrines par Girdin peut mener au cancer en favorisant la migration cellulaire et l'invasion (Leyme *et al.*, 2015). Finalement, la dérégulation de la voie Girdin-AMPK contribue à la croissance des cellules tumorales lors de stress énergétique (Aznar *et al.*, 2016).

Toutes ces études montrent que Girdin joue un rôle crucial dans la formation des métastases et l'invasion du cancer, et plusieurs études suggèrent que Girdin serait un biomarqueur métastatique potentiel pour les carcinomes (Garcia-Marcos *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). En bref, Girdin peut réguler le cytosquelette d'actine, favoriser la cicatrisation des épithéliums (Enomoto *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2008) et contribuer au développement (Puseenam *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2010; Houssin *et al.*, 2015). Son motif GEF est essentiel pour la transduction du signal en aval de multiples voies signalétiques via de multiples récepteurs comme les RTK, les GPCR et les intégrines (Ghosh *et al.*, 2010, 2011; Garcia-Marcos *et al.*, 2015a; Leyme *et al.*, 2015). Ceci situe Girdin au centre de plusieurs processus cellulaires clés impliqués dans la progression du cancer comme la migration cellulaire, la

division cellulaire, la prolifération et l'angiogenèse (Kitamura *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2012).

## 1.7 Hypothèse et objectifs

Plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la polarité épithéliale sont connus à ce jour, mais plusieurs restent encore mystérieux. C'est pourquoi notre laboratoire vise à élucider ces mécanismes chez la drosophile dans le but de les valider chez les mammifères et permettre le développement d'outils thérapeutiques pour lutter contre les cancers d'origine épithéliale, qui constituent plus de 80% des types de cancers (Siegel *et al.*, 2017). En se basant sur les observations que 1) dGirdin est impliquée dans la stabilisation des JA, qui influencent la polarité épithéliale (Tepass, 2012; Houssin *et al.*, 2015), 2) Girdin interagit avec les régulateurs de la polarité PAR-3 et Dlg5 chez les mammifères (Ohara *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2014), 3) Girdin est impliquée dans le développement du domaine apical lors de la morphogenèse épithéliale des kystes polarisés (Sasaki *et al.*, 2015) et 4) Girdin interagit potentiellement avec Yrt chez la drosophile, nous avons posé l'**hypothèse** que Girdin est impliquée dans la régulation de la polarité épithéliale chez la drosophile.

Pour tester cette hypothèse, le projet de recherche est divisé en deux objectifs généraux:

1. Déterminer si Girdin participe à la polarité épithéliale en étudiant la relation fonctionnelle entre *girdin* et les principaux déterminants de la polarité
2. Caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels Girdin régule la polarité épithéliale

## Chapitre 2 – Matériel et méthodes

### 2.1 Immunobuvardage de type « Western Blot »

#### 2.1.1 Immunobuvardage sur embryons de drosophile

Les mouches adultes ont été mises dans des cages où sont déposés des pétris rempli d'un milieu où, pour 30 pétris, on a autoclavé 30g/L d'agar, 700mL d'eau, 250 mL de jus de pomme concentré avec 10 mL de méthylparaben 10% ont été ajouté. Sur ce milieu, nous déposons de la levure humide afin de favoriser la ponte. Les embryons ont été récoltés après une ponte de 17 heures (O/N) à 25 °C dans le but d'obtenir des embryons à tous les stades de l'embryogenèse. Alternativement, des collections plus courtes ont été effectuées dans le but d'obtenir des embryons à des stades spécifiques de l'embryogenèse : stades 11 à 13 (stades mi-embryogenèse) ou stades 15 à 17 (stades tardifs). Les embryons ont été déchorionnés 5 minutes dans de l'eau de javel (NaClO) diluée 1 :2, puis lysés dans du tampon de lyse au Triton froid (1% Triton X-100, 50 mM TRIS HCL pH 7,5, 5% Glycérol, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5mM EDTA pH8, 40 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1mM PMSF, 0,5  $\mu$ g/mL aprotinine, 0,7  $\mu$ g/mL pepstatine, 0,5  $\mu$ g/mL leupeptine et 0,1 mM orthovanadate). Le lysat a été centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 rotations par minute (rpm) pour éliminer les débris cellulaires. Les échantillons ont été dosés par BCA (Fisher # PI23223) selon le protocole du manufacturier, et du Laemmli (80% d'une solution de Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 10% glycerol, 1% LDS et 0.005% Bromophenol Blue mélangée avec 20% beta-mercaptoéthanol) a été ajouté à 50 à 75  $\mu$ g de lysat. Les échantillons ont été chauffés à 95 °C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines, puis déposés sur gel SDS-PAGE à 6%, 7,5% ou 10% d'acrylamide. Le gel a migré pendant 13 à 14 heures à 10 mA à 4 °C. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide à 260 mA pendant 5 heures dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine et 20 % méthanol). Les membranes ont été incubées pendant une heure dans une solution de blocage (lait 5% dans du PBS 1X (136.8 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl,

8.1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1.5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) puis hybridées avec l'anticorps primaire O/N à 4 °C suivi de lavages des membranes dans du PBS-Tween 0,05% et d'une hybridation d'une heure avec l'anticorps secondaire HRP. La révélation s'est faite avec une solution d'ECL (Tris 0,1 M, 0.5 % acide coumarique, 1 % luminol et 0,018 % de peroxyde d'hydrogène).

### **2.1.2 Immunobuvardage sur cellules S2**

Les cellules ont été cultivées à 25°C dans du milieu « Schneider's insect medium » (Wisent, Inc. numéro de catalogue 301-050-CL) complété avec 10% de FBS inactivé à la chaleur. Pour la transfection des cellules, du chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>), de l'eau stérile et l'ADN recombinant ont été mélangés dans un tube. Après une incubation de 5 minutes, de l'HBS 2X (50 mM HEPES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl) au pH 7,04 a été ajouté. Le mélange a été déposé sur les cellules en culture. 48 heures après la transfection, les cellules ont été transférées dans un tube de 15 mL stérile, puis centrifugées à 0,9 rpm pendant 3 minutes. Le culot a été resuspendu avec du PBS 1X et les cellules ont été centrifugées une deuxième fois 3 minutes à 0,9 rpm. Le culot de cellules a été lysé avec du tampon de lyse Triton 1 % (décrit dans la section 2.1). Le reste de la méthode est identique à celle employée pour l'immunobuvardage sur embryons de drosophile.

## **2.2 Immunoprécipitation**

### **2.2.1 Immunoprécipitation sur embryons de drosophile**

Les embryons sont récoltés aux stades indiqués, déchorionnés et lysés dans du tampon Triton 1%. Le lysat est centrifugé pour éliminer les débris et les protéines sont dosées au BCA (méthode décrite dans la section 2.1). Un minimum de 1 mg de lysat protéique a été incubé pendant une heure à 4 °C avec 20 µL de billes Protéine G Sepharose afin d'éliminer les protéines se liant non-spécifiquement aux billes. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés pour éliminer les billes et incubés une heure à 4 °C avec 2 µg de l'anticorps primaire indiqué ou avec l'équivalent en sérum

pré-immun comme contrôle. Suite à cela, 20  $\mu$ L de billes Protéine G Sepharose (GE Healthcare) ont été ajoutées et les échantillons ont été incubés une autre heure à 4 °C afin d'immunoprécipiter la protéine voulue et ses interacteurs. Ensuite, le surnageant a été aspiré et le culot de billes lavé 5 fois avec du tampon de lyse Triton 1%, puis les échantillons ont été préparés dans du Laemmli, dénaturés à 95 °C et déposés sur gel d'acrylamide (méthode décrite dans la section 2.1).

### **2.2.2 Immunoprécipitation sur cellules S2**

Les cellules ont été lysées suivant la méthode décrite dans la section 2.1.2. Le lysat a été dosé au BCA et l'immunoprécipitation a été effectuée sur un minimum de 1 mg de protéines, suivant la même méthode d'immunoprécipitation que sur les embryons de drosophiles.

## **2.3 Essai phosphatase**

Des embryons sauvages ou *gir* M/Z aux stades embryonnaires 11-13 et 15-17 ont été lysés soit dans du tampon de lyse au Triton (voir section 2.1. pour la composition du tampon) où la concentration d'orthovanadate a été augmentée à 10 mM afin de mieux inhiber les phosphatases, ou soit dans ce même tampon de lyse Triton mais auquel aucun inhibiteur de phosphatase n'a été ajouté (c'est-à-dire sans NaF, EDTA,  $\beta$ -glycérophosphate ni orthovanadate) et auquel une solution de 50 mM NaCl a été ajoutée pour remplacer les inhibiteurs de phosphatase. Du tampon PMP 10X et Mn 10X spécifiques à la lambda phosphatase (concentration finale : 50mM HEPES, 100mM NaCl, 2 mM DTT, 0.01 % Brij 35 et 1 mM MnCl<sub>2</sub>) ainsi que 200 U de Lambda Phosphatase (New England Biolabs) ont été ajoutés à 50 ou 75  $\mu$ g de lysat d'embryons. Les échantillons ont ensuite été incubés 30 min à 30 °C avec agitation, puis du Laemmli a été ajouté, les protéines ont été dénaturées à 95 °C puis les échantillons ont été déposés sur gel d'acrylamide (méthode décrite dans la section 2.1).



## 2.4 Préparation de cuticule

Les pétris contenant les embryons ont été déposés dans un incubateur à 25 °C pour un minimum de 20 heures afin de pouvoir bien distinguer les embryons morts (reconnaissables par leur couleur beige pâle à brun foncé) des embryons non-fécondés ou viables (blanc-transparent) qui ont à cette étape en majorité éclos. Avec une pince, les embryons morts ont été récoltés et déposés dans un panier pour ensuite être déchorionnés 5 minutes dans de l'eau de javel diluée 1 :2. Une fois déchorionnés, les embryons morts sont déposés sur une lame avec 97 µL de milieu de montage composé de 50% d'acide lactique et 50% de milieu Hoyer (0,6 g/mL de gomme arabique, 4 g/mL d'hydrate de chloral et 0,4 g/mL de glycérol), puis incubés 17h dans un four à 92 °C.

## 2.5 Fixation de cellules S2, embryons et ovaires de drosophile

### 2.5.1 Fixation d'embryons de drosophile à la chaleur

Les mouches adultes ont été laissées dans une cage pour pondre pendant 17 heures à 25°C, puis les embryons ont été récoltés, déchorionnés 5 minutes dans de l'eau de javel 1 :2 et déposés dans des vials à scintillation contenant 5 mL de tampon E-wash (7% NaCl, 0.5% Triton X-100) à 80 °C. Les embryons ont été refroidis immédiatement en introduisant le vial dans de la glace et en le remplissant de tampon E-wash à 4 °C. Les embryons ont été lavés 3 fois avec du PBS 1X. 5 mL d'heptane ainsi que 1 mL de méthanol ont été ajoutés dans le vial, puis les embryons ont été dévitellinisés par agitation à 425 rpm pendant 30 secondes et incubés dans du méthanol pendant une heure à température pièce. Ils ont été ensuite entreposés à -20 °C dans de l'éthanol 100% pour permettre une bonne conservation des embryons fixés.

### **2.5.2 Fixation d'embryons de drosophile au formaldéhyde**

Une fois déchorionnés, les embryons ont été déposés dans un vial à scintillation contenant 3 mL de tampon PEM (50 mM EGTA, 2 mM MgSO<sub>4</sub> et 100 mM PIPES) à pH 7.0, 2 mL de solution formaldéhyde 37% et 5 mL d'heptane. Ils ont été incubés dans ce mélange pendant 8 minutes à température pièce avec agitation. Suite à cela, la phase aqueuse a été extraite du vial, 1 mL de méthanol a été ajouté et les embryons ont été dévitellinisés par agitation à 425 rpm pendant 30 secondes. Ils ont été incubés dans du méthanol pendant 20 minutes et entreposés à -20 °C dans de l'éthanol 100% pour conservation.

### **2.5.3 Fixation d'ovaires de drosophiles**

Les femelles adultes ont été laissées à 25 °C pendant 2 jours dans une bouteille contenant de la levure afin d'augmenter la taille des ovaires pour favoriser la dissection. Les ovaires ont été disséqués dans du PBS 1X en prenant soin de rompre la membrane pour la perméabiliser. Les ovaires ont été fixés suivant la méthode de fixation à la chaleur utilisée pour les embryons. L'immunofluorescence a été effectuée le même jour que la dissection et la fixation des ovaires.

### **2.5.4 Fixation de cellules S2**

Des lamelles ont été préalablement stérilisées avec de l'éthanol 100% et incubée avec 0,5 mg/mL de Concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich, numéro de catalogue C5275-5MG). Les cellules ont été transfectées (méthode décrite dans la section 2.1.2) puis, 24 à 48h post-transfection, transférées sur les lamelles couvertes de ConA et incubées pendant 45-60 minutes pour que les cellules adhèrent complètement aux lamelles. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS 1X, puis incubées 15 minutes dans une solution de PFA 4% diluée dans du PBS.

## **2.6 Immunofluorescence sur cellules S2, embryons et ovaires de drosophile**

### **2.6.1 Immunofluorescence sur embryons ou ovaires de drosophiles**

Les embryons ou ovaires ont d'abords été lavés, puis bloqués pendant une heure dans une solution NGT 5 % (5 % de sérum de chèvre normalisé (NGS) dilué dans du PBT 0,3 % (PBS 1X avec 0,3 % de Triton X-100)). Ils ont ensuite été incubés O/N à 4 °C avec les anticorps primaires indiqués. Les embryons/ovaires ont été lavés et incubés 1 heure à température pièce avec les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Alexa Fluor 488 ou Cyanine3 correspondant à l'espèce de l'anticorps primaire utilisé. Les embryons/ovaires ont été lavés puis déposés sur lame dans 65 µL de milieu Vectashield (Vector Labs). Les lavages sont toujours effectués avec du PBT 0,3 %.

### **2.6.2 Immunofluorescence sur cellules S2**

Suite à la fixation, les cellules ont été lavées avec du PBT 0,3 % puis bloquées dans du NGT 5% pendant 1 heure à température pièce. Ensuite, les anticorps primaires indiqués ont été déposés sur un film de paraffine pour pouvoir y superposer les lamelles contenant les cellules et incuber le tout dans une chambre humide O/N à 4 °C. Les cellules ont été lavées avec du PBT 0,3% puis incubées 1 heure à température pièce avec les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Alexa Fluor 488 ou Cyanine3 correspondant à l'espèce de l'anticorps primaire utilisé. Les lamelles de 40 x 22mm ont été montées dans 13 µL de milieu Vectashield (Vector Labs).

## 2.7 Microscopie, imagerie cellulaire et traitement des images

La microscopie confocale sur les cellules S2, les ovaires et les embryons de drosophiles a été réalisée avec un microscope confocal FV-1000 FluoView d'Olympus (utilisation des objectifs UPlanSApo 20 X avec ouverture numérique (ON) de 0,75 et 40 X avec ON de 0,90) utilisant une station d'acquisition exploitant le logiciel FV10sw3.1. Les images ont été acquises avec un zoom de 1,2 pour l'objectif 20X et un zoom de 3,0 pour l'objectif 40 X en utilisant les lignes laser A488-488, Cy3-559, Cy5-635, et avec un temps d'exposition de 100  $\mu$ s/pixel.

La microscopie utilisée pour visualiser les préparations de cuticule a été réalisée avec une caméra CoolSNAP HQ de Photometrics contrôlée par le logiciel MetaVue (Molecular Devices) 7.77 et étant reliée au microscope Eclipse 600 de Nikon (objectifs Plan Fluor 10X avec ON de 0,3 et 20X avec ON de 0,50). Les images ont été acquises sur un seul plan, en contraste de phase.

Les images ont été traitées avec le logiciel Fiji ImageJ (version utilisant Java 8) et le traitement a consisté à ajuster la luminosité et le contraste des images afin de mettre en évidence les éléments importants.

## 2.8 Génétique des drosophiles

Les lignées contrôles utilisées dans le cadre de cette étude sont : WT (Bloomington Drosophila Stock Center [B.D.S.C] #25211), DaG4 (B.D.S.C #12974), mat67;mat15 – (matG4) (Staller *et al.*, 2013), UAS-FLAG-GFP et UAS-GFP.

Les lignées suivantes ont été utilisées pour les interactions génétiques présentées dans cette étude:  $l(2)gl^4, P\{neoFRT\}40A/CyO$  (B.D.S.C #36289),  $w^-$ ;  $P\{neoFRT\}82B, yrt^{75}/TM6B$  #8 (Laprise *et al.*, 2006),  $w^-$ ;  $FRT79D, gir^2/TM6B$  #3

(Houssin *et al.*, 2015), *hsFLP* ; *FRT42D, shg<sup>R69</sup>/Cyo* (Godt et Tepass, 1998), *bl/Cyo*;  *$\alpha$ -cat<sup>1</sup>/TM6B* (Sarpal *et al.*, 2012) et *crb<sup>s87-2</sup>, st, e/TM3* (Tepass et Knust, 1990).

### 2.8.1 Génération de lignées recombinantes

Pour générer les lignées recombinantes *Igf<sup>4</sup>, shg<sup>R69</sup>/Cyo*, *UAS-RNAi aPKC, gir<sup>2</sup>/TM6B*, *UAS-aPKC<sup>CAAX-WT</sup>, gir<sup>2</sup>/TM6B* et *crb<sup>s87-2</sup>, gir<sup>2</sup>/TM6B* présentées dans cette étude, nous avons dû utiliser l'approche par recombinaison méiotique aléatoire. Cette technique consiste à générer des femelles hétérozygotes *modification1/ modification2* et les croiser avec des mâles dans le but d'obtenir des mouches ayant recombiné de manière aléatoire pour avoir les deux modifications d'intérêt sur le même chromosome (à noter qu'une particularité de *Drosophila melanogaster* est que la recombinaison méiotique n'est possible que chez la femelle). Les mouches sont criblées par PCR (voir section 2.10) ou par des tests de complémentation afin d'identifier quelles lignées possèdent les deux modifications sur le même chromosome.

### 2.8.2 Génération de lignées mutantes maternelles zygotiques (M/Z)

Les mutants *yrt<sup>75</sup>, gir<sup>2</sup> M/Z - yrt<sup>75</sup> M/Z, gir<sup>2</sup> - yrt<sup>75</sup> M/Z - gir<sup>2</sup> M/Z* et *Igf<sup>4</sup> M/Z* présentés dans cette étude ont été réalisés en suivant une technique développée par Chou et Perrimon (Chou and Perrimon, 1996) qui prend avantage de la mutation *ovo<sup>D</sup>*. Cette mutation possède la particularité de provoquer l'arrêt précoce de l'ovogenèse chez la femelle. La technique tire aussi profit de la flippase inducible par choc thermique (*hsFLP*) qui permet d'induire de la recombinaison mitotique entre les sites de recombinaison FRT dans la lignée germinale. Les clones homozygotes générés seront soit mutants pour *ovo<sup>D</sup>* soit pour le gène ciblé. Ainsi, puisque les femelles mutantes *ovo<sup>D</sup>* seront stériles, seules les cellules germinales homozygotes pour la mutation d'intérêt poursuivront l'ovogenèse et donneront des oocytes dépourvues de contribution maternelle pour le gène voulu. Ces femelles doivent ensuite être croisées avec des mâles de la lignée mutante zygotique pour le gène

en question afin d'obtenir des mutants dépourvus à la fois de contribution maternelle et zygotique (mutants M/Z).

## **2.9 Extraction d'ADNg de drosophiles**

Une mouche de la lignée voulue est écrasée dans du tampon d'extraction composé de 10mM de Tris HCl à pH 8.2, 25 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA et 200 µg/mL de protéinase K. Les lysats sont incubés à 37 °C pendant 30 minutes puis à 85 °C pendant 10 minutes. 1 à 5 µL d'ADNg ont été utilisés pour faire la PCR servant à identifier les mouches portant le transgène voulu.

## **2.10 Anticorps**

Les anticorps utilisés pour réaliser les expériences d'immunobuvardage et d'immunofluorescence présentées dans les chapitres 3 et 4 et dont les techniques sont décrites dans les sections 2.1, 2.2 et 2.6 sont listés dans le tableau suivant :

	Nom de l'anticorps	Espèce	Origine	Dilution	
				WB	IF
AC primaires	Actin 7434	Souris	Novus Biologicals	1/1000	-
	Crb #28	Rat	Labo. Laprise (Medimabs)	1/5000	-
	Crb #30	Rat	Labo. Laprise (Medimabs)	-	1/250
	dGirdin 163	Cochon d'inde	Labo. Laprise (Medimabs)	1/5000	1/500
	Disc large PDZ2 (4F3) (Dlg)	Souris	DSHB	-	1/25
	Fasciclin III (7G10)	Souris	DSHB	-	1/15
	GFP	Souris	Roche	1/1000	-
	Lgl D300	Lapin	Santa Cruz	1/1000	1/100
	ab5813 PKC iota phosphoT555+T563	Lapin	Abcam	1/1000	1/100
	PKC $\zeta$ (aPKC) C-20	Lapin	Santa Cruz	1/2000	1/250
	Tubulin beta E7	Souris	DSHB	1/1000	-
	Yurt P-Ser387 #236 Double purifié	Lapin	Labo. Laprise (Medimabs)	1/500	-
	Yurt Pré-immun 96	Lapin	Labo. Laprise (Medimabs)	-	-
Yrt 96 purifié	Lapin	Laboratoire Laprise	1/10000	-	
AC secondaires	Guinea Pig IgG HRP (HRP-GP)	Cochon d'inde	ABCAM	1/2000	-
	Guinea Pig IgG purifié (sc-2711)	Cochon d'inde	Santa Cruz	-	-
	Guinea Pig IgG 488 (GP IgG 488)	Cochon d'inde	Jackson Immuno Research	-	1/400
	Mouse ( S ) Cy3 (S3)	Souris	Jackson Immuno Research	-	1/400
	Mouse 488 IgG ( H+L ) S488	Souris	Invitrogen	-	1/400
	Mouse IgG HRP (M-HRP)	Souris	New England Biolabs	1/2000	-
	Rabbit ( L ) (Cy3)	Lapin	Jackson Immuno Research	-	1/400
	Rabbit 488 IgG ( H+L ) L488	Lapin	Jackson Immuno Research	-	1/400
	Rabbit IgG-HRP (R-HRP)	Lapin	New England Biolabs	1/2000	-
	Rat 488 IgG ( H+L ) R488	Rat	Jackson Immuno Research	-	1/400
Rat-HRP (HRP-RAT)	Rat	Zymed Laboratories	1/2000	-	

Tableau 1. **Liste des anticorps utilisés dans cette étude.** Présentation du nom, de l'espèce, de l'origine et de la dilution employée pour chaque anticorps utilisé pour réaliser les expériences d'immunobuvardage et d'immunofluorescence présentées dans cette étude.

### Chapitre 3 – Exploration de la relation fonctionnelle entre *girdin* et les principaux déterminants du domaine basolatéral

Ce chapitre traite de la relation fonctionnelle entre *girdin* et deux gènes régulateurs du domaine basolatéral, soit *lgl* et *yrt*. Ces gènes font chacun partie d'un groupe fonctionnellement distinct de régulateurs de la polarité apico-basale, soit les groupes Scrib et Yrt/Cora respectivement, ayant chacun un rôle dans la stabilisation de la

membrane latérale à une période précise de la différenciation épithéliale (Laprise *et al.*, 2006, 2009). Cette étude nous permettra donc de mieux situer *girdin* par rapport aux différents modules basolatéraux. Tout d'abord, nous verrons que *girdin* présente une forte interaction génétique avec *lgl* ainsi qu'avec *yrt*. Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés à la relation entre les protéines Girdin et Yrt, puisqu'une analyse par spectrométrie de masse effectuée au laboratoire a identifié Girdin comme un potentiel partenaire protéique de Yrt. Nous avons donc vérifié par analyses biochimiques si cette interaction se confirme *in vivo* et *in vitro*. Nous voyons dans ce chapitre que Girdin colocalise avec Yrt à la membrane dans les cellules S2 et que Girdin pourrait se lier à Yrt ou à ses partenaires dans les cellules S2 ainsi que dans les embryons de drosophile.

### **3.1 *girdin* et *lgl***

Une méthode fréquemment utilisée chez la drosophile pour étudier la relation entre deux gènes est d'effectuer des interactions génétiques. Cette démarche consiste à observer le phénotype associé à la mutation de deux gènes séparément, puis de le comparer avec le phénotype associé à la combinaison des deux mutations. Si le phénotype résultant est différent de celui des simples mutants, cela indique qu'il existe une interaction génétique entre les deux gènes. C'est par cette approche que nous avons étudié le lien entre *gir* et *lgl*.

Il faut savoir que le développement embryonnaire chez *Drosophila melanogaster* requiert des produits géniques provenant à la fois de la mère et du zygote. Ce qu'on appelle expression zygotique représente donc les produits géniques générés par le zygote lui-même, alors que ce qu'on appelle la contribution maternelle fait référence aux ARNm et aux protéines déposés par la mère dans l'œuf au cours de l'ovogenèse, jouant ainsi un rôle dans la régulation des événements précoces de l'embryogenèse. Pour éliminer complètement l'effet d'un gène impliqué dans le développement embryonnaire, il faut créer des mutants où les contributions à la fois maternelle et zygotique sont éliminées (mutants M/Z). Ainsi, lorsque nous



faisons référence à des mutants zygotiques, il y a toujours présence de la contribution maternelle ce qui peut atténuer la sévérité du phénotype observé au cours du développement embryonnaire par rapport à un mutant M/Z. Pour étudier la relation entre *gir* et *lgl*, nous avons d'abord voulu observer l'effet d'une combinaison des deux mutations zygotiques avec les allèles nuls *gir*<sup>2</sup> et *lgl*<sup>4</sup>. On peut voir en se basant sur le marquage de Crb (apical) et Lgl (basolatéral), que les embryons sauvages (*WT*) présentent un domaine apical et basolatéral bien positionné et polarisé lors de l'organogenèse (stade 11), de la maturation des organes (stade 13) et de la différenciation terminale (stade 16) (figure 3.1 A). En préparation de cuticule, une technique permettant de visualiser l'intégrité épithéliale aux stades tardifs, on voit que les embryons *WT* possèdent des structures caractéristiques d'un épithélium bien formé, comme un crochet buccal et des ceintures de denticules (flèches, figure 3.1 F). Les mutants zygotiques *gir*<sup>2</sup> sont viables aux stades embryonnaires et ne présentent pas de défaut des tissus épithéliaux lors de l'embryogenèse; les embryons *gir*<sup>2</sup> présentent donc le même phénotype que les embryons *WT* (figure 3.1 B, G). Les mutants zygotiques *lgl*<sup>4</sup> présentent de la létalité embryonnaire, où on observe des défauts modérés d'involution de la tête ainsi qu'un trou dorsal. Malgré la forte contribution maternelle qui permet de supporter une embryogenèse normale en absence de l'activité zygotique du gène *girdin*, on observe une aggravation du phénotype dans les doubles mutants zygotiques *lgl*<sup>4</sup>; *gir*<sup>2</sup>. En effet, les cellules de l'ectoderme ventral montrent des défauts de polarité comme le montre la délocalisation de Crb sur toute la membrane au stade 11 (figure 3.1 D; *lgl gir* stade 11), suivi du rétablissement d'une architecture polarisée à partir de la mi-embryogenèse jusqu'à la fin de l'embryogenèse (figure 3.1 D; *lgl gir* stades 13 et 16). Malgré la ré-acquisition d'une polarité normale, on voit que la perte de *lgl* et *gir* engendre une extension ectopique du domaine apical visible via le marquage apical de Crb. Ces défauts se traduisent par des circonvolutions de cuticule causées par la croissance excessive du domaine apical qui sécrète la cuticule (figure 3.1 I). Ce phénotype est caractéristique des mutants *lgl* M/Z (figure 3.1 E, J). Ainsi, la perte partielle de Girdin est suffisante pour aggraver le phénotype *lgl*<sup>4</sup>, ce qui constitue

une forte interaction génétique et indique la présence d'un lien fonctionnel entre *gir* et *Igl*.

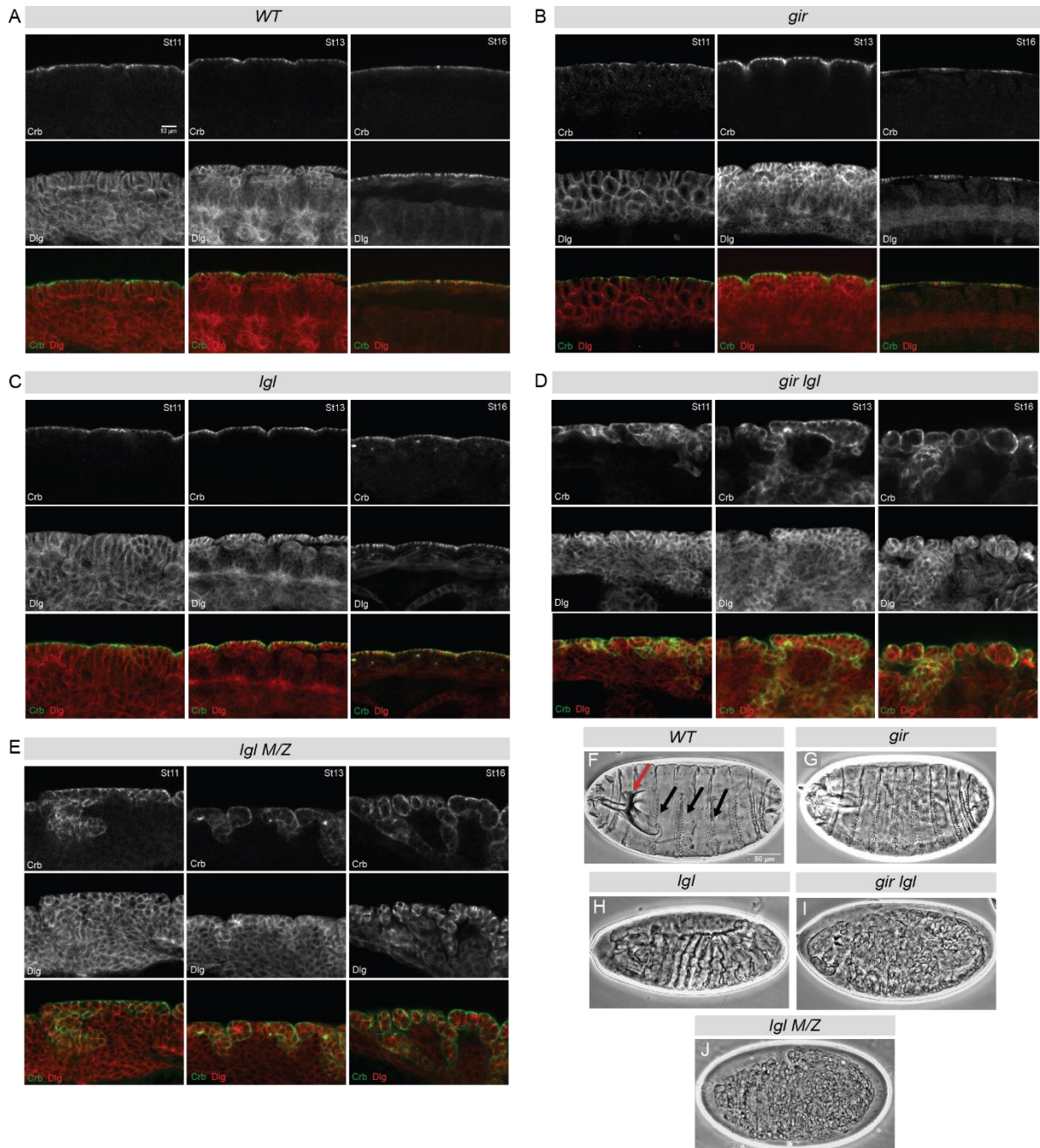


Figure 3.1. ***girdin* présente un lien fonctionnel avec *Igl***. (A-E) Images de microscopie confocale présentant une vue latérale des cellules d'une portion ventrale de l'ectoderme d'embryons immunomarqués pour Crb et Dlg aux stades 11, 13 et 16 de l'embryogenèse, tel qu'indiqué. Les génotypes présentés sont (A) *WT*, (B) mutants zygotiques *gir<sup>2</sup>* ou (C) *Igl<sup>4</sup>*, (D) double mutant zygotique *Igl<sup>4</sup>; gir<sup>2</sup>* et (E) mutant maternel zygotique *Igl<sup>4</sup>*. (F-J) Images de préparations de cuticule représentant l'intégrité épithéliale d'embryons à la fin de l'embryogenèse. Les phénotypes représentés correspondent aux génotypes suivants: (F) *WT*, (G) mutants zygotiques *gir<sup>2</sup>*, (H) mutant zygotique *Igl<sup>4</sup>*, (I) double mutant zygotique *Igl<sup>4</sup>; gir<sup>2</sup>* et (J) mutant maternel-zygotique *Igl<sup>4</sup>*. La flèche rouge pointe le crochet buccal et les flèches noires pointent les ceintures de denticules. Barre en (A): 10  $\mu$ m, s'applique aux images (A-E). Barre en (F): 50  $\mu$ m, s'applique aux images (F-J).

## 3.2 Girdin et Yrt

Nous avons vu que, selon les données préliminaires de spectrométrie de masse obtenues au laboratoire, Girdin est un partenaire potentiel de Yrt. Ainsi, nous avons d'abord voulu savoir si *gir* interagissait génétiquement avec *yrt* en utilisant la même approche que dans la section 3.1. Pour cela, nous avons observé le phénotype d'un simple mutant zygotique avec l'allèle nul *yrt<sup>75</sup>*. Les embryons mutants *yrt<sup>75</sup>* meurent lors de l'embryogenèse (Laprise *et al.*, 2006), mais ne présentent pas de défauts majeurs de l'ectoderme ventral épithélial comme on peut le voir par la distribution normale des marqueurs du domaine apical (Crb) et basolatéral (Dlg) à tous les stades de l'embryogenèse (figure 3.2 A) (Laprise *et al.*, 2006). Les défauts épithéliaux des embryons *yrt<sup>75</sup>* sont confinés à l'ectoderme de la tête, à la fermeture dorsale et à la rétractation de la bande germinale, comme on peut le voir en préparation de cuticule notamment par la présence d'un trou dorsal (flèche, figure 3.2 F) (Hoover and Bryant, 2002). Puisque les doubles mutants zygotiques *yrt<sup>75</sup>, gir<sup>2</sup>* ne sont pas différents des simples mutants (résultats non présentés), nous avons généré des mutants *gir<sup>2</sup> M/Z* afin d'éliminer la contribution maternelle de Girdin. Dans ces embryons, on observe des défauts de morphogenèse au niveau de la tête ainsi qu'une perte des structures antérieures comme le crochet buccal (figure 3.2 G) (Houssin *et al.*, 2015). Malgré ces défauts, l'ectoderme embryonnaire ventral reste intègre au cours de l'embryogenèse, tout comme dans les mutants *yrt<sup>75</sup>* (figure 3.2 B). En contraste, lorsque l'on combine ces deux mutations pour obtenir des embryons *yrt<sup>75</sup>, gir<sup>2</sup> M/Z*, on voit que la cuticule forme des circonvolutions et des repliements anormaux au niveau de la tête et du côté ventral (flèches noires, figure 3.2 H), en plus de présenter un trou dorsal plus étendu que dans les mutants *yrt<sup>75</sup>*

(flèche rouge, figure 3.2 H). En immunofluorescence, on peut voir que la structure de l'ectoderme ventral semble relativement normale à la fin de la gastrulation au stade 11 (figure 3.2 C *yrt gir M/Z* stade 11). À partir du stade 13 jusqu'au stade 16, des défauts plus sévères de la distribution de Crb sont observés et une désorganisation du tissu est visible (figure 3.2 C *yrt gir M/Z* stade 13 et 16). Ce phénotype mime le phénotype des embryons totalement dépourvus en Yrt, soit les mutants *yrt<sup>75</sup> M/Z* (figure 3.2 D et I) (Laprise *et al.*, 2006). La perte de Girdin vient donc empirer les défauts d'intégrité épithéliale des embryons *yrt<sup>75</sup>*, indiquant que *gir* interagit fonctionnellement avec *yrt*. Afin de caractériser si Girdin et Yrt agissent ensemble dans la même voie ou plutôt dans des voies parallèles, nous avons étudié des mutants totalement dépourvus en Yurt, mais n'ayant qu'une perte partielle de Girdin, soit les doubles mutants *yrt<sup>75</sup> M/Z, gir<sup>2</sup>*. Dans ces embryons, on observe une cuticule similaire à celle des embryons *yrt M/Z* (figure 3.2 J) ainsi que le même type de défauts de l'ectoderme ventral au cours de l'embryogenèse (figure 3.2 E). Autrement dit, l'ajout d'une mutation *gir<sup>2</sup> M/Z* suffit à aggraver le phénotype zygotique de *yrt<sup>75</sup>* jusqu'à phénocopier les mutants *yrt M/Z*, alors que l'ajout d'une mutation *gir<sup>2</sup>* aux embryons *yrt<sup>75</sup> M/Z* n'affecte pas le phénotype, ce qui aurait été le cas si Yrt et Girdin agissaient via des voies parallèles. Par conséquent, ces résultats démontrent que *gir* et *yrt* agissent dans une seule voie génétique et que le phénotype de *yrt* est épistatique au phénotype de *gir*, c'est-à-dire que *gir* agit en amont de *yrt*.

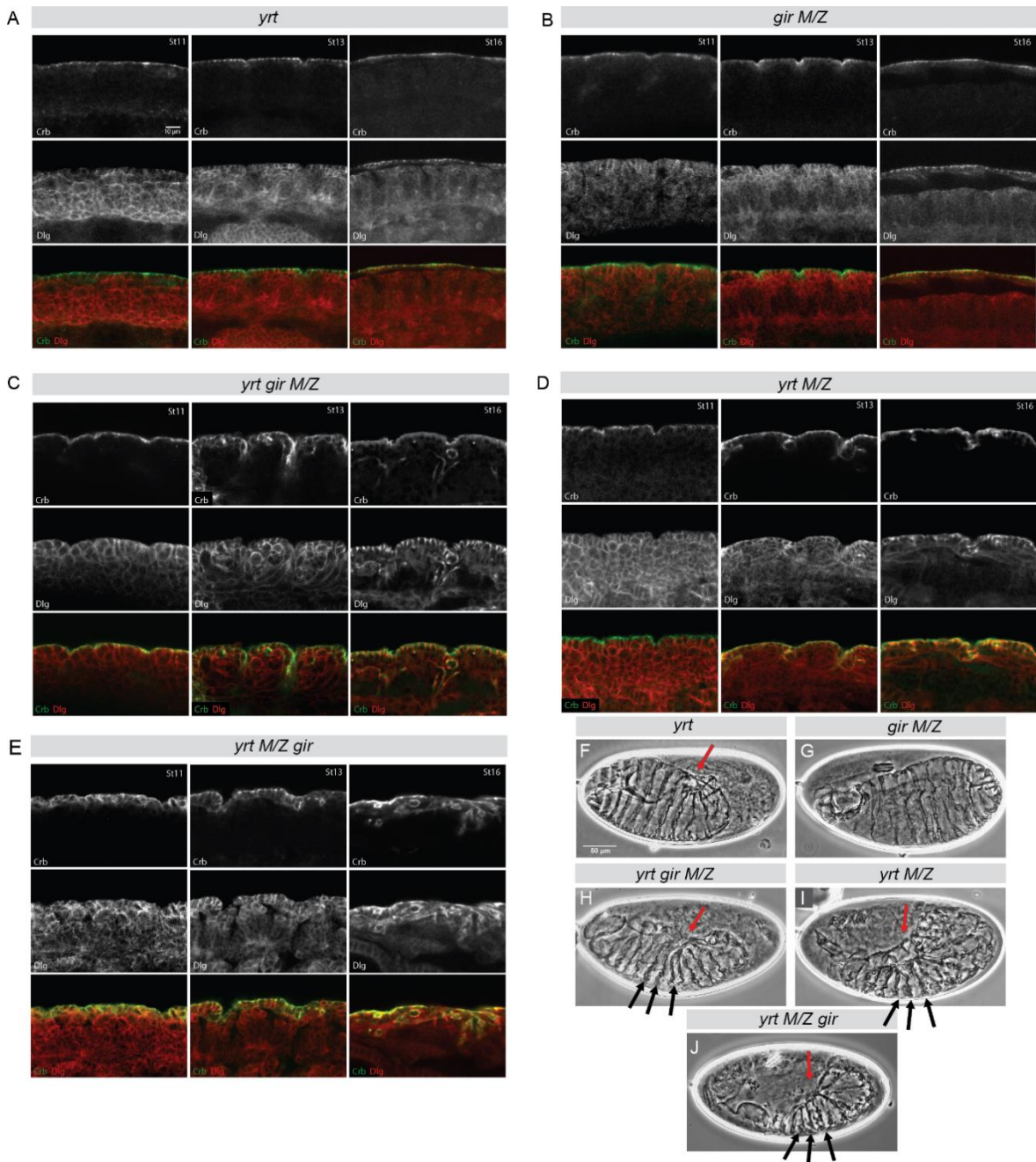


Figure 3.2. ***girdin* et *yrt* présentent un lien fonctionnel et agiraient dans la même voie.** Images de microscopie confocale montrant une vue latérale d'une portion ventrale de l'ectoderme d'embryons immunomarqués pour le domaine apical (Crb) ou basolatéral (Dlg) aux stades 11, 13 et 16 de l'embryogenèse, tel qu'indiqué. Les génotypes présentés sont (A) *yrt<sup>75</sup>* zygotique (Z), (B) *gir<sup>2</sup>* M/Z, (C) *yrt<sup>75</sup>* Z, *gir<sup>2</sup>* M/Z, (D) *yrt<sup>75</sup>* M/Z et (E) *yrt<sup>75</sup>* M/Z, *gir<sup>2</sup>* Z. (F-J) Images de préparations de cuticules représentant l'intégrité épithéliale d'embryons aux stades tardifs de l'embryogenèse. Les phénotypes présentés correspondent aux génotypes suivants: (F) *yrt<sup>75</sup>* Z, (G) *gir<sup>2</sup>* M/Z, (H) *yrt<sup>75</sup>* Z, *gir<sup>2</sup>* M/Z, (I) *yrt<sup>75</sup>* M/Z, (J) *yrt<sup>75</sup>* M/Z, *gir<sup>2</sup>* Z. Les flèches rouges indiquent les trous dorsaux en (F)(H)(I) et (J) et les flèches noires indiquent les extensions ectopiques de cuticule du côté ventral en (H)(I) et (J). Barre en (A): 10 µm, s'applique aux images (A-E). Barre en (F): 50 µm, s'applique aux images (F-J).

Par la suite, nous avons voulu étudier si l'interaction entre Girdin et Yrt est retrouvée au niveau protéique. Tout d'abord, nous avons étudié la localisation de HA-Yrt et FLAG-Gir exprimées dans les cellules de *Drosophila melanogaster* S2. Les cellules S2 sont des cellules dérivées d'une culture primaire d'embryons de drosophile de stades tardifs (Schneider, 1972) et sont classifiées comme des hémocytes, l'équivalent des macrophages chez les insectes (Vilmos et Kurucz, 1998). Nous avons constaté qu'en effet, HA-Yrt est localisé à proximité de FLAG-Girdin à la membrane des cellules co-transfectées (figure 3.3 C-C''), ce qui pourrait s'expliquer par une interaction physique entre Girdin et Yrt.

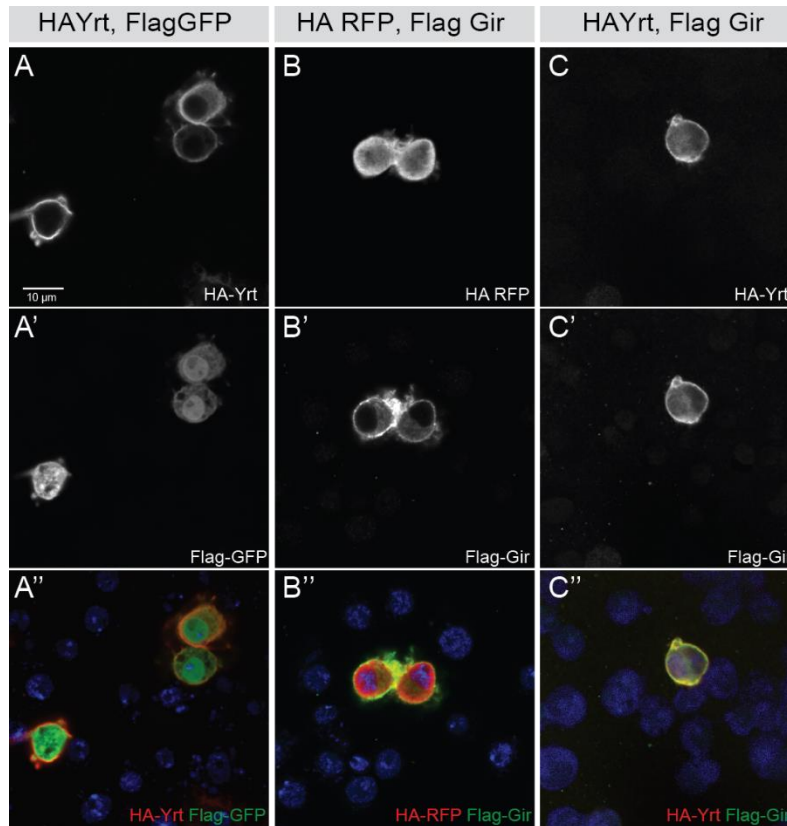
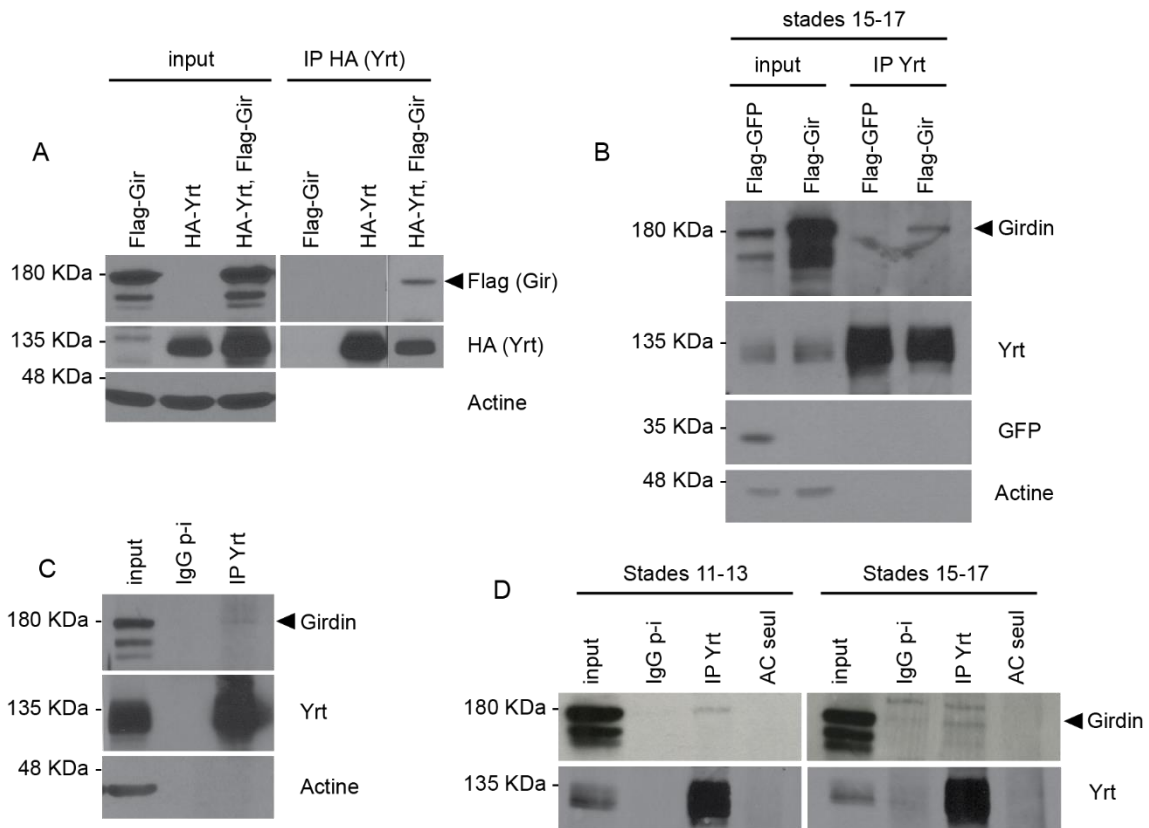


Figure 3.3. **Flag-Girdin et HA-Yrt colocalisent à la membrane dans les cellules S2.** Images de microscopie confocale sur des cellules de drosophile S2 montrant la localisation de (A) HA-Yrt, (B') Flag-Gir et (C, C') HA-Yrt et Flag-Gir. Les cellules ont été transfectées avec HA-Yrt, Flag-GFP (A, A', A'') HA-RFP, Flag-Gir (B, B', B'') ou HA-Yrt, Flag-Gir (C, C', C''). Barre en (A): 10 µm, s'applique aux images (A-C'').

Afin de déterminer si la proximité spatiale entre Girdin et Yrt dans les cellules S2 est reliée à une interaction physique, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation (IP) dans les cellules S2 de drosophile. On peut voir que FLAG-Girdin co-immunoprécipite avec HA-Yrt lorsque l'on effectue une IP HA (figure 3.4 A). Ceci indique que Girdin et Yrt interagissent physiquement en contexte de surexpression *in cellulo*, et donc que Girdin pourrait se lier à Yrt ou à ses partenaires. Pour mieux caractériser le lien entre ces deux protéines, il est important de vérifier si l'interaction est conservée *in vivo* dans les embryons de drosophile. Nous avons donc immunoprécipité la protéine Yrt endogène dans des embryons de stades tardifs de l'embryogenèse (stades 15-17) en condition contrôle (FLAG-GFP) ou en

condition de surexpression de Girdin (FLAG-Gir). On constate que la protéine Girdin est co-immunoprécipitée avec Yrt en contexte de surexpression de Girdin (figure 3.4 B). Ceci indique que la liaison entre Yrt et Girdin est accentuée ou plus stable lorsque l'expression de Girdin est élevée. Afin d'éviter le biais de surexpression, nous avons effectué une IP Yrt endogène dans des embryons sauvages (*WT*) représentant tous les stades de l'embryogenèse. On voit que Girdin endogène co-immunoprécipite avec Yrt (figure 3.4 C), ce qui suggère que Girdin se lie à Yrt ou ses partenaires dans des conditions physiologiques, mais que l'interaction est faible, transitoire ou difficile à visualiser avec cette technique. Yrt est connue pour avoir des fonctions variables dans le temps au cours de l'embryogenèse. Entre autres, lors des stades 11 à 13 (mi-embryogenèse), Yrt est liée et phosphorylée par aPKC, ce qui la restreint au domaine basolatéral. Aux stades 15 à 17 (fin de l'embryogenèse), Yrt n'est plus phosphorylée par aPKC et est recrutée au domaine apical où elle se lie à Crb et inhibe son activité membranaire (Laprise *et al.*, 2006; Gamblin *et al.*, 2014). Ainsi, nous avons voulu déterminer si l'interaction Yrt-Girdin variait en fonction des stades de l'embryogenèse. Nous avons donc effectué une IP Yrt endogène dans des embryons *WT* et comparé les embryons de stades 11-13 avec ceux de stades 15-17. On voit que Girdin co-précipite avec Yrt aux stades 11-13 et 15-17 (figure 3.4 D). Ainsi, Girdin interagit fonctionnellement et physiquement avec Yrt et cette interaction semble présente à différents stades du développement embryonnaire.





**Figure 3.4. Girdin se lie à Yrt ou ses partenaires.** Analyse par immunoprécipitation et immunobuvardage de l'interaction protéique entre Girdin et Yrt sur des cellules de drosophile S2 (A), sur des embryons de stades tardifs en contexte de surexpression (B), sur des embryons en contexte endogène (C) et sur des embryons de stades précoces et tardifs en contexte endogène (D). (A) La protéine Yrt exogène a été immunoprécipitée (IP-HA) à partir de lysats de cellules ayant été transfectées avec des vecteurs exprimant Flag-Gir, HA-Yrt ou HA-Yrt, Flag-Gir tel qu'indiqué. (B) La protéine Yrt endogène a été immunoprécipitée à partir de lysats d'embryons de stades 15-17 exprimant Flag-GFP ou Flag-Girdin. (C) La protéine Yrt endogène a été immunoprécipitée à partir de lysat d'embryons provenant d'une ponte O/N (IP Yrt). Les IgG pré-immuns de lapin (IgG p-i) ont été utilisés comme contrôle négatif. (D) La protéine Yrt endogène a été immunoprécipitée (IP Yrt) à partir de lysat d'embryons de stades 11-13 ou 15-17 de l'embryogenèse. Les IgG pré-immuns de lapin (IgG p-i) ainsi que l'anticorps anti-Yrt sans ajout de billes (AC seul) ont été utilisés comme contrôles négatifs. La bande au-dessus de 180 KDa visible dans les IgG p-i et dans l'IP Yrt est une bande contaminante.

## Chapitre 4 – Précision des mécanismes par lesquels Girdin régule le domaine basolatéral

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, *girdin* interagit fonctionnellement avec *yrt* et *lgl*. Il est connu que les JA contribuent au maintien de la polarité épithéliale (Tepass, 2012), et que Girdin renforce l'adhésion cellule-cellule chez la drosophile en modulant l'ancrage du complexe cadhérine-caténine au cytosquelette (Houssin et al., 2015). De plus, il a été montré chez la drosophile que Lgl est une protéine associée au cytosquelette (Strand et al., 1994), et montré chez les mammifères que Lgl est impliquée dans la formation des JS durant la polarisation des cellules épithéliales (Yamanaka et al., 2003). De plus, il a été montré chez la drosophile que *lgl* interagit génétiquement avec *arm* (Kaplan et al., 2009). Ainsi, il serait possible que Girdin régule la polarité de concert avec Lgl en modulant le complexe jonctionnel. Pour déterminer si *girdin* agit avec *lgl* via les JA ou via une autre voie, nous nous sommes intéressés au lien entre *lgl* et deux gènes régulateurs clés des JA,  $\alpha$ -*cat* et *shg* (gène codant pour la DE-Cad). Dans ce chapitre, nous verrons que ni  $\alpha$ -*cat*, ni *shg* n'interagissent génétiquement avec *lgl*. Girdin serait donc impliquée dans la polarité épithéliale via des fonctions partiellement indépendantes de celles lui conférant un rôle dans la stabilisation des JA. La deuxième partie de ce chapitre traite de la relation entre Girdin et les déterminants apicaux. Tout d'abord, nous verrons que Girdin régule négativement le niveau de phosphorylation de Yrt et Lgl, deux substrats d'aPKC. Afin de déterminer si Girdin régule Yrt et Lgl via aPKC, nous avons étudié la relation *girdin*-aPKC par interactions génétiques. Nous verrons qu'une diminution de Girdin dans des embryons dépourvus d'aPKC restaure partiellement le phénotype épithélial, indiquant que Girdin régule négativement aPKC. Par la suite, nous verrons qu'on obtient le même type de résultats entre *girdin* et *crb*, où une mutation *girdin* restaure partiellement le phénotype mutant *crb*. Finalement, nous verrons que *girdin* interagit fonctionnellement avec *baz*, un élément important du domaine apical et des JA (Tabuse et al., 1998; Morais-De-Sá et al., 2010)

## 4.1 Girdin et les JA : un rôle commun dans la polarité épithéliale?

L'orthologue d' $\alpha$ -Cat chez la drosophile a été identifié pour la première fois en 1993 et a été montré comme localisant aux JA et formant un complexe avec Armadillo (Arm,  $\beta$ -Cat chez les mammifères) et la DE-Cad (Oda *et al.*, 1993, 1994). Il s'agit d'un élément essentiel à la formation et au maintien des JA (Kemler, 1993). Pour étudier la relation entre *lgl* et  *$\alpha$ -cat*, nous avons d'abord observé le phénotype des mutants zygotiques  *$\alpha$ -cat<sup>1</sup>* au stade embryonnaire. Les embryons  *$\alpha$ -cat<sup>1</sup>* sont létaux et leur cuticule montre des défauts d'involutions de la tête créant une large ouverture antérieure dans l'épiderme (figure 4.1 E) (Sarpal *et al.*, 2012). Au niveau de l'ectoderme ventral, les mutants  *$\alpha$ -cat<sup>1</sup>* ont une distribution normale de Crb et de Dlg à tous les stades de l'embryogenèse (figure 4.1 A). Lorsque l'on combine ces deux mutations de manière à obtenir des doubles mutants zygotiques *lgl  $\alpha$ -cat<sup>1</sup>*, on n'observe aucune différence de phénotype par rapport aux embryons  *$\alpha$ -cat<sup>1</sup>*, ni au niveau de la cuticule (figure 4.1 F), ni au niveau de l'ectoderme ventral (figure 4.1 B). Ceci indique qu' *$\alpha$ -cat* et *lgl* n'interagissent pas fonctionnellement, du moins en condition de mutations zygotiques.

Des études ont montré que la DE-cadhérine est la cadhérine épithéliale centrale chez la drosophile et que ses propriétés biochimiques, ses interactions avec les caténines, sa localisation subcellulaire et son rôle dans la différenciation épithéliale sont similaires à l'E-cadhérine des vertébrés (Oda *et al.*, 1993, 1994; Peifer, 1993; Tepass *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 1996). Pour étudier si *shg* et *lgl* interagissent génétiquement nous avons premièrement analysé la mutation zygotique de perte de fonction *shg<sup>R69</sup>*. Les mutants *shg<sup>R69</sup>* meurent au stade embryonnaire et présentent une perturbation de la morphogenèse et de l'intégrité de l'épiderme ventral de manière à ne sécréter qu'un feuillet dorsal de cuticule (figure 4.1 G) (Tepass *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 1996). Toutefois, en vue latérale de l'ectoderme ventral, les défauts se manifestent uniquement aux stades tardifs (stade 16) où on peut voir des

repliements anormaux du tissu (figure 4.1 C). Lorsque la dose de *Lgl* dans ces embryons *shg*<sup>R69</sup> est réduite, le phénotype résultant est semblable à celui des simples mutants *shg*<sup>R69</sup> (figure 4.1 D et H). Ainsi, *shg* et *lgl*, ne présentent pas de lien fonctionnel en condition de mutations zygotiques.

Puisque les analyses de doubles mutants zygotiques ont révélées que *girdin* interagit fortement avec *lgl* alors que ni  $\alpha$ -*cat*, ni *shg* ne présente de telles interactions avec *lgl*, il est fort probable que Girdin régule la polarité via des fonctions encore inexplorées se distinguant de celles d' $\alpha$ -Cat et de DE-Cad.

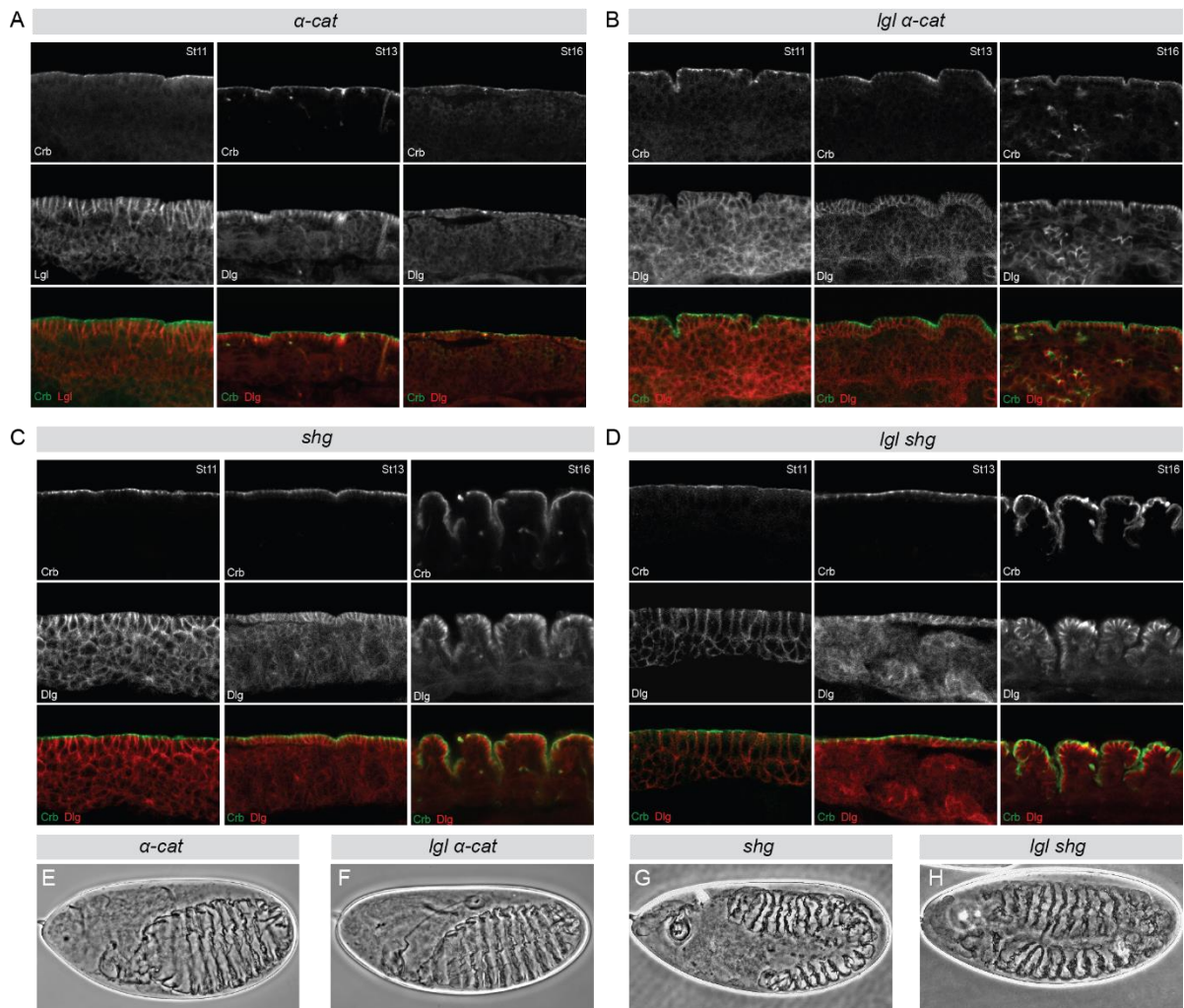


Figure 4.1. **Le rôle de *girdin* dans la régulation des fonctions de *lgl* serait en partie indépendant de son rôle dans la stabilisation des JA.** (A-D) Images de microscopie confocale montrant une vue latérale d'une portion ventrale de l'ectoderme d'embryons immunomarqués pour le domaine apical (Crb), ou pour le domaine basolatéral (Lgl ou Dlg) aux stades 11, 13 et 16 de l'embryogenèse, tel qu'indiqué. Les génotypes présentés sont (A) mutants zygotiques  $\alpha\text{-cat}^1$ , (B) doubles mutants zygotiques  $lgl^4; \alpha\text{-cat}^1$ , (C) mutants zygotiques  $shg^{R69}$  et (D) doubles mutants zygotiques  $lgl^4, shg^{R69}$ . (E-H) Préparations de cuticule reflétant l'intégrité épithéliale des embryons (E)  $\alpha\text{-cat}^1$ , (F)  $lgl^4; \alpha\text{-cat}^1$ , (G)  $shg^{R69}$  et (H)  $lgl^4, shg^{R69}$ .

## 4.2 Girdin et aPKC

Un lien entre les protéines Yrt et Lgl est que ce sont, en plus d'être des déterminants basolatéraux de la polarité, deux protéines phosphorylées et régulées négativement par la kinase aPKC (Betschinger *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003; Gamblin *et al.*, 2014). Sachant que la phosphorylation de Yrt et Lgl par aPKC vient inhiber leurs fonctions et est cruciale pour le maintien de la polarité épithéliale, nous avons émis l'hypothèse que Girdin régule négativement l'activité d'aPKC. En effet, ceci pourrait expliquer les résultats décrits dans le chapitre 3. Selon notre hypothèse, la diminution de l'expression de Girdin dans les mutants zygotiques *yrt* et *lgl* entraînerait une diminution de l'inhibition d'aPKC par Girdin, ce qui permettrait à la kinase d'être plus active, de plus phosphoryler ses substrats Lgl et Yrt et donc d'inhiber leur activité résiduelle maternelle jusqu'à mimer le phénotype des mutants *lgl M/Z* et *yrt M/Z*. Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé l'état de phosphorylation de Yrt et Lgl en présence ou absence de Girdin par immunobuvardage. Dans le but de mieux caractériser le moment auquel Girdin peut réguler la phosphorylation de ces protéines dans l'embryogenèse, nous avons effectué les expériences sur des embryons de stades 11 à 13 ou 15 à 17, puisque Yrt est principalement phosphorylée par aPKC aux stades 11-13 (Gamblin *et al.*, 2014). On observe en comparant les embryons contrôles (*DaG4*) avec les embryons mutants *gir<sup>2</sup> M/Z* que la bande correspondant à Yrt présente un retard de migration dans les embryons dépourvus de Girdin aux stades 11-13 et 15-17 (figure 4.2 A). Ce retard de migration représente l'état de phosphorylation de Yrt, car

lorsqu'on ajoute une protéine phosphatase ( $\lambda$  ppase) qui vient déphosphoryler les protéines, le retard de migration est supprimé (figure 4.2 A). Curieusement, on observe aussi une augmentation de l'expression de Yrt dans les mutants *gir<sup>2</sup> M/Z* (figure 4.2 A). Ces résultats suggèrent que Girdin pourrait possiblement réguler Yrt en inhibant sa phosphorylation et en favorisant sa dégradation.

Ensuite, nous avons analysé l'état de phosphorylation de Lgl en présence ou absence de Girdin via le même type d'essai phosphatase que précédemment. Comme pour Yrt, on observe un retard de migration de Lgl légèrement plus marqué dans les mutants *gir<sup>2</sup> M/Z* par rapport aux contrôles (figure 4.2 B). Par contre, cette différence semble être spécifique aux stades 15-17 de l'embryogenèse (figure 4.2 B). L'ensemble de ces résultats montre que Girdin régule négativement l'état de phosphorylation de Yrt et de Lgl, que Girdin régule négativement le niveau d'expression de Yrt, puis que Girdin pourrait réguler la phosphorylation de Lgl de manière dynamique au cours de l'embryogenèse.

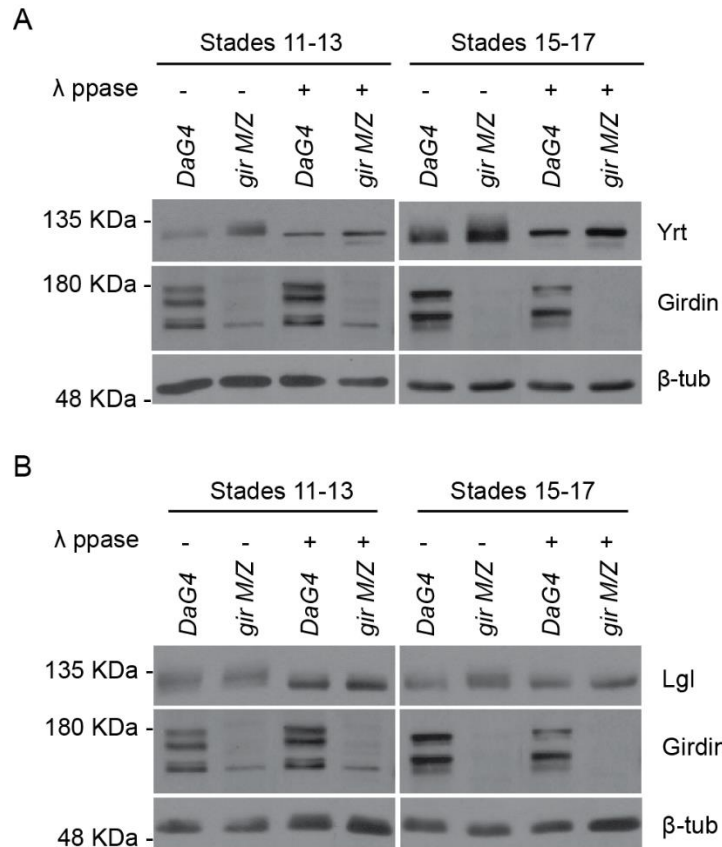


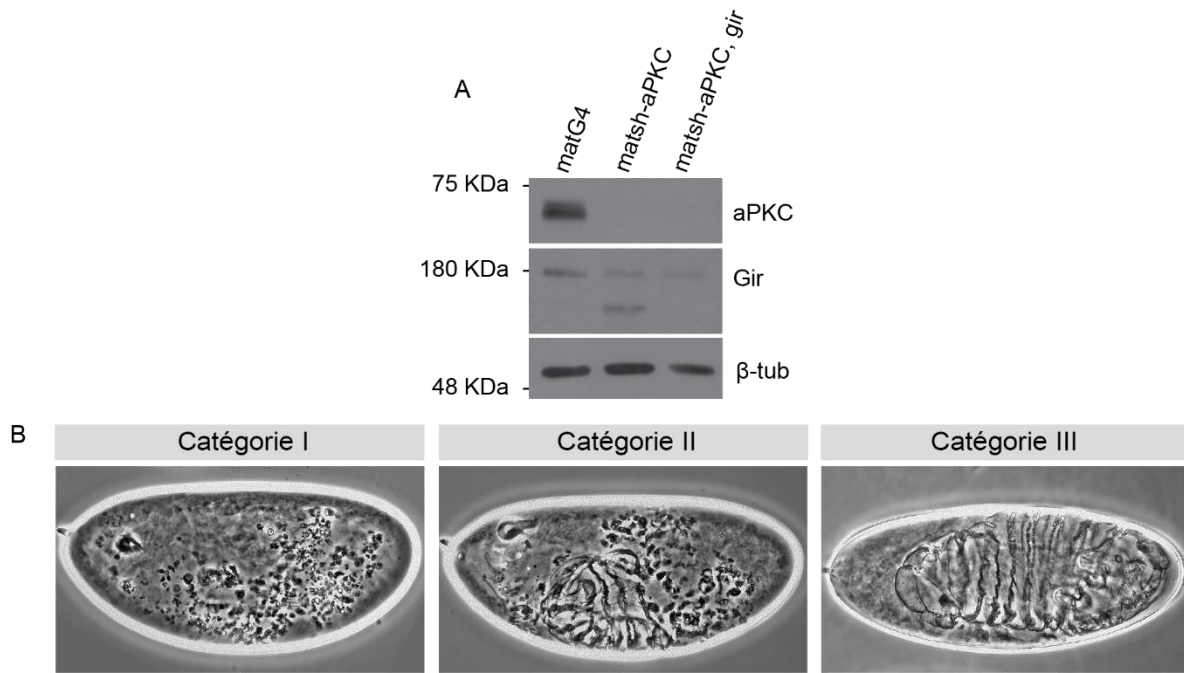
Figure 4.2. **Girdin régule négativement le niveau de phosphorylation de Yrt et Lgl ainsi que le niveau d'expression de Yrt.** (A-B) Analyse du niveau de phosphorylation de Yrt (A) et Lgl (B) dans des embryons de stades 11-13 et 15-17 de l'embryogenèse par immunobuvardage. Les essais phosphatase ont été effectués avec de la protéine lambda phosphatase ( $\lambda$  ppase) sur des lysats d'embryons contrôles DaG4 ou mutants *gir*<sup>2</sup> M/Z. (A) L'immunobuvardage avec l'anticorps anti-Yrt montre que Yrt présente un retard de migration, correspondant à de la phosphorylation, ainsi qu'un niveau d'expression plus élevé dans les mutants *gir*<sup>2</sup> M/Z que dans les contrôles aux stades 11-13 et 15-17. (B) L'immunobuvardage avec l'anticorps anti-Lgl met en évidence que Lgl présente un retard de migration, correspondant à de la phosphorylation, plus marqué dans les mutants *gir*<sup>2</sup> M/Z que dans les contrôles.

Il est logique de penser que Girdin pourrait réguler négativement le niveau de phosphorylation de Yrt et Lgl en régulant négativement l'activité kinase d'aPKC. De plus, comme nous avons vu au chapitre 3, *girdin* présente des liens fonctionnels avec *lgl* et *yrt*, qui sont aussi des régulateurs négatifs d'aPKC. Nous avons donc voulu vérifier par interaction génétique si *girdin* interagit fonctionnellement avec *aPKC*. Récemment, une multitude de vecteurs ARN interférants (RNAi) basés sur des ARN *short hairpin* (shRNA) ont été développés. Lorsque ces vecteurs sont

exprimés durant l'oogenèse via une séquence activatrice UAS sous le contrôle d'un promoteur maternel-GAL4 (matG4), ils offrent une approche alternative à la génération de *germline clones* (GLC), c'est-à-dire aux mutants M/Z classiques. En effet, cette approche transgénique permet d'effectuer des *knockdown* efficaces privant l'embryon de la contribution maternelle ciblée par le transgène (Staller *et al.*, 2013). Nous avons utilisé cette technique pour exprimer shRNAi dirigés contre aPKC dans l'œuf en utilisant matG4, et avons ajouté une mutation zygotique *girdin*. Pour simplifier, nous nommerons les embryons dépourvus d'aPKC maternel *matsh-aPKC* et ceux dépourvus d'aPKC maternel et de Girdin zygotique *matsh-aPKC, gir* pour le reste de cette étude. On peut voir par immunobuvardage sur des embryons de tous les stades de l'embryogenèse que la technique a bien fonctionné, puisque les embryons *matsh-aPKC* ne contiennent quasiment plus d'aPKC par rapport au contrôle (matG4) (figure 4.3 A). À noter qu'uniquement  $\frac{1}{4}$  des embryons collectés pour effectuer l'immunobuvardage sont homozygotes pour la mutation zygotique *gir*, expliquant ainsi la faible diminution de Girdin observée dans la condition *matsh-aPKC, gir* (figure 4.3 A). Puisque les embryons n'héritent pas tous des mêmes allèles parentaux, la descendance obtenue est d'un génotype et phénotype hétérogène. C'est pourquoi, afin de déterminer si l'ajout d'une mutation *girdin* aux embryons *matsh-aPKC* affecte le phénotype, nous avons classifié tous les embryons morts selon trois catégories de phénotype basées sur la gravité des défauts d'intégrité de leurs tissus épithéliaux (figure 4.3 B). La première catégorie est la plus détériorée et comprend les embryons ne possédant plus que des kystes de cellules épithéliales se traduisant par des grains de cuticule épars (figure 4.3 B catégorie I). La troisième catégorie inclut les embryons dont l'épithélium est le moins détérioré, c'est-à-dire possédant encore un feuillet épithélial relativement organisé et aucun grain de cuticule (figure 4.3 B catégorie III). Finalement, la deuxième catégorie représente les embryons possédant des défauts intermédiaires entre les catégories I et III, c'est-à-dire ayant à la fois des résidus de feuillet épithéliaux et des grains de cuticule (figure 4.3 B catégorie II). Nous avons comparé les conditions *matsh-aPKC* et *matsh-aPKC, girdin* selon le pourcentage d'embryons de chaque catégorie observée pour chaque condition. Concordant avec notre hypothèse, nous observons



dans la condition *matsh-aPKC, gir*, par rapport aux embryons *matsh-aPKC*, une augmentation de la quantité d'embryons présentant des phénotypes modérés (catégories II et III) et une diminution des embryons au tissu fortement détérioré (catégorie I) (figure 4.3 C). Cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois sur environ 200 embryons par condition, donc il sera important d'obtenir n=3 pour pouvoir effectuer des tests statistiques. Toutefois, si la tendance se maintient, la différence sera significative. Ainsi, cette restauration du phénotype suite à la perte de Girdin suggère que les fonctions de *girdin* inhibent celles d'*aPKC*.



**C** Quantification du degré de dégradation du tissu épithélial dans des embryons morts déplétés en aPKC vs déplétés en aPKC et *girdin*

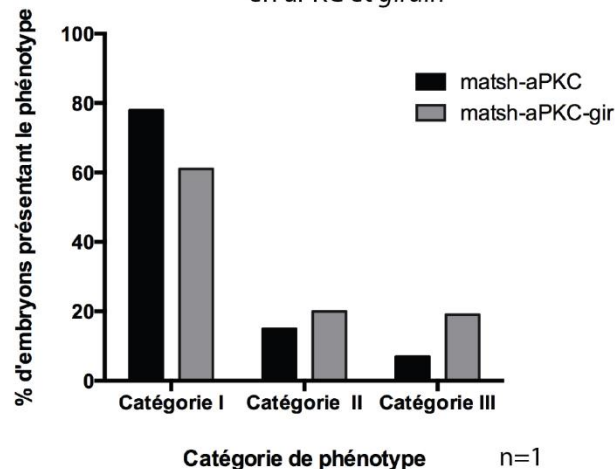


Figure 4.3. ***girdin* régule négativement les fonctions d'aPKC.** (A) Immunobuvardage validant avec les anticorps anti-aPKC et anti-Girdin que les embryons de la lignée recombinante *matsh-aPKC, gir* présentent une réduction quasi-totale de la protéine aPKC au cours de l'embryogenèse. (B) Préparations de cuticule représentant les différentes catégories de phénotypes d'embryons morts retrouvées au sein des populations *matsh-aPKC* et *matsh-aPKC, gir*. (C) Graphique comparant le % d'embryons présentant le phénotype de chacune des catégories montrées en (B) dans les conditions *matsh-aPKC* et *matsh-aPKC, gir*.

### 4.3 Girdin et Crb

Sachant que *girdin* semble réprimer les fonctions d'aPKC et interagit fonctionnellement avec *lgl* et *yrt*, et que Lgl et Yrt répriment les fonctions d'aPKC et de Crb, un autre déterminant majeur du domaine apical (Bilder et Perrimon, 2000; Tanentzapf et Tepass, 2003; Laprise *et al.*, 2006; Gamblin *et al.*, 2014), nous avons jugé pertinent d'étudier la relation entre Girdin et Crb afin de mieux situer le rôle de Girdin au sein du réseau des déterminants de la polarité. À noter que des résultats préliminaires démontrent qu'il n'y a pas de variation de phénotype entre les mutants zygotiques pour l'allèle nul *crb*<sup>11A22</sup> et les doubles mutants *crb*<sup>11A22</sup>, *girdin* (Houssin, E, 2016, p.91). Puisque l'allèle nul 11A22 montre un phénotype *crb* sévère où plus que quelques fragments de grains de cuticule apparaissent, il est possible que l'effet de la perte de Crb soit trop majeure pour qu'une diminution de Girdin puisse restaurer le phénotype (voir figure 1.7, chapitre 1 pour un exemple de mutant *crb*<sup>11A22</sup>). C'est pourquoi nous avons utilisé un allèle hypomorphe mutant *crb* nommé *crb*<sup>87-2</sup> n'entraînant qu'une inactivation partielle de l'activité du gène *crb*. Les embryons *crb*<sup>87-2</sup> présentent des défauts moins sévères où, malgré la présence de grains de cuticule, on observe des feuillettes de cuticule partiellement intacts (figure 4.4 D) (Tepass et Knust, 1990). Au niveau de l'ectoderme ventral, l'organisation du tissu est perturbée et on note des défauts membranaires entraînant la formation de rosettes de cellules au stade 16 (figure 4.4 G). Une autre façon de visualiser ces défauts est d'observer les embryons en vue latérale par immunofluorescence avec un marquage anti-Fasciclin 3 (Fas3), une protéine marquant l'ectoderme, les

intestins, le mésoderme et la glande salivaire permettant ainsi de visualiser l'intégrité épithéliale des embryons. On peut voir que les embryons *crb*<sup>87-2</sup> montrent un affaissement et une désorganisation des tissus épithéliaux (figure 4.4 B, B'). Tel que mentionné précédemment, les embryons mutants zygotiques *gir*<sup>2</sup> sont viables au stade embryonnaire et présentent un phénotype sauvage (figure 4.4 A, A' et D). Lorsque l'on combine les mutations *crb*<sup>87-2</sup> et *gir*<sup>2</sup>, on observe une amélioration de l'intégrité épithéliale par rapport au phénotype du simple mutant *crb*<sup>87-2</sup>. En effet, les embryons conservent une architecture épithéliale plus intègre comme on le voit en préparation de cuticule où il y a restauration du crochet buccal et disparition des grains de cuticule, ainsi qu'en vue latérale de l'ectoderme ventral à différents stades de l'embryogenèse (figure 4.4 C, C', F et H). Cette restauration du phénotype induit par une réduction de l'activité de *girdin* dans les mutants *crb*<sup>87-2</sup> indique que les fonctions de *girdin* répriment celles de *crb*.

Suite à cela, nous avons voulu déterminer si l'interaction génétique *crb-girdin* se traduisait par une interaction protéique entre Crb et Girdin. Puisque la protéine Crb est une large protéine associée à la membrane de ~ 2200 acides aminés, l'immunoprécipiter dans les embryons se révèle une tâche complexe. C'est pourquoi nous nous sommes plutôt tournés vers le modèle des cellules S2 pour immunoprécipiter GFP-Crb, une forme de surexpression de Crb. On voit que FLAG-Girdin co-immunoprécipite avec GFP-Crb (figure 4.4 I), suggérant donc que Girdin se lie à Crb ou à ses partenaires. Puisque Crb est phosphorylée par aPKC (Sotillos *et al.*, 2004), nous nous sommes intéressés à l'état de phosphorylation de Crb en présence ou absence de Girdin aux stades de l'embryogenèse 11-13 et 15-17. Suite à une analyse par immunobuvardage et essai phosphatase, on n'observe pas de différence de phosphorylation de Crb entre les embryons contrôles (daG4) et *gir*<sup>2</sup> M/Z mais, curieusement, on observe une augmentation de l'expression de Crb dans les mutants *gir*<sup>2</sup> M/Z (figure 4.4 J). Cette différence d'expression est plus marquée dans les embryons de stades tardifs 15-17. Ces résultats indiquent que Girdin régulerait négativement l'expression de Crb, et possiblement de manière plus spécifique aux stades tardifs de l'embryogenèse.

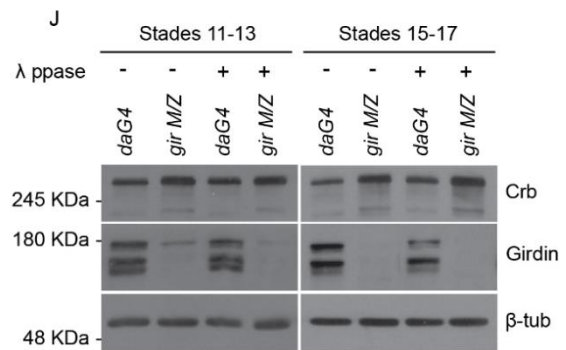
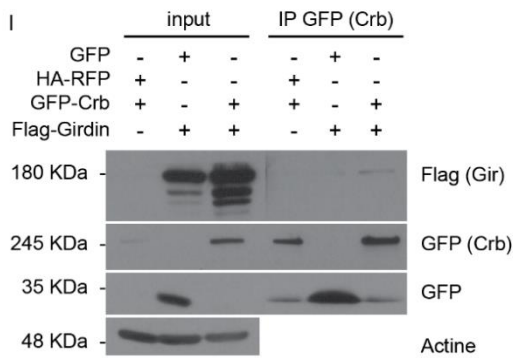
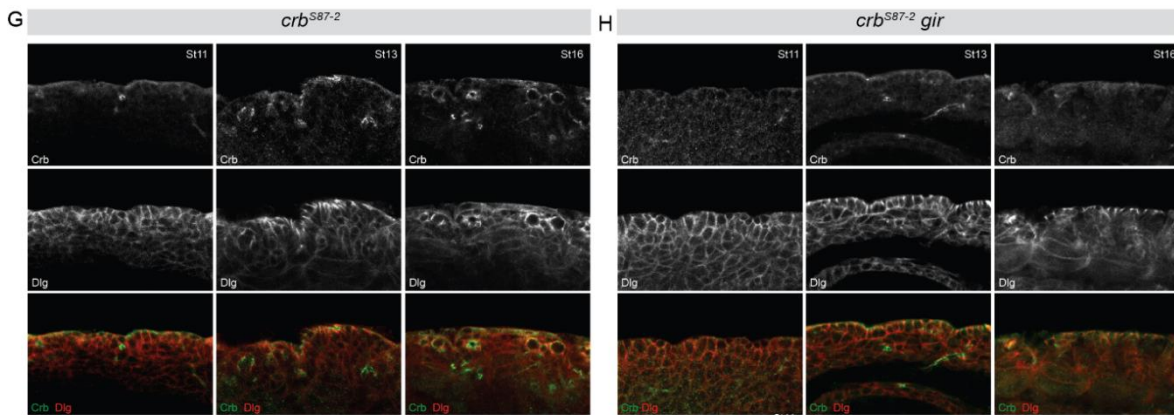
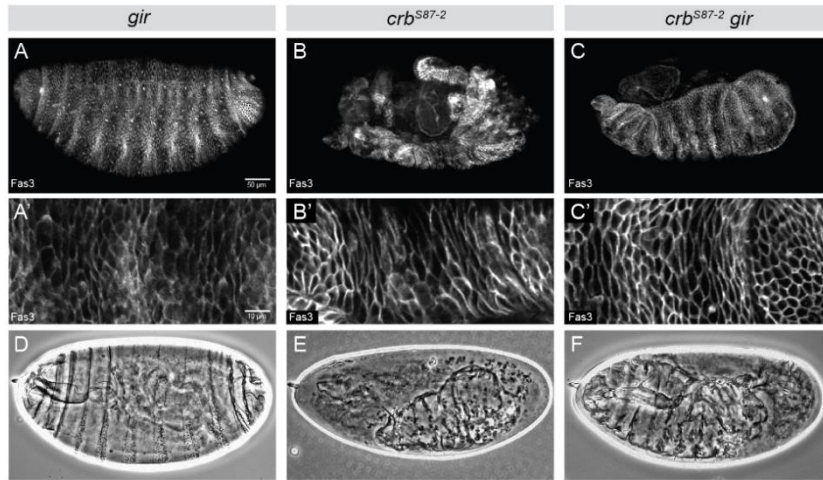


Figure 4.4. **Gir interagit avec Crb pour le réguler négativement.** (A-C) Images d'immunofluorescence en vue de surface sur embryons de stades tardifs de l'embryogenèse (stades 16-17) des génotypes suivants: (A) *gir<sup>2</sup>*, (B) *crb<sup>s87-2</sup>* et (C) *crb<sup>s87-2</sup>, gir<sup>2</sup>* immunomarqués pour Fas-3. (A', B', C') Agrandissement d'une portion ventrale de l'ectoderme des embryons présentés en (A-C) immunomarqués pour Fas-3. (D-F) Préparations de cuticule représentant l'intégrité épithéliale des embryons de génotypes (D) *gir<sup>2</sup>*, (E) *crb<sup>s87-2</sup>* et (F) *crb<sup>s87-2</sup>, gir<sup>2</sup>*. (G-H) Images d'immunofluorescence montrant une vue latérale d'une portion ventrale de l'ectoderme d'embryons immunomarqués pour Crb et Dlg aux stades 11, 13 et 16 de l'embryogenèse, tel qu'indiqué, de génotypes (G) *crb<sup>s87-2</sup>* ou (H) *crb<sup>s87-2</sup>, gir<sup>2</sup>*. (I) La protéine Crb exogène a été immunoprécipitée (IP-GFP) à partir de lysats de cellules S2 ayant été transfectées avec des vecteurs exprimant Flag-Girdin, GFP-Crb ou Flag-Gir, GFP-Crb tel qu'indiqué. L'immunobuvardage avec l'anticorps anti-Flag montre que Flag-Girdin co-précipite avec GFP-Crb. (J) Analyse par immunobuvardage du niveau d'expression de Crb dans des embryons contrôles *daG4* ou mutants maternel-zygotiques *gir<sup>2</sup> M/Z* aux stades 11-13 et 15-17 de l'embryogenèse.

## 4.4 Girdin et Baz

Nous avons vu aux sections 4.2 et 4.3 que Girdin réprime l'activité des déterminants apicaux aPKC et Crb. Comme mentionné précédemment, il a été reporté dans la littérature que Girdin interagit physiquement avec Par3 (l'orthologue de Baz chez les mammifères) (Brajenovic *et al.*, 2004), un membre du module fonctionnel d'aPKC (le module Par), pour permettre une bonne polarisation des fibroblastes en migration (Ohara *et al.*, 2012). Nous avons donc voulu déterminer si l'interaction Girdin-Par3 est conservée chez la drosophile. Pour ce faire, nous avons d'abord déterminé si *girdin* interagit fonctionnellement avec *baz*. Les mutants zygotiques *baz<sup>xi</sup>* meurent au stade embryonnaire et présentent des trous dans l'épiderme/cuticule, probablement dus à une perturbation de la ZA, ainsi que des feuillets de cuticule relativement bien organisés (figure 4.5 A) (Tanentzapf et Tepass, 2003). Les doubles mutants *baz<sup>xi</sup>, gir<sup>2</sup>* entraînent une dégradation plus marquée des tissus épithéliaux que les simples mutants *baz<sup>xi</sup>* comme le démontre l'apparition de quelques grains de cuticule et des feuillets détériorés (figure 4.5 B). Ensuite, pour déterminer si les protéines Girdin et Baz sont liées physiquement, nous avons immunoprécipité Girdin dans des embryons de tous les stades de l'embryogenèse surexprimant Baz (Baz :GFP). Nous observons que Baz co-immunoprécipite avec

Girdin, malgré que l'interaction semble faible ou transitoire (figure 4.5 C). De même, lorsque l'on immunoprécipite GFP-Baz, on co-immunoprécipite faiblement Girdin (figure 4.5 D). Ces résultats suggèrent que *girdin* interagit fonctionnellement avec *baz* et que Girdin se lie à Baz ou ses partenaires durant l'embryogenèse, potentiellement de manière transitoire.

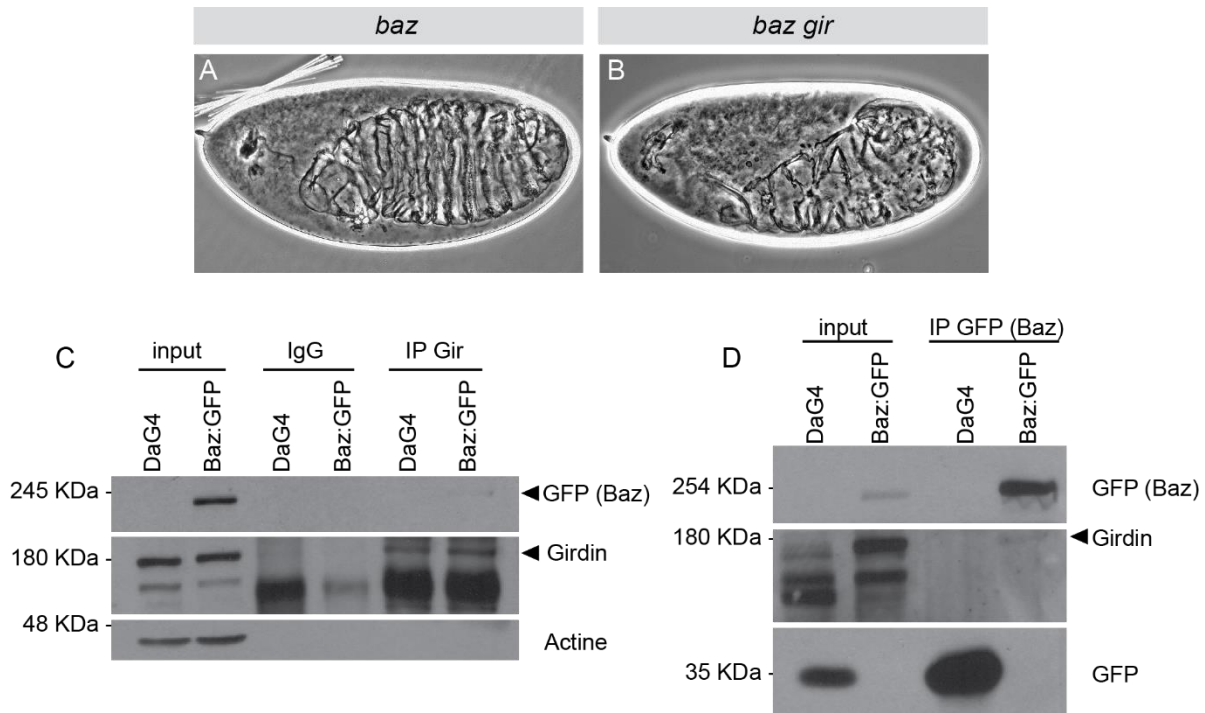


Figure 4.5. **Interaction entre Girdin et Baz.** (A-B) Préparations de cuticule montrant des embryons (A) *baz<sup>xi</sup>* ou (B) *baz<sup>xi</sup>; gir<sup>2</sup>*. (C-D) Analyse de l'interaction entre Girdin et Baz par immunoprécipitation et immunobuvardage à partir de lysats d'embryons contrôles (DaG4) ou surexprimant Baz (Baz:GFP) provenant d'une ponte O/N. (C) La protéine Gir endogène a été immunoprécipitée (IP Gir). Des IgG préimmuns de cochon d'inde, l'espèce hôte de l'anticorps anti-Girdin, ont été utilisés comme contrôle négatif. À noter que la large bande visible dans les IgG et dans l'IP Gir est une bande contaminante. (D) La protéine Baz exogène a été immunoprécipitée (IP GFP).

## Chapitre 5 – Discussion et conclusion

### 5.1 Discussion

#### 5.1.1 Girdin et les déterminants basolatéraux

Nous avons vu au chapitre 3 que la perte partielle de Girdin dans les embryons mutants zygotiques *lgl* suffit à aggraver le phénotype épithélial jusqu'à phénocopier celui des mutants *lgl M/Z*. Cette interaction avait déjà été observée auparavant au laboratoire par des expériences préliminaires de préparation de cuticule (Houssin, E, 2016, p.91) et les résultats du chapitre 3 permettent de confirmer l'interaction et de la caractériser plus en détail. Une observation intrigante est qu'il y a présence de létalité embryonnaire au sein de notre lignée mutante *lgl<sup>Δ</sup>*, alors qu'il a été démontré dans la littérature que les embryons mutants zygotiques *lgl<sup>Δ</sup>* sont viables aux stades embryonnaires et ne présentent une létalité qu'au stade larvaire (Gateff, 1978; Mechler *et al.*, 1985). Ceci constitue une anomalie que nous expliquons par la probable présence d'une mutation spontanée additionnelle délétère s'étant introduite dans notre lignée stock. À noter que cette lignée provenait originalement du *Bloomington Drosophila Stock Center*, et que malgré avoir récupéré une nouvelle version du stock ainsi que son duplicata, nous retrouvons toujours la même anomalie dans ces lignées. C'est pourquoi nous avons entrepris de créer une lignée recombinante entre des mouches *lgl<sup>Δ</sup>* et des mouches *WT* afin de garder la mutation *lgl* mais de se débarrasser de la mutation inconnue non-désirée. Une fois cette lignée recombinante créée, il sera important de valider les résultats présentés à la figure 3.1 avec la nouvelle lignée *lgl<sup>Δ</sup>*. Il est connu que *Lgl* régule l'architecture des tissus épithéliaux de concert avec *Scrib* et *Dlg*, les deux autres éléments du module *Scrib*, comme le montre la forte interaction génétique entre les trois gènes où la perte de chaque membre du groupe engendre les mêmes changements phénotypiques dans les embryons de drosophile (Bilder *et al.*, 2000; Tanentzapf et

Tepass, 2003). Ainsi, il serait intéressant de voir si *girdin* interagit aussi génétiquement avec les autres membres du module. Chez les mammifères, Girdin interagit avec Dlg5 (Tomiyama *et al.*, 2014). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que *girdin* n'interagit pas génétiquement avec *dlg1* en contexte de mutations zygotiques chez la drosophile (Houssin, E, 2016, p.90). Ceci suggère qu'il n'y a pas d'interaction forte comme *girdin-lgl* entre *girdin* et *dlg*. Il serait néanmoins intéressant de tester l'interaction *gir, dlg5* ainsi que de générer des lignées mutantes maternelle-zygotiques *dlg1 M/Z, gir* et *dlg1, gir M/Z*, car la contribution maternelle en Dlg et Girdin est possiblement trop importante pour permettre une aggravation de phénotype en condition de mutations zygotiques. Concernant l'interaction entre *scrib* et *girdin*, la création de la lignée double mutante *scrib, gir* est en cours, donc il sera bientôt possible d'étudier l'interaction génétique via les mutations zygotiques et M/Z. Ces expériences permettront de déterminer si *girdin* contribue aux fonctions du complexe *scrib* en entier ou seulement aux fonctions de *lgl*.

Un autre aspect abordé au chapitre 3 est l'interaction fonctionnelle entre *girdin* et *yrt*, où nous avons démontré que *girdin* agissait en amont de *yrt* dans la même voie génétique pour réguler la polarité. Comme pour l'interaction avec *lgl*, l'interaction *yrt, gir M/Z* avait été précédemment observée au laboratoire par préparation de cuticule (Houssin, E, 2016, p.91), et les résultats du chapitre 3 ont permis de mieux détailler l'interaction ainsi que de déterminer la voie génétique impliquée. De plus, nous avons vu que Girdin se lie à Yrt ou à ses partenaires, mais que l'interaction protéique semble faible ou transitoire. Une technique intéressante pour caractériser des interactions protéiques transitoires est la biotinylation de proximité (BioID). Il s'agit d'une technique basée sur l'utilisation d'une biotine ligase fusionnée à une protéine d'intérêt exprimée dans les cellules, qui va biotinyler de façon non-spécifique les protéines se trouvant à proximité (Roux *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Le BioID n'a encore jamais été utilisée *in vivo* dans des organismes modèles, mais des résultats préliminaires du laboratoire sont encourageants quant



à la possibilité d'utiliser cette approche *in vivo* chez la drosophile. Cette approche serait donc intéressante pour caractériser l'interaction entre Girdin et Yrt.

Un autre élément qui nous permettra de mieux situer Girdin parmi les différents modules basolatéraux sera de déterminer si *girdin* agit dans la même voie que *lgl* ou via une voie parallèle. En effet, nous avons montré que *girdin* interagit fonctionnellement avec *lgl*, mais agit aussi dans la même voie génétique que *yrt*, deux membres de groupes génétiquement et fonctionnellement indépendants les uns des autres (Laprise *et al.*, 2006, 2009). Puisque le groupe Yrt régule la polarité apico-basale de manière séquentielle à Lgl lors de la polarisation des cellules, il est possible que Girdin agisse avec les modules Lgl et Yrt à différents moments de l'embryogenèse, comme il a été démontré pour Baz qui agit initialement avec le module Par, puis s'en dissocie pour réguler la formation des JA. Ainsi, il se pourrait que Girdin agisse dans les voies de Yrt et de Lgl via des voies génétiques parallèles. Il sera important de vérifier où se situe Girdin par rapport à ces régulateurs cruciaux de la polarité en caractérisant l'interaction *girdin-lgl* par la même approche par épistasie que celle utilisée pour caractériser l'interaction *girdin-yrt*. Un obstacle à la réalisation de cet objectif est que *lgl* et *girdin* sont des gènes situés sur des chromosomes différents, rendant la création de lignées doubles mutantes *lgl, gir M/Z* et *lgl M/Z, gir* difficile. Pour contourner cet inconvénient, nous utiliserons la technique présentée précédemment basée sur l'induction d'un *knockdown* maternel par l'expression d'un shRNAi dirigé contre Lgl exprimé durant l'oogenèse grâce à maternel-GAL4. Au cours de ma maîtrise, j'ai pu générer la lignée *matsh-lgl, girdin*, donc il sera aisé dans le futur de tester si la perte de la contribution zygotique de Girdin aggrave le phénotype des embryons sans contribution maternelle de Lgl. Si c'est le cas, cela signifie que Girdin et Lgl agiraient via des voies parallèles, alors que si le phénotype reste le même, Girdin et Lgl agiraient sur la polarité via la même voie génétique. Ce résultat sera d'une grande utilité pour déterminer le mode d'action de Girdin dans la régulation des fonctions de Yrt et Lgl.

Au chapitre 4, nous avons vu qu'une façon par laquelle Girdin pourrait réguler Lgl et Yrt est via la répression de leur phosphorylation. Toutefois, nous avons aussi observé quelques éléments intrigants. Premièrement, Girdin semble réguler la phosphorylation de Lgl plus fortement aux stades tardifs (15-17). Or, Lgl et son module ne sont plus requis dans la maintenance de la polarité épithéliale à partir de la mi-embryogenèse, au moment où le groupe Yrt commence à réguler le domaine basolatéral (Tepass, 2012). Ceci suggère que la phosphorylation de Lgl par aPKC n'est plus essentielle aux stades tardifs de l'embryogenèse. Une façon d'expliquer nos résultats serait que, malgré que les fonctions de Lgl ne soient plus requises aux stades 15-17, la phosphorylation de Lgl par aPKC pourrait toujours jouer un rôle de maintien de l'homéostasie de la cellule en maintenant Lgl au domaine latéral, ou tout simplement jouer un rôle impliquant Lgl dans d'autres processus cellulaires que la polarité. Il se pourrait aussi que Girdin régule la phosphorylation de Lgl via une autre kinase qu'aPKC, puisque nos essais phosphatase ne permettent de mesurer que le niveau total de phosphorylation des protéines. Chez la drosophile, Lgl est aussi un substrat direct des kinases Aurora A et B qui induisent sa relocalisation au cytoplasme lors de la mitose des cellules épithéliales (Wirtz-Peitz *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2015). Pour s'assurer que Girdin régule la phosphorylation de Lgl via aPKC spécifiquement, il serait intéressant d'effectuer des essais kinases *in vitro* avec les protéines Girdin, aPKC et Lgl purifiées et vérifier que le niveau de phosphorylation de Lgl par aPKC varie en fonction de Girdin.

Nous avons également observé que Yrt est plus exprimée dans les mutants *gir M/Z* que dans les embryons contrôles. Ceci soulève des questions par rapport à la relation entre Girdin et Yrt. Une possibilité serait que Girdin soit impliquée dans la dégradation de Yrt ou dans sa régulation négative au niveau transcriptionnel. Puisqu'on observe au chapitre 3 que *girdin* semble supporter les fonctions de *yrt*, il serait possible qu'il y ait d'une boucle de rétroaction négative entre Girdin et aPKC afin d'empêcher une inactivation trop importante de la machinerie apicale. En effet, on retrouve un mécanisme de maintien de l'homéostasie similaire dans le cas de Crb et son rôle de régulation dynamique dans la voie Hippo : Crb recrute Expanded (Ex) à la membrane apicale afin qu'Ex puisse réprimer Yorkie, mais Crb limite aussi

l'activité d'Ex en induisant sa dégradation (Ribeiro *et al.*, 2014). Il serait donc possible qu'on retrouve le même type de fine régulation dynamique entre Yrt et Girdin en réponse aux changements dans la polarité. Ensuite, tel que mentionné précédemment, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de Yrt dans les mutants *gir M/Z*. Afin de déterminer si ceci est dû à un changement de l'activité d'aPKC, il serait intéressant d'utiliser un anticorps récemment obtenu au laboratoire détectant spécifiquement Yrt phosphorylée sur sa sérine 387, soit un site putatif de phosphorylation par aPKC (Gamblin *et al.*, 2014). De plus, tout comme pour Lgl, il sera pertinent d'effectuer des essais kinases *in vitro* avec les protéines Girdin, Yrt et aPKC purifiées afin de déterminer si la phosphorylation de Yrt par aPKC varie en fonction de Girdin.

Suite à ces résultats, plusieurs autres questions restent en suspens. Entre autres, par quels mécanismes Girdin pourrait-elle réguler négativement le niveau de phosphorylation de Yrt et de Lgl? Comme mentionné précédemment, notre hypothèse principale est que Girdin inhiberait directement l'activité d'aPKC. Néanmoins, une autre hypothèse possible serait que Girdin inhibe la phosphorylation de Yrt et Lgl par aPKC en recrutant une phosphatase. Une analyse protéomique des partenaires de Girdin chez les mammifères a identifié que Girdin est en mesure d'interagir avec une sérine/thréonine phosphatase nommée protéine phosphatase 2A (PP2A) (Ota *et al.*, 2013). Il s'agit d'un candidat intéressant puisque PP2A est impliquée dans la suppression de la phosphorylation de Baz par Par-1 qui permet l'exclusion latérale de Baz (Krahn *et al.*, 2009). De plus, la régulation négative d'aPKC par PP2A est requise pour maintenir aPKC au cortex apical des neuroblastes en division asymétrique (Chabu et Doe, 2009). Toutefois, nos résultats préliminaires suggèrent que Girdin n'interagit pas avec PP2A. En effet, nous avons effectué une immunoprécipitation d'HA-PP2A, une forme de surexpression de la protéine phosphatase, et n'avons pas détecté de Girdin endogène co-immunoprécipité (résultats non-présentés). Cependant, cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, et sur des embryons de tous les stades de l'embryogenèse. Il serait intéressant de réaliser cette expérience sur des embryons de stades spécifiques, entre autres les stades 11-13 et 15-17 où on observe une

régulation du niveau de phosphorylation de Yrt et Lgl par Girdin. De plus, il serait pertinent d'étudier la relation entre *girdin* et PP2A par interaction génétique.

### 5.1.2 La polarité, Girdin et les JA

Girdin est connue pour stabiliser l'association du complexe cadhérine-caténine au cytosquelette d'actine chez la drosophile (Houssin *et al.*, 2015), alors que chez les mammifères Girdin module le trafic d'endocytose d'E-Cad (Ichimiya *et al.*, 2015) et est phosphorylée par AMPK pour réguler la stabilité des JS et maintenir la polarité épithéliale lors de stress énergétique (Aznar *et al.*, 2016). Une hypothèse de l'équipe ayant publié l'étude sur Girdin et AMPK est que Girdin se localiserait d'abord aux JS, puis affecterait la polarité épithéliale de manière subséquente à l'assemblage et au maintien de l'intégrité des jonctions intercellulaires (Ghosh, 2017). Ceci est une hypothèse plausible, puisque la régulation du complexe jonctionnel est fortement liée au maintien d'une bonne intégrité de l'épithélium et de l'équilibre apico-basal (Tepass, 2012). Aux chapitres 3 et 4, nous avons vu que *lgl* interagit fortement avec *girdin*, mais pas avec *shg* ni avec  $\alpha$ -*cat*. Ceci indique que les défauts sévères de polarité observés dans les doubles mutants *lgl; girdin* sont spécifiques à Girdin et ne sont pas dû à un rôle général des JA dans la régulation de la polarité via Lgl. Ceci diffère de l'hypothèse suggérée dans l'article de Ghosh, 2017 et indique que, du moins chez la drosophile, la régulation de la polarité épithéliale par Girdin ne serait pas une conséquence de son rôle dans l'intégrité des JA. Au chapitre 3, nous avons aussi observé un lien fonctionnel entre *yrt* et *girdin*. Il serait intéressant de vérifier par la même approche que le rôle de *girdin* au sein de cette voie génétique ne soit pas dû exclusivement à son rôle dans les JA. Il faudrait donc effectuer des interactions génétiques entre *yrt* et *shg* ainsi qu'entre *yrt* et  $\alpha$ -*cat*, puis comparer les phénotypes résultants avec ceux que nous observons entre *yrt* et *girdin*. S'il n'y a pas d'aggravation de phénotype, cela confirmerait davantage notre hypothèse comme quoi Girdin possède des fonctions dans la polarité non-partagées avec DE-Cad et  $\alpha$ -*cat*.

### 5.1.3 Girdin et les déterminants apicaux

Tel que discuté dans la section 5.1.1, plusieurs évidences pointent un rôle pour Girdin comme répresseur d'aPKC. Les résultats des interactions génétiques présentées au chapitre 4 entre *girdin* et *aPKC* nous confortent davantage dans cette hypothèse. En effet, nous démontrons que *girdin* régule négativement les fonctions d'aPKC dans les embryons de drosophile. Afin d'appuyer ce résultat, il serait intéressant d'étudier le phénotype d'une déplétion de Girdin dans des embryons surexprimant aPKC. Selon notre hypothèse, on observerait une aggravation du phénotype. Par contre, puisque le phénotype d'une surexpression d'aPKC dans l'embryon entraîne une sévère surapicalisation, il se pourrait que la perte zygotique de Girdin ne suffise pas à affecter le phénotype. Une autre étape importante à venir serait de vérifier si on retrouve le même type de relation entre Girdin et aPKC dans les cellules mammifères afin de confirmer que le rôle de Girdin comme répresseur d'aPKC est conservé et pertinent chez l'humain. Un article a récemment retenu notre attention en raison du modèle cellulaire employé dans leur étude qui nous a semblé être prometteur pour étudier la relation Girdin-aPKC chez les mammifères. En effet, les auteurs utilisent des cellules épithéliales polarisées MDCK et *normal murine mammary epithelial cells* (NMuMG), en cultures 2D et 3D, surexprimant la protéine aPKC WT et une forme constitutivement active d'aPKC (Archibald *et al.*, 2015). Dans leur modèle, en culture 2D, les cellules normales poussent en une monocouche uniforme typique des épithéliums polarisés, alors que les cellules exprimant une forme constitutivement active d'aPKC montrent un phénotype d'épithélium stratifié. En culture 3D, les structures multicellulaires formées sont plus de deux fois plus larges en condition de suractivité d'aPKC que les structures contrôles (Archibald *et al.*, 2015). De plus, la perte des structures de lumen et de la polarité apico-basale sont des caractéristiques de cellules transformées dans le développement des cancers, et le gain de fonction d'aPKC entraîne justement ce type de défauts (Archibald *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'une perte ou

d'une surexpression de Girdin dans leur modèle de surexpression d'aPKC en cultures 2D et 3D. Selon notre hypothèse, la surexpression de Girdin supprimerait les phénotypes de surexpression d'aPKC, soit la formation de multicouches stratifiées en culture 2D et l'augmentation de la taille et la perte des structures de lumen ainsi que la perte de la polarité apico-basale en culture 3D. De même, nous pensons que la perte de Girdin entraînerait l'inverse, c'est-à-dire une aggravation de ces phénotypes.

Nous avons ensuite vu au chapitre 4 que *girdin* réprime les fonctions de *crb* et que Girdin réprime l'expression de Crb dans les embryons de drosophile. De plus, nous avons montré que Crb pourrait interagir physiquement avec Girdin dans les cellules S2. Nous pensons que Girdin agit principalement sur aPKC, ce qui favoriserait l'activité de Yrt et Lgl qui eux sont des répresseurs de Crb. De plus, puisqu'il existe un lien fonctionnel entre *crb* et *aPKC*, Girdin pourrait, en inhibant aPKC, empêcher l'interaction aPKC-Crb et réprimer Crb. Puisque nous voyons une interaction physique entre Girdin et Crb dans les cellules S2 et qu'on observe une interaction physique entre Yrt et Girdin dans les embryons de stades 11-13 et 15-17 (chapitre 3), une autre possibilité serait que Girdin soit un partenaire de Yrt. De cette façon, Girdin serait liée à Yrt à partir de la mi-embryogenèse et serait recrutée au domaine apical avec Yrt pour se lier à Crb et inhiber ses fonctions dans la croissance membranaire apicale. De plus, nous avons démontré au chapitre 4 que Girdin inhibe l'expression de Crb, possiblement via l'induction de sa dégradation. Crb est recyclée via le rétomère, une machinerie du trafic vésiculaire conservée au cours de l'évolution qui module le tri des protéines et leur transport vers le Golgi (Cullen et Korswagen, 2011; Pocha *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la régulation du niveau de Crb à la surface cellulaire dans le maintien de la polarité épithéliale (Pocha et Knust, 2013). Le niveau de Crb est régulé par la balance entre la stabilisation de Crb à la membrane et l'endocytose de Crb qui entraîne son recyclage et/ou sa dégradation (Lin *et al.*, 2015; Perez-Mockus *et al.*, 2017). Nous avons vu dans l'introduction que Girdin est impliquée dans la régulation de l'endocytose en interagissant avec la dynamine 2, ce qui lui permet entre autres de contrôler la formation du manteau de clathrine (Simpson *et*

*al.*, 2005; Weng *et al.*, 2014). D'autre part, des résultats préliminaires du laboratoire suggèrent que Yrt pourrait réguler négativement l'activité membranaire de Crb en induisant son internalisation et sa dégradation. Ainsi, puisque Girdin interagit avec la dynamine 2 (Simpson *et al.*, 2005), se lie à Yrt et à Crb, réprime l'expression de Crb et agit dans la même voie génétique que *yrt*, il serait possible que Girdin contribue à l'internalisation de Crb de concert avec Yrt. Puisque Sdt stabilise Crb à la membrane et est impliquée dans son endocytose en empêchant la liaison du complexe *Adaptor protein 2* (AP-2) par interaction compétitive à Crb (Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2015), il serait intéressant d'effectuer des interactions génétiques et d'épistasie entre *girdin* et *sdt*, puis entre *girdin* et *patj* qui contribue aussi à la stabilisation de Crb. Ces expériences combinées à des expériences de co-immunoprécipitation permettraient de déterminer si Girdin agit sur Crb via les autres membres de son module ou non, ce qui suggérerait que Girdin agit sur Crb plutôt via Yrt et possiblement aPKC.

Finalement, nous avons vu au chapitre 4 que *girdin* interagit fonctionnellement avec *baz*, et que Girdin et Baz pourraient être liées physiquement. Puisque Baz fait partie du module Par avec aPKC et Par6, et que nous avons montré que Girdin régule négativement les fonctions d'aPKC, ce résultat soulève plusieurs interrogations. En effet, il semble que Girdin régulerait positivement Baz mais négativement aPKC et donc que Girdin régule ces deux déterminants apicaux à différents moments de l'embryogenèse. Quelques études nous permettent déjà de faire un lien entre Girdin, aPKC et Baz. Tout d'abord, un lien intéressant entre ces trois protéines chez les mammifères est qu'elles interagissent toutes avec CLASP2, une protéine impliquée dans la dynamique des microtubules (Ota *et al.*, 2013; Matsui *et al.*, 2015). Pour Girdin, le rôle précis de son interaction avec CLASP2 n'a pas encore été bien défini, alors que pour Par3 et aPKC, il a été montré que leur liaison à CLASP2 leur permet de réguler l'organisation du Golgi, un mécanisme moléculaire par lequel ces protéines pourraient réguler la polarité cellulaire (Ota *et al.*, 2013; Matsui *et al.*, 2015). Une possibilité serait donc que Girdin régule l'organisation du Golgi en régulant le complexe CLASP2-Par3/aPKC pour assurer la polarisation des cellules épithéliales. De plus, tel que mentionné dans l'introduction, une autre étude

a montré que Par3 et aPKC induisent fortement l'expression de Girdin par sa régulation transcriptionnelle, et que Girdin se lie à Par3 chez les mammifères pour induire la formation des JS, l'organisation du cytosquelette d'actine et le développement de la membrane apicale durant la morphogenèse épithéliale (Sasaki *et al.*, 2015). Comme nous l'avons aussi vu dans l'introduction, Baz interagit avec aPKC et Par6 pour permettre le recrutement initial de Par6/aPKC à la membrane apicale (Harris et Peifer, 2005; Horikoshi *et al.*, 2009). Baz est ensuite dissociée de Par6/aPKC pour aller se positionner aux JA et recruter le complexe cadhérine-caténine (Harris et Peifer, 2005; Horikoshi *et al.*, 2009; McCaffrey et Macara, 2009; Morais-De-Sá, Mirouse et Johnston, 2010; Walther et Pichaud, 2010). Puisque Girdin réprime les fonctions d'aPKC et semble agir de concert avec Baz en s'y liant (cette étude; Sasaki *et al.*, 2015), et que Girdin est connue pour stabiliser les JA (Houssin *et al.*, 2015), il serait possible que, lorsque Baz est liée à aPKC, le module Baz/aPKC/Par6 régule positivement la transcription de Girdin. Une fois Baz phosphorylée par aPKC, dissociée du module Par et positionnée aux JA, elle coopérerait avec Girdin pour former les JA et réguler le cytosquelette d'actine. Girdin aurait donc deux rôles opposés vis-à-vis Baz c'est-à-dire qu'elle réprimerait Baz lorsque Baz est liée à aPKC au sein du module Par, mais agirait de concert avec Baz aux JA. Ceci emmène une autre question à savoir pourquoi aPKC régulerait positivement l'expression de Girdin alors que Girdin réprime les fonctions d'aPKC. En effet, les déterminants basolatéraux sont classiquement régulés négativement par les déterminants apicaux selon le principe de l'antagonisme mutuel qui maintien l'équilibre apico-basal. De plus, nos résultats ne concordent pas avec l'article qui démontre que l'expression de Girdin est induite par aPKC/Par3 (Sasaki *et al.*, 2015). Si aPKC activait l'expression de son propre répresseur Girdin, l'inhibition d'aPKC par les déterminants basolatéraux entraînerait une diminution de l'expression de Girdin et ainsi une diminution de la répression d'aPKC. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la complexité de la dynamique entre les régulateurs de la polarité épithéliale. Par exemple, puisqu'aPKC et Par3 sont impliquées dans la formation des JA (Tepass, 2012), elles pourraient réguler positivement l'expression de Girdin afin d'augmenter le pool de Girdin spécifiquement aux jonctions sans



affecter le réseau de la polarité. C'est pourquoi, de manière plus concordante avec les résultats que nous avons vu aux chapitres 3 et 4, nous proposons plutôt que Girdin et aPKC seraient impliquées dans une boucle de rétrocontrôle négative où aPKC inhiberait Girdin et vice-versa.

## 5.2 Perspectives

La principale perspective à long terme de ce projet sera de caractériser par quels mécanismes Girdin régule aPKC et la polarité épithéliale. Au laboratoire, des résultats préliminaires d'une analyse de Girdin par spectrométrie de masse indiquent que Dishevelled (Dsh) serait un partenaire de liaison de Girdin chez la drosophile. Dvl, ou Dsh chez la drosophile est une protéine cruciale dans l'activation de tous les types de voies Wnt. En effet, la voie Wnt chez les mammifères ou Wingless (Wg) chez la drosophile, peut être divisée en deux types de voies conservées au cours de l'évolution: la voie canonique, qui est dépendante de la  $\beta$ -Cat/Arm, ou la voie non-canonique qui est indépendante de  $\beta$ -Cat/Arm (Bejsovec, 2013; Krishnamurthy et Kurzrockab, 2018). Dans la voie Wnt canonique, la signalisation Wnt est activée par la liaison des protéines Wnt aux récepteurs de surface composés de *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP-5/6) et des protéines transmembranaires Frizzled. Cette liaison va entraîner l'activation de la protéine cytoplasmique Dvl/Dsh, entraînant le recrutement au récepteur du « complexe de destruction de  $\beta$ -Cat/Arm » contenant la kinase GSK3- $\beta$  (*Zeste white 3* (Zw3) chez la drosophile) qui, sans Wnt, phosphoryle  $\beta$ -Cat/Arm cytosolique et mène à sa dégradation (Nakamura *et al.*, 1998; Wu et Pan, 2010). Suite à l'activation de Dvl, la séquestration de GSK3- $\beta$  cytosolique au récepteur entraîne l'accumulation de  $\beta$ -Cat non-phosphorylée dans le cytoplasme qui va ensuite migrer au noyau et permettre la transcription des gènes cibles de ses partenaires nucléaires (Krishnamurthy et Kurzrockab, 2018). Concernant la Wnt non-canonique, une voie majeure est la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) (Macdonald *et al.*, 2009). La voie PCP a d'abord été découverte chez la drosophile où elle contrôle l'orientation des denticules en relation avec les cellules voisines (Gubb and García-Bellido, 1982). En effet, l'expression du

gène *wg* est restreinte aux segments de cellules épidermales ne contenant pas de denticules. (Baker, 1988). Cette voie est initiée par l'interaction de Wnt/Wg avec les récepteurs Frizzled, ce qui induit l'activation de Dvl/Dsh (Kohn et Moon, 2005), et par conséquent active les petites protéines G RhoA et Rac1 pour réguler la polarité des feuilletts épithéliaux sur l'axe perpendiculaire à l'axe apico-basal (Miles *et al.*, 2017).

Comme nous l'avons vu au Chapitre 1, il existe 3 protéines dans la famille Girdin chez l'humain dont Daple, qui se lie à Dvl pour réguler négativement la voie Wnt canonique, une voie importante pour le développement embryonnaire (Oshita *et al.*, 2003). De plus, Daple peut initier la voie Wnt non-canonique. Pour ce faire, Daple induit l'association entre Dvl et aPKC $\lambda$ , ce qui promeut l'activation de Rac1 et la migration cellulaire (Ishida-Takagishi *et al.*, 2012). Des études ont montré que les souris dépourvues en Girdin survivent à l'embryogenèse (Kitamura *et al.*, 2008), alors que chez la drosophile, les mutants *gir M/Z* sont létaux au stade embryonnaire (Houssin *et al.*, 2015). Ceci suggère qu'il existe une certaine redondance fonctionnelle entre les trois paralogues mammifères. D'ailleurs, le domaine de liaison à Dvl de Daple (GCV) est conservé chez la protéine Girdin de drosophile, qui est le seul orthologue pour l'ensemble de la famille Girdin des mammifères. Nous pensons donc que Girdin peut moduler la polarité épithéliale en modulant la voie Wg chez la drosophile via une interaction avec Dsh.

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une voie Wnt non-canonique qui implique plusieurs composants de la polarité apico-basale. Plus précisément, aPKC régule et est régulée par Gsk3- $\beta$ /Zw3 et Dvl/Dsh (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005a; Schlessinger *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Colosimo *et al.*, 2010). Chez la drosophile, aPKC et Scrib sont liées à la PCP (Djiane *et al.*, 2005; Courbard *et al.*, 2009), et Lgl s'associe avec Dsh, puis régule la localisation des jonctions et la PCP de l'épiderme embryonnaire chez la drosophile de manière dépendante de Dsh et de la myosine (Kaplan and Tolwinski, 2010), un processus régulé par la voie Wnt-Frizzled-Dvl dans les vertébrés (Dollar *et al.*, 2005; Na *et al.*, 2007; Yamanaka et Nishida, 2007). Ainsi, la voie Wg/Wnt peut affecter la

polarité des cellules à la fois via des effets sur les composantes apico-basales et sur les jonctions.

Chez les embryons de drosophile, l'inhibition de la voie Wg canonique engendre un phénotype de cuticule caractéristique où la cuticule ventrale perd le patron de segmentation des denticules alors que la suractivation de la voie entraîne une cuticule nue, c'est-à-dire dépourvue de denticules (Swarup et Verheyen, 2012). Par exemple, en absence de Zw3, la voie Wg est suractivée et engendre une cuticule nue avec la perte complète des denticules (Hatini et DiNardo, 2001; Kaplan *et al.*, 2009), similaire à ce qu'on peut observer dans les mutants *gir M/Z* (Houssin, E, 2016, p.84-85). Ceci suggère que Girdin pourrait inhiber la voie Wnt canonique ou activer la voie non-canonique comme c'est le cas pour Daple chez les mammifères (Oshita *et al.*, 2003; Aznar *et al.*, 2015, 2017). Une étude nous a particulièrement intéressés, car elle aborde la voie Wg chez la drosophile via une approche par interactions génétiques (Kaplan *et al.*, 2009). De manière intéressante, les auteurs montrent que des embryons doubles mutants *arm M/Z; lgl* miment le phénotype *lgl M/Z* (Kaplan *et al.*, 2009), ce qui s'apparente à ce que nous avons vu au chapitre 3 comme interaction entre *girdin* et *lgl*. Arm est impliquée aux JA avec  $\alpha$ -Cat et DE-Cad, mais comme nous l'avons vu,  $\alpha$ -cat et *shg* n'interagissent pas avec *lgl*. Ainsi, cette étude nous amène à penser qu'Arm et Girdin auraient un rôle à part d' $\alpha$ -Cat et de DE-Cad en lien avec les fonctions de Lgl. Une possibilité est que ce rôle soit via la voie Wnt/Wg. D'ailleurs, dans la même étude, les auteurs montrent que le phénotype des doubles mutants *zw3 M/Z; lgl*, mime le phénotype *lgl M/Z*, indiquant que la perte de la kinase *zw3* aggrave le phénotype *lgl* possiblement via une augmentation du niveau d'aPKC (Kaplan *et al.*, 2009), puisqu'il a été montré que Zw3 phosphoryle directement aPKC, ce qui régule négativement le niveau d'aPKC (Colosimo *et al.*, 2009). Il est connu que Dsh interagit avec aPKC et l'active (Zhang *et al.*, 2007). Girdin pourrait donc possiblement interagir avec Dsh afin de l'inhiber, ce qui favoriserait l'activité de Zw3 qui régule négativement aPKC et expliquerait à la fois le phénotype de cuticule nue observée dans les mutants Girdin ainsi que la similitude des phénotypes observés par interactions génétiques entre *zw3-lgl* et *girdin-lgl*. Ainsi, Girdin pourrait possiblement agir de pair avec Zw3 via la régulation négative

de Dsh. Pour tester cette hypothèse, il serait pertinent d'effectuer des interactions génétiques entre *girdin* et *dsh* ainsi qu'entre *girdin-zw3* et *girdin-arm*. De plus, puisqu'il a été montré que la combinaison de la perte de Zw3 avec la suractivation d'aPKC mène à l'expansion apicale classique du phénotype mutant *lgl M/Z* (Colosimo *et al.*, 2009), il serait intéressant de tester si la perte de Girdin combinée à la suractivation d'aPKC entraîne le même phénotype *lgl M/Z*, ce qui suggérerait que *girdin* agit fonctionnellement avec *zw3*.

## 5.3 Conclusion

Le but de cette étude était d'explorer, grâce à l'exploitation du modèle de la drosophile, le lien possible entre la protéine Girdin et la polarité apico-basale des cellules épithéliales au cours du développement embryonnaire. Nous avons postulé que Girdin régule le réseau génétique et protéique orchestrant la polarité épithéliale. Le premier objectif de ce projet était de caractériser la relation entre Girdin et les principaux régulateurs de la polarité épithéliale chez la drosophile. Nous avons montré que *girdin* supporte les fonctions de *lgl* et de *yrt*, que *girdin* agit en amont de *yrt* dans la même voie génétique, puis que la protéine Girdin se lie à Yrt ou ses partenaires au cours de l'embryogenèse. La seconde partie du projet visait à préciser par quels mécanismes Girdin régule les déterminants basolatéraux et la polarité épithéliale. Nous avons pu observer que Girdin régule la polarité via des fonctions en partie indépendantes de celles l'impliquant dans la stabilisation des JA. De plus, nous avons montré que Girdin/*girdin* régule négativement le niveau de phosphorylation de Yrt et Lgl, deux substrats d'aPKC, ainsi que l'activité des régulateurs du domaine apical aPKC et Crb. D'autre part, Girdin interagit avec Baz, un déterminant apical essentiel à la formation des JA. Notre étude est donc la première à démontrer un rôle central de Girdin dans le réseau protéique régissant la polarité épithéliale.

### 5.3.1 Modèles proposés

En se basant sur les observations publiées dans la littérature ainsi que sur les résultats présentés dans cette étude, nous proposons un modèle où Girdin agit comme déterminant du domaine basolatéral de la polarité. Nous proposons deux modes de fonctionnement possibles. Tout d'abord, Girdin pourrait se lier directement à aPKC afin de réguler négativement son activité kinase, ce qui entraînerait la réduction de l'activité de Crb et l'augmentation de l'activité des déterminants basolatéraux Lgl et Yrt qui sont régulés négativement par aPKC. En parallèle, Girdin

contribuerait aux fonctions de Baz, possiblement une fois que Baz est dissociée de Par6/aPKC et positionnée aux JA (figure 5.1 A). Une alternative à ce scénario est que Girdin agirait en amont de la voie Yrt, et potentiellement aussi de la voie Lgl en parallèle, afin de contribuer à leurs fonctions d'inhibition des déterminants apicaux Crb et aPKC, tout en agissant avec Baz aux JA (figure 5.1 B).

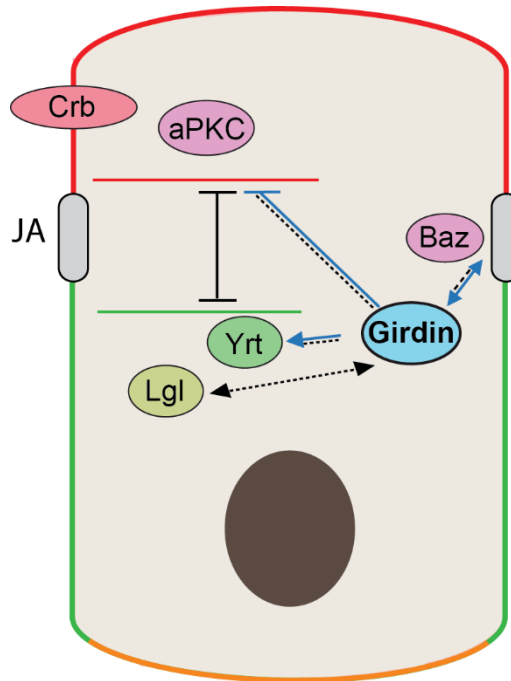


Figure 5.1: **Modèle proposé de Girdin dans la polarité épithéliale.** Nous proposons un modèle où Girdin agit en tant que déterminant basolatéral. Girdin inhiberait les fonctions de Crb et d'aPKC via une association directe à ces protéines et/ou via une association à Yrt et/ou à Lgl, qui inhibent les fonctions d'aPKC et de Crb. En parallèle, Girdin s'associerait à Baz au niveau des JA possible-ment pour contribuer à la stabilisation du complexe cadhérine-caténine. Il est possible que Girdin agisse avec Lgl, Yrt et Baz à différentes périodes du développement embryonnaire. Les lignes pointillées représentent les interactions génétiques et les lignes pleines bleues représentent les interactions physiques montrées dans cette étude.

## Bibliographie

Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2009) 'Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins.', *Molecular and cellular biology*, 29(9), pp. 2372–89.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, S. M., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M., Venter, J. C. and Venter, J. C. (2000) 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.' *Science (New York, N. Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 287(5461), pp. 2185–95.

Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., Sommergruber, W., Schweifer, N., Wernitznig, A., Beug, H., Foisner, R. and Eger, A. (2007) 'The transcription factor ZEB1 ( $\delta$ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators

of epithelial polarity', *Oncogene*, 26(49), pp. 6979–6988

Anai, M., Shojima, N., Katagiri, H., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M., Noguchi, N., Takahashi, S., Takata, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. (2005) 'A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(18), pp. 18525–35.

Antal, C. E., Hudson, A. M., Brognard, J. and Newton, A. C. (2015) 'Cancer-Associated Protein Kinase C Mutations Reveal Kinase's Role as Tumor Suppressor', *Cell*, 160, pp. 489–502.

Archibald, A., Al-Masri, M., Liew-Spilger, A. and McCaffrey, L. (2015) 'Atypical protein kinase C induces cell transformation by disrupting Hippo/Yap signaling', *Molecular Biology of the Cell*, 26(20), pp. 3578–3595.

Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2008) 'Polarity complex proteins.', *Biochimica et biophysica acta*, 1778(3), pp. 614–30.

Aznar, N., Midde, K. K., Dunkel, Y., Lopez-Sanchez, I., Pavlova, Y., Marivin, A., Barba An, J., Murray, F., Nitsche, U., Janssen, K.-P., Willert, K., Goel, A., Abal, M., Garcia-Marcos, M. and Ghosh, P. (2015) 'Daple is a novel non-receptor GEF required for trimeric G protein activation in Wnt signaling', *eLife*, pp. 1–40.

Aznar, N., Patel, A., Rohena, C. C., Dunkel, Y. and Joosen, L. (2016) 'AMP-activated protein kinase fortifies epithelial tight junctions during energetic stress via its effector GIV / Girdin', *eLife*, 5, pp. 1–33.

Aznar, N., Sun, N., Dunkel, Y., Ear, J. and Buschman, M. D. (2017) 'A Daple-Akt feed forward loop enhances non- canonical Wnt signals by compartmentalizing  $\beta$  - Catenin', *Molecular biology of the cell*, 28(24), pp. 1–38.

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E. (2001) 'Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity.', *Nature*, 414(6864), pp. 638–43.

Baker, N. E. (1988) 'Localization of transcripts from the wingless gene in whole Drosophila embryos.', *Development (Cambridge, England)*, 103(2), pp. 289–98.

Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H. J. (1996) 'A Drosophila neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function.', *Cell*, 87(6), pp. 1059–68.

Beas, A. O., Taupin, V., Teodorof, C., Nguyen, L. T., Garcia-Marcos, M. and Farquhar, M. G. (2012) 'Gas promotes EEA1 endosome maturation and shuts down proliferative signaling through interaction with GIV (Girdin)', *Molecular Biology of the Cell*, 23(23), pp. 4623–4634.

Bejsovec, A. (2013) 'Wingless/Wnt signaling in Drosophila: The pattern and the



- pathway', *Molecular Reproduction and Development*, 80(11), pp. 882–894.
- Bell, G. P., Fletcher, G. C., Brain, R. and Thompson, B. J. (2015) 'Aurora Kinases Phosphorylate Lgl to Induce Mitotic Spindle Orientation in Drosophila Epithelia', *Current Biology*, 25(1), pp. 61–68.
- Benton, R. and St Johnston, D. (2003a) 'A conserved oligomerization domain in drosophila Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity.', *Current biology: CB*, 13(15), pp. 1330–4.
- Benton, R. and St Johnston, D. (2003b) 'Drosophila PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells.', *Cell*, 115(6), pp. 691–704.
- Bertocchi, C., Wang, Y., Ravasio, A., Hara, Y., Wu, Y., Sailov, T., Baird, M. A., Davidson, M. W., Zaidel-Bar, R., Toyama, Y., Ladoux, B., Mege, R.-M. and Kanchanawong, P. (2017) 'Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions', *Nature Cell Biology*, 19(1), pp. 28–37.
- Betschinger, J., Mechtler, K. and Knoblich, J. A. (2003) 'The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl', *Nature*, 422(6929), pp. 326–330.
- Bhandari, D., Lopez-Sanchez, I., To, A., Lo, I.-C., Aznar, N., Leyme, A., Gupta, V., Niesman, I., Maddox, A. L., Garcia-Marcos, M., Farquhar, M. G. and Ghosh, P. (2015) 'Cyclin-dependent kinase 5 activates guanine nucleotide exchange factor GIV/Girdin to orchestrate migration–proliferation dichotomy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), pp. E4874–E4883.
- Bilder, D., Li, M. and Perrimon, N. (2000) 'Cooperative Regulation of Cell Polarity and Growth by Drosophila Tumor Suppressors', *Science*, 289(5476), pp. 113–116.
- Bilder, D. and Perrimon, N. (2000) 'Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble', *Nature*, 403(6770), pp. 676–680.
- Brajenovic, M., Joberty, G., Küster, B., Bouwmeester, T. and Drewes, G. (2004) 'Comprehensive Proteomic Analysis of Human Par Protein Complexes Reveals an Interconnected Protein Network', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(13), pp. 12804–12811.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development*, 118, pp. 401–415.
- Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., Nelson, W. J. and Dunn, A. R. (2014) 'The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force', *Science*, 346(6209), p. 1254211.
- Bui, D. A., Lee, W., White, A. E., Harper, J. W., Schackmann, R. C. J., Overholtzer, M., Selfors, L. M. and Brugge, J. S. (2016) 'Cytokinesis involves a nontranscriptional function of the Hippo pathway effector YAP', *Science Signaling*, 9(417), p. ra23-ra23.

Bulgakova, N. A. and Brown, N. H. (2016) 'Drosophila p120-catenin is crucial for endocytosis of the dynamic E-cadherin-Bazooka complex', *Journal of Cell Science*, 129(3), pp. 477–482.

Campbell, H. K., Maiers, J. L. and Demali, K. A. (2017) 'Interplay between tight junctions and adherens junctions', *Experimental Cell Research*, 358, pp. 39–44.

Cao, H., Xu, R., Shi, Q., Zhang, D., Huang, J. and Hong, Y. (2017) 'FERM domain phosphorylation and endogenous 3'UTR are not essential for regulating the function and subcellular localization of polarity protein Crumbs', *Journal of Genetics and Genomics*, 44, pp. 409–412.

Cao, K., Li, J., Zhao, Y., Wang, Q., Zeng, Q., He, S., Yu, L., Zhou, J. and Cao, P. (2016) 'miR-101 Inhibiting Cell Proliferation, Migration and Invasion in Hepatocellular Carcinoma through Downregulating Girdin', *Molecules and Cells*, 39(2), pp. 96–102.

Cao, K., Lu, C., Han, S., Zou, Q., Li, J., Xie, D., He, S., Yu, L., Zhou, J., Peng, X. and Cao, P. (2015) 'Expression of Girdin in primary hepatocellular carcinoma and its effect on cell proliferation and invasion.', *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(1), pp. 551–9.

Chabu, C. and Doe, C. Q. (2009) 'Twins/PP2A regulates aPKC to control neuroblast cell polarity and self-renewal', *Developmental Biology*. Academic Press, 330(2), pp. 399–405.

Chalmers, A. D., Pambos, M., Mason, J., Lang, S., Wylie, C. and Papalopulu, N. (2005) 'aPKC, Crumbs3 and Lgl2 control apicobasal polarity in early vertebrate development.', *Development (Cambridge, England)*, 132(5), pp. 977–86. doi: 10.1242/dev.01645.

Chang, R.-M., Pei, L., Fang, F., Xu, J.-F., Yang, H., Zuo, C.-H., Zhou, J.-H., Luo, G.-Q. and Yang, L.-Y. (2016) 'YMO1 suppresses invasion and metastasis by inhibiting RhoC signaling and predicts favorable prognosis in hepatocellular carcinoma', *Oncotarget*, 7(34), pp. 55585–55600.

Chartier, F. J.-M., Hardy, É. J.-L. and Laprise, P. (2012) 'Crumbs limits oxidase-dependent signaling to maintain epithelial integrity and prevent photoreceptor cell death', *The Journal of Cell Biology*, 198(6), pp. 991–998.

Chen, C.-L., Gajewski, K. M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C. and Halder, G. (2010) 'The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(36), pp. 15810–5.

Choi, J.-S., Kim, K. H., Oh, E., Shin, Y. K., Seo, J., Kim, S.-H., Park, S. and Choi, Y.-L. (2017) 'Girdin protein expression is associated with poor prognosis in patients with invasive breast cancer', *Pathology*, 49(6), pp. 618–626.

Chou, T.-B. and Perrimon, N. (1996) 'The Autosomal FLP-DFS Technique for Generating Germline Mosaics in Drosophila melanogaster', *The Genetics Society of*

*America*, 144, pp. 1673–1679.

Cismowski, M. J., Ma, C., Ribas, C., Xie, X., Spruyt, M., Lizano, J. S., Lanier, S. M. and Duzic, E. (2000) 'Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a ras-related protein. Implications for signal integration.', *The Journal of biological chemistry*, 275(31), pp. 23421–4.

Colosimo, P. F., Liu, X., Kaplan, N. A. and Tolwinski, N. S. (2009) 'GSK3 $\beta$  affects apical-basal polarity and cell-cell adhesion by regulating aPKC levels', *Developmental Dynamics*, 239(1), pp. 115–125.

Colosimo, P. F., Liu, X., Kaplan, N. A. and Tolwinski, N. S. (2010) 'GSK3 $\beta$  affects apical-basal polarity and cell-cell adhesion by regulating aPKC levels', *Developmental Dynamics*, 239(1), pp. 115–125.

Coopman, P. and Djiane, A. (2016) 'Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, pp. 3535–3553.

Courbard, J.-R., Djiane, A., Wu, J. and Mlodzik, M. (2009) 'The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors', *Developmental Biology*, 333(1), pp. 67–77.

Cullen, P. J. and Korswagen, H. C. (2011) 'Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events.', *Nature cell biology*, 14(1), pp. 29–37.

Daimon, T., Kosaka, T., Kikuchi, E., Mikami, S., Miyazaki, Y., Hashimoto, A., Hashimoto, S., Mizuno, R., Miyajima, A., Okada, Y., Sabe, H. and Oya, M. (2017) 'Prognostic significance of erythrocyte protein band 4.1-like5 expression in upper urinary tract urothelial carcinoma', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier, 9, p. 543.e17-543.e24.

Davis, M. A., Ireton, R. C. and Reynolds, A. B. (2003) 'A core function for p120-catenin in cadherin turnover', *The Journal of Cell Biology*, 163(3), pp. 525–534.

Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M. and Tepass, U. (2013) 'Monomeric  $\alpha$ -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 261–273.

Djiane, A., Yogev, S. and Mlodzik, M. (2005) 'The Apical Determinants aPKC and dPatj Regulate Frizzled-Dependent Planar Cell Polarity in the Drosophila Eye', *Cell*, 121(4), pp. 621–631.

Dollar, G. L., Weber, U., Mlodzik, M. and Sokol, S. Y. (2005) 'Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled', *Nature*, 437(7063), pp. 1376–1380.

Dugay, F., Le Goff, X., Rioux-Leclercq, N., Chesnel, F., Jouan, F., Henry, C., Cabillic, F., Verhoest, G., Vigneau, C., Arlot-Bonnemains, Y. and Belaud-Rotureau, M. (2014) 'Overexpression of the polarity protein PAR-3 in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor prognosis', *International Journal of Cancer*, 134(9), pp. 2051–2060.

- Dunkel, Y., Ong, A., Notani, D., Mittal, Y., Lam, M., Mi, X. and Ghosh, P. (2012) 'STAT3 protein up-regulates G $\alpha$ -interacting vesicle-associated protein (GIV)/Girdin expression, and GIV enhances STAT3 activation in a positive feedback loop during wound healing and tumor invasion/metastasis.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(50), pp. 41667–83.
- Ellenbroek, S. I. J., Iden, S. and Collard, J. G. (2012) 'Cell polarity proteins and cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 22, pp. 208–215.
- Elsum, I., Yates, L., Humbert, P. O. and Richardson, H. E. (2012) 'The Scribble-Dlg-Lgl polarity module in development and cancer: from flies to man.', *Essays in biochemistry*. Portland Press Limited, 53, pp. 141–68.
- Enomoto, A., Asai, N., Namba, T., Wang, Y., Kato, T., Tanaka, M., Tatsumi, H., Taya, S., Tsuboi, D., Kuroda, K., Kaneko, N., Sawamoto, K., Miyamoto, R., Jijiwa, M., Murakumo, Y., Sokabe, M., Seki, T., Kaibuchi, K. and Takahashi, M. (2009) 'Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus.', *Neuron*. Elsevier, 63(6), pp. 774–87.
- Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K. and Takahashi, M. (2005) 'Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via girdin/APE', *Developmental Cell*, 9(3), pp. 389–402.
- Enomoto, A., Ping, J. and Takahashi, M. (2006) 'Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1086, pp. 169–184.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003) 'Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity', *Nature*, 421(6924), pp. 753–756.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J.-B., Nicholls, S., Ferenczi, M. A. and Hall, A. (2005) 'Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 170(6), pp. 895–901.
- Franke, W. W. (2009) 'Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1(3), p. a003061.
- Franz, A. and Riechmann, V. (2010) 'Stepwise polarisation of the Drosophila follicular epithelium.', *Developmental biology*, 338(2), pp. 136–47.
- Gamblin, C. L., Hardy, É. J. L., Chartier, F. J. M., Bisson, N. and Laprise, P. (2014) 'A bidirectional antagonism between aPKC and Yurt regulates epithelial cell polarity', *Journal of Cell Biology*, 204(4), pp. 487–495.
- Gandalovičová, A., Vomastek, T., Rosel, D. and Brábek, J. (2016) 'Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness.', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(18), pp. 25022–49.
- Garcia-Marcos, M., Ghosh, P. and Farquhar, M. G. (2009) 'GIV is a nonreceptor

GEF for G alpha i with a unique motif that regulates Akt signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), pp. 3178–3183.

Garcia-Marcos, M., Ghosh, P. and Farquhar, M. G. (2015a) 'GIV/Girdin transmits signals from multiple receptors by triggering trimeric G protein', *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), pp. 6697–6704.

Garcia-Marcos, M., Ghosh, P. and Farquhar, M. G. (2015b) 'GIV/Girdin Transmits Signals from Multiple Receptors by Triggering Trimeric G Protein Activation', *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), pp. 6697–6704.

Garcia-Marcos, M., Jung, B. H., Ear, J., Cabrera, B., Carethers, J. M. and Ghosh, P. (2011) 'Expression of GIV/Girdin, a metastasis-related protein, predicts patient survival in colon cancer', *The FASEB Journal*, 25(2), pp. 590–599.

Garg, R., Benedetti, L. G., Abera, M. B., Wang, H., Abba, M. and Kazanietz, M. G. (2014) 'Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not.', *Oncogene*, 33(45), pp. 5225–37.

Gateff, E. (1978) 'Malignant Neoplasms of Genetic Origin in *Drosophila melanogaster*', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 200(4349), pp. 1448–1459.

Genova, J. L. and Fehon, R. G. (2003) 'Neuroglian, Gliotactin, and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*.', *The Journal of cell biology*, 161(5), pp. 979–89.

Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J. and Baum, B. (2008) 'Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability.', *Current biology : CB*, 18(21), pp. 1631–8.

Ghosh, P. (2017) 'The stress polarity pathway: AMPK "GIV"-es protection against metabolic insults.', *Aging*, 9(2), pp. 303–314.

Ghosh, P., Beas, A. O., Bornheimer, S. J., Garcia-Marcos, M., Forry, E. P., Johansson, C., Ear, J., Jung, B. H., Cabrera, B., Carethers, J. M. and Farquhar, M. G. (2010) 'A Gαi-GIV molecular complex binds epidermal growth factor receptor and determines whether cells migrate or proliferate.', *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 21(13), pp. 2338–54.

Ghosh, P., Garcia-Marcos, M., Bornheimer, S. J. and Farquhar, M. G. (2008) 'Activation of Gα<sub>βγ</sub>3 triggers cell migration via regulation of GIV.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 182(2), pp. 381–93.

Ghosh, P., Garcia-Marcos, M. and Farquhar, M. G. (2011) 'GIV/Girdin is a rheostat that fine-tunes growth factor signals during tumor progression.', *Cell adhesion & migration*, 5(3), pp. 237–48.

Gilman, A. G. (1987) 'G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals', *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), pp. 615–649.

Godt, D. and Tepass, U. (1998) '*Drosophila* oocyte localization is mediated by

differential cadherin-based adhesion', *Nature*. Nature Publishing Group, 395(6700), pp. 387–391.

Goldstein, B. and Macara, I. G. (2007) 'The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization', *Developmental Cell*, 13(5), pp. 609–622.

Gosens, I., Sessa, A., den Hollander, A. I., Letteboer, S. J. F., Belloni, V., Arends, M. L., Le Bivic, A., Cremers, F. P. M., Broccoli, V. and Roepman, R. (2007) 'FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB–MPP5 polarity complex', *Experimental Cell Research*, 313(19), pp. 3959–3970.

Grzeschik, N. A., Parsons, L. M., Allott, M. L., Harvey, K. F. and Richardson, H. E. (2010) 'Lgl, aPKC, and Crumbs Regulate the Salvador/Warts/Hippo Pathway through Two Distinct Mechanisms', *Current Biology*, 20(7), pp. 573–581.

Gschwind, A., Fischer, O. M. and Ullrich, A. (2004) 'The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 4(5), pp. 361–370.

Gu, F., Wang, L., He, J., Liu, X., Zhang, H., Li, W., Fu, L. and Ma, Y. (2014) 'Girdin, an actin-binding protein, is critical for migration, adhesion, and invasion of human glioblastoma cells', *Journal of Neurochemistry*, 131(4), pp. 457–469.

Gubb, D. and García-Bellido, A. (1982) 'A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*.', *Journal of embryology and experimental morphology*, 68, pp. 37–57.

Gunaratne, A. and Di Guglielmo, G. M. (2013) 'Par6 is phosphorylated by aPKC to facilitate EMT', *Cell Adhesion & Migration*, 7(4), pp. 357–361.

Gupta, V., Bhandari, D., Leyme, A., Aznar, N., Midde, K. K., Lo, I.-C., Ear, J., Niesman, I., López-Sánchez, I., Blanco-Canosa, J. B., von Zastrow, M., Garcia-Marcos, M., Farquhar, M. G. and Ghosh, P. (2016) 'GIV/Girdin activates Gai and inhibits Gas via the same motif', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), pp. E5721–E5730.

Ha, A., Polyanovsky, A. and Avidor-Reiss, T. (2015) 'Drosophila hook-related protein (Girdin) is essential for sensory dendrite formation', *Genetics*, 200(4), pp. 1149–1159.

Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M. and Roberts, D. M. (2015) 'Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System', *Genetics*, 201, pp. 815–842.

Harris, K. P. and Tepass, U. (2008) 'Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis.', *The Journal of cell biology*, 183(6), pp. 1129–43.

Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2004) 'Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*.', *The Journal of cell biology*, 167(1), pp. 135–47.

Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2005) 'The positioning and segregation of apical cues

during epithelial polarity establishment in *Drosophila*.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 170(5), pp. 813–23.

Harris, T. J. C. and Peifer, M. (2007) 'aPKC controls microtubule organization to balance adherens junction symmetry and planar polarity during development.', *Developmental cell*, 12(5), pp. 727–38.

Harris, T. J. C. and Tepass, U. (2010) 'Adherens junctions: from molecules to morphogenesis', *Nature Publishing Group*, 11, pp. 502–514.

Hartenstein, V. (1993) *Atlas of Drosophila Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hashimoto, A., Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Onodera, Y., Handa, H., Oikawa, T. and Sabe, H. (2016) 'ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis and drug resistance', *Oncogenesis*, 5(9), p. e259.

Hashimoto, S., Mikami, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Hashimoto, A., Onodera, Y., Furukawa, S., Handa, H., Oikawa, T., Okada, Y., Oya, M. and Sabe, H. (2016) 'Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 10656

Hashimoto, Y., Shindo-Okada, N., Tani, M., Takeuchi, K., Toma, H. and Yokota, J. (1996) 'Identification of genes differentially expressed in association with metastatic potential of K-1735 murine melanoma by messenger RNA differential display.', *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 56(22), pp. 5266–71.

Hatini, V. and DiNardo, S. (2001) 'Divide and conquer: pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis.', *Trends in genetics : TIG*, 17(10), pp. 574–9.

den Hollander, A. I., Davis, J., van der Velde-Visser, S. D., Zonneveld, M. N., Pierrottet, C. O., Koenekoop, R. K., Kellner, U., van den Born, L. I., Heckenlively, J. R., Hoyng, C. B., Handford, P. A., Roepman, R. and Cremers, F. P. M. (2004) 'CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies', *Human Mutation*, 24(5), pp. 355–369.

Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001) '*Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts.', *Nature*, 414(6864), pp. 634–8.

Hoover, K. B. and Bryant, P. J. (2002) '*Drosophila* Yurt is a new protein-4.1-like protein required for epithelial morphogenesis.', *Development genes and evolution*, 212(5), pp. 230–8.

Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., Yonemura, S. and Ohno, S. (2009) 'Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells.', *Journal of cell science*, 122(Pt 10), pp. 1595–606.

Houssin, E. (2016). 'Implication de la protéine Girdin dans la régulation des jonctions d'adhérence et de la polarité épithéliale chez *Drosophila melanogaster*', PhD thesis,

Houssin, E., Tepass, U. and Laprise, P. (2015) 'Girdin-mediated interactions between cadherin and the actin cytoskeleton are required for epithelial morphogenesis in *Drosophila*', *Development*, 142(10), pp. 1777–1784.

Hsu, Y.-C., Willoughby, J. J., Christensen, A. K. and Jensen, A. M. (2006) 'Mosaic Eyes is a novel component of the Crumbs complex and negatively regulates photoreceptor apical size.', *Development (Cambridge, England)*, 133(24), pp. 4849–59.

Hu, J.-T., Li, Y., Yu, B., Gao, G.-J., Zhou, T. and Li, S. (2015) 'Girdin/GIV is upregulated by cyclic tension, propagates mechanical signal transduction, and is required for the cellular proliferation and migration of MG-63 cells.', *Biochemical and biophysical research communications*, 464(2), pp. 493–9.

Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M. and Hong, Y. (2009) 'Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), pp. 8284–8289.

Huang, L. and Muthuswamy, S. K. (2010) 'Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators', *Current Opinion in Genetics & Development*, 20, pp. 41–50.

Hull, B. E. and Staehelin, L. A. (1979) 'The terminal web. A reevaluation of its structure and function.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 81(1), pp. 67–82.

van den Hurk, J. A. J. M., Rashbass, P., Roepman, R., Davis, J., Voeselek, K. E. J., Arends, M. L., Zonneveld, M. N., van Roekel, M. H. G., Cameron, K., Rohrschneider, K., Heckenlively, J. R., Koenekoop, R. K., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. M. and den Hollander, A. I. (2005) 'Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis.', *Molecular vision*, 11, pp. 263–73).

Hurov, J. B., Watkins, J. L. and Piwnicka-Worms, H. (2004) 'Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity.', *Current biology: CB*, 14(8), pp. 736–41.

Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M. and Knoblich, J. A. (2004) 'Sequential Roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the Establishment of Epithelial Polarity during *Drosophila* Embryogenesis', 6, pp. 845–854.

Ichimiya, H., Maeda, K., Enomoto, A., Weng, L., Takahashi, M. and Murohara, T. (2015) 'Girdin/GIV regulates transendothelial permeability by controlling VE-cadherin trafficking through the small GTPase, R-Ras', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2), pp. 260–267.

Ishida-Takagishi, M., Enomoto, A., Asai, N., Ushida, K., Watanabe, T., Hashimoto,



T., Kato, T., Weng, L., Matsumoto, S., Asai, M., Murakumo, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. and Takahashi, M. (2012) 'The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 3, p. 859.

Ishidate, T., Matsumine, A., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (2000) 'The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase', *Oncogene*, 19(3), pp. 365–372.

Izaddoost, S., Nam, S.-C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K.-W. (2002) 'Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres.', *Nature*, 416(6877), pp. 178–83.

Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K. J. and Ohno, S. (1998) 'An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3.', *The Journal of cell biology*, 143(1), pp. 95–106.

Jan, Y.-J., Ko, B.-S., Liu, T.-A., Wu, Y.-M., Liang, S.-M., Chen, S.-C., Wang, J. and Liou, J.-Y. (2013) 'Expression of Partitioning Defective 3 (Par-3) for Predicting Extrahepatic Metastasis and Survival with Hepatocellular Carcinoma', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), pp. 1684–1697.

Jiang, P., Cui, S.-P., Ren, Y.-L., Mao, J.-Z., Liu, H.-J., Tian, Y., Liu, J.-Y., Du, J., Hou, L. and Zhang, B. (2013) 'Girdin correlated with autophagy in invasive ductal breast carcinomas', *Tumori*. Il Pensiero Scientifico Editore, 99(4), pp. 530–534.

Jiang, P., Enomoto, A., Jijiwa, M., Kato, T., Hasegawa, T., Ishida, M., Sato, T., Asai, N., Murakumo, Y. and Takahashi, M. (2008) 'An actin-binding protein girdin regulates the motility of breast cancer cells', *Cancer Research*, 68(5), pp. 1310–1318.

Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. and Macara, I. G. (2000) 'The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42.', *Nature cell biology*, 2(8), pp. 531–9.

Johnston, D. S. (2002) 'the Art and Design of Genetic Screens: *Drosophila Melanogaster*', *Nature*, 3(March), pp. 176–188.

Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1420–1428.

Kaplan, N. A., Liu, X. and Tolwinski, N. S. (2009) 'Epithelial polarity: Interactions between junctions and apical-basal machinery', *Genetics*, 183(3), pp. 897–904.

Kaplan, N. A. and Tolwinski, N. S. (2010) 'Spatially defined Dsh–Lgl interaction contributes to directional tissue morphogenesis', *Journal of Cell Science*, 123, pp. 3157–3165.

Karp, C. M., Tan, T. T., Mathew, R., Nelson, D., Mukherjee, C., Degenhardt, K., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2008) 'Role of the Polarity Determinant Crumbs in Suppressing Mammalian Epithelial Tumor Progression', *Cancer*

*Research*, 68(11), pp. 4105–4115.

Ke, Y., Bao, T., Zhou, Q., Wang, Y., Ge, J., Fu, B., Wu, X., Tang, H. and Shi, Z. (2017) 'Discs large homolog 5 decreases formation and function of invadopodia in human hepatocellular carcinoma via Girdin and Tks5', *International Journal of Cancer*, 141(2), pp. 364-376.

Kemler, R. (1993) 'From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.', *Trends in genetics : TIG*, 9(9), pp. 317–21.

Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Kc, B., Roux, K. H., Motamedchaboki, K. and Roux, K. J. (2016) 'An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling.', *Molecular biology of the cell*, 27(8), pp. 1188–96.

Kitaichi, T., Yasui, K., Gen, Y., Dohi, O., Iwai, N., Tomie, A., Yamada, N., Terasaki, K., Umemura, A., Nishikawa, T., Yamaguchi, K., Moriguchi, M., Sumida, Y., Mitsuyoshi, H., Naito, Y., Zen, Y. and Itoh, Y. (2017) 'Loss of PAR-3 protein expression is associated with invasion, lymph node metastasis, and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma', *Human Pathology*, 62, pp. 134–140.

Kitamura, T., Asai, N., Enomoto, A., Maeda, K., Kato, T., Ishida, M., Jiang, P., Watanabe, T., Usukura, J., Kondo, T., Costantini, F., Murohara, T. and Takahashi, M. (2008) 'Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin', *Nature Cell Biology* 2008 10:3. Nature Publishing Group, 10(3), p. 329–337.

Klebes, A. and Knust, E. (2000) 'A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*.', *Current biology : CB*, 10(2), pp. 76–85.

Kobayashi, H., Michiue, T., Yukita, A., Danno, H., Sakurai, K., Fukui, A., Kikuchi, A. and Asashima, M. (2005) 'Novel Daple-like protein positively regulates both the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the Wnt/JNK pathway in *Xenopus*', *Mechanisms of Development*, 122(10), pp. 1138–1153.

Koch, L., Feicht, S., Sun, R., Sen, A. and Krahn, M. P. (2016) 'Domain-specific functions of Stardust in *Drosophila* embryonic development', *Royal Society Open Science*, 3(11), p. 160776.

Kohjima, M., Noda, Y., Takeya, R., Saito, N., Takeuchi, K. and Sumimoto, H. (2002) 'PAR3 $\beta$ , a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions.', *Biochemical and biophysical research communications*, 299(4), pp. 641–6.

Kohn, A. D. and Moon, R. T. (2005) 'Wnt and calcium signaling: beta-Catenin-independent pathways', *Cell Calcium*, 38, pp. 439–446.

Kourtidis, A., Lu, R., Pence, L. J. and Anastasiadis, P. Z. (2017) 'A central role for cadherin signaling in cancer', *Experimental Cell Research*, 358, pp. 78–85.

Kowalczyk, A. P. and Nanes, B. A. (2012) 'Adherens Junction Turnover: Regulating Adhesion Through Cadherin Endocytosis, Degradation, and Recycling', *Sub-cellular biochemistry*, 60, pp. 197–222.

Krahn, M. P., Bückers, J., Kastrup, L. and Wodarz, A. (2010) 'Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia', *Journal of Cell Biology*, 190(5), pp. 751–760.

Krahn, M. P., Egger-Adam, D. and Wodarz, A. (2009) 'PP2A Antagonizes Phosphorylation of Bazooka by PAR-1 to Control Apical-Basal Polarity in Dividing Embryonic Neuroblasts', *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 16(6), pp. 901–908.

Krahn, M. P., Klopfenstein, D. R., Fischer, N. and Wodarz, A. (2010) 'Membrane Targeting of Bazooka/PAR-3 Is Mediated by Direct Binding to Phosphoinositide Lipids', *Current Biology*, 20(7), pp. 636–642.

Krishnamurthy, N. and Kurzrock, R. (2018) 'Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors', *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders, 62, pp. 50–60.

Laprise, P. (2011) 'Emerging role for epithelial polarity proteins of the crumbs family as potential tumor suppressors', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., Mcglade, C. J. and Tepass, U. (2006) 'The FERM Protein Yurt Is a Negative Regulatory Component of the Crumbs Complex that Controls Epithelial Polarity and Apical Membrane Size', *Developmental Cell*. Elsevier Inc, 11, pp. 363–374.

Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2009) 'Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins.', *Nature*. Nature Publishing Group, 459(7250), pp. 1141–1145.

Laprise, P. and Tepass, U. (2011) 'Novel insights into epithelial polarity proteins in Drosophila', *Trends in Cell Biology*, 21, pp. 401–408.

Le-Niculescu, H., Niesman, I., Fischer, T., DeVries, L. and Farquhar, M. G. (2005) 'Identification and characterization of GIV, a novel Gai/s- interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles', *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), pp. 22012–22020.

Lee, J. H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S. Y., Karess, R. E., Lee, S.-H., Shong, M., Kim, J.-M., Kim, J. and Chung, J. (2007) 'Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase.', *Nature*, 447(7147), pp. 1017–20.

Legate, K. R., Wickstrom, S. A. and Fassler, R. (2009) 'Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling', *Genes & Development*, 23(4), pp. 397–418.

Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S. and Bellaiche, Y. (2008) 'Drosophila Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis.', *Current biology : CB*, 18(21), pp. 1639–48.

Leyme, A., Marivin, A., Perez-Gutierrez, L., Nguyen, L. T. and Garcia-Marcos, M. (2015) 'Integrins activate trimeric G proteins via the nonreceptor protein GIV/Girdin.', *The Journal of cell biology*, 210(7), pp. 1165–84.

- Li, P., Mao, X., Ren, Y. and Liu, P. (2015) 'Epithelial cell polarity determinant CRB3 in cancer development.', *International journal of biological sciences*. Ivyspring International Publisher, 11(1), pp. 31–7.
- Li, P., Wang, Y., Mao, X., Jiang, Y., Liu, J., Li, J., Wang, J., Wang, R., She, J., Zhang, J., Yang, J., Liu, Y. and Liu, P. (2017) 'CRB3 downregulation confers breast cancer stem cell traits through TAZ/ $\beta$ -catenin', *Oncogenesis*, 6(4), p. e322.
- Liebmann, C. and Böhmer, F. D. (2000) 'Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling.', *Current medicinal chemistry*, 7(9), pp. 911–43.
- Lin, C., Ear, J., Midde, K., Lopez-Sanchez, I., Aznar, N., Garcia-Marcos, M., Kufareva, I., Abagyan, R. and Ghosh, P. (2014) 'Structural basis for activation of trimeric Gi proteins by multiple growth factor receptors via GIV/Girdin.', *Molecular biology of the cell*, 25(22), pp. 3654–71.
- Lin, C., Ear, J., Pavlova, Y., Mittal, Y., Kufareva, I., Ghassemian, M., Abagyan, R., Garcia-Marcos, M. and Ghosh, P. (2011) 'Tyrosine phosphorylation of the G $\alpha$ -interacting protein GIV promotes activation of phosphoinositide 3-kinase during cell migration.', *Science signaling*, 4(192), p. ra64.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T. (2000) 'A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity.', *Nature cell biology*, 2(8), pp. 540–7.
- Lin, Y.-H., Currinn, H., Pocha, S. M., Rothnie, A., Wassmer, T. and Knust, E. (2015) 'AP-2-complex-mediated endocytosis of Drosophila Crumbs regulates polarity by antagonizing Stardust.', *Journal of cell science*, 128(24), pp. 4538–49.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S. and Pan, D. (2010a) 'The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), pp. 10532–10537.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S. and Pan, D. (2010b) 'The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), pp. 10532–7.
- Liu, C., Xue, H., Lu, Y. and Chi, B. (2012) 'Stem cell gene Girdin: a potential early liver metastasis predictor of colorectal cancer', *Molecular Biology Reports*, 39(9), pp. 8717–8722.
- Liu, W. S. and Heckman, C. A. (1998) 'The Sevenfold Way of PKC Regulation', *Cell Signal*, 10(8), pp. 529–542.
- Macdonald, B. T., Tamai, K. and He, X. (2009) 'Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases', *Developmental Cell*, 17, pp. 9–26.
- Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C.-J., Laurinec, S. and Margolis, B. (2003) 'Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated

with Lin-7 (Pals1).', *Gene*, 302(1–2), pp. 21–9.

Mao, J. Z., Jiang, P., Cui, S. P., Ren, Y. L., Zhao, J., Yin, X. H., Enomoto, A., Liu, H. J., Hou, L., Takahashi, M. and Zhang, B. (2012) 'Girdin locates in centrosome and midbody and plays an important role in cell division', *Cancer Science*, 103(10), pp. 1780–1787.

Mao, X., Li, P., Ren, Y., Li, J., Zhou, C., Yang, J. and Liu, P. (2015) 'Cell polarity protein CRB3 is an independent favorable prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma', *International Journal of Oncology*, 46(2), pp. 657–666.

Matsui, T., Watanabe, T., Matsuzawa, K., Kakeno, M., Okumura, N., Sugiyama, I., Itoh, N. and Kaibuchi, K. (2015) 'PAR3 and aPKC regulate Golgi organization through CLASP2 phosphorylation to generate cell polarity', *Molecular Biology of the Cell*, 26(4), pp. 751–761.

Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G. H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1996) 'Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein.', *Science (New York, N.Y.)*, 272(5264), pp. 1020–3.

Matsushita, E., Asai, N., Enomoto, A., Kawamoto, Y., Kato, T., Mii, S., Maeda, K., Shibata, R., Hattori, S., Hagikura, M., Takahashi, K., Sokabe, M., Murakumo, Y., Murohara, T. and Takahashi, M. (2011) 'Protective role of Gipiie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells.', *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 22(6), pp. 736–47.

McCaffrey, L. M. and Macara, I. G. (2009) 'The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis', *Genes & Development*, 23(12), pp. 1450–1460.

McCaffrey, L. M., Montalbano, J., Mihai, C. and Macara, I. G. (2012) 'Loss of the Par3 Polarity Protein Promotes Breast Tumorigenesis and Metastasis', *Cancer Cell*, 22(5), pp. 601–614.

McGill, M. A., McKinley, R. F. A. and Harris, T. J. C. (2009) 'Independent cadherin-catenin and Bazooka clusters interact to assemble adherens junctions.', *The Journal of cell biology*, 185(5), pp. 787–96.

Mechler, B. M., McGinnis, W. and Gehring, W. J. (1985) 'Molecular cloning of lethal(2)giant larvae, a recessive oncogene of Drosophila melanogaster.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 4(6), pp. 1551–7.

Midde, K. K., Aznar, N., Laederich, M. B., Ma, G. S., Kunkel, M. T., Newton, A. C. and Ghosh, P. (2015) 'Multimodular biosensors reveal a novel platform for activation of G proteins by growth factor receptors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(9), pp. E937-46.

Miles, L. B., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y. and Verkade, H. (2017) 'A role for planar cell polarity during early endoderm morphogenesis.', *Biology open*. The Company of

Biologists Ltd, 6(5), pp. 531–539.

Morais-De-Sá, E., Mirouse, V. and Johnston, D. S. (2010) 'aPKC Phosphorylation of Bazooka Defines the Apical/Lateral Border in Drosophila Epithelial Cells', *Cell*, 141, pp. 509–523.

Myster, S. H., Cavallo, R., Anderson, C. T., Fox, D. T. and Peifer, M. (2003) 'Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component.', *The Journal of cell biology*, 160(3), pp. 433–49.

Na, J., Lykke-Andersen, K., Torres Padilla, M. E. and Zernicka-Goetz, M. (2007) 'Dishevelled proteins regulate cell adhesion in mouse blastocyst and serve to monitor changes in Wnt signaling', *Developmental Biology*, 302(1), pp. 40–49.

Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno, S. (2002) 'Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells.', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(11), pp. 1161–71.

Nakamura, T., Hamada, F., Ishidate, T., Anai, K., Kawahara, K., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1998) 'Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level.', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 3(6), pp. 395–403.

Noda, T., Maeda, K., Hayano, S., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M. and Murohara, T. (2015) 'New endoplasmic reticulum stress regulator, gipie, regulates the survival of vascular smooth muscle cells and the neointima formation after vascular injury', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(5), pp. 1246–1253.

Noda, Y., Takeya, R., Ohno, S., Naito, S., Ito, T. and Sumimoto, H. (2001) 'Human homologues of the Caenorhabditis elegans cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C.', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6(2), pp. 107–19.

Nolan, M. E., Aranda, V., Lee, S., Lakshmi, B., Basu, S., Allred, D. C. and Muthuswamy, S. K. (2008) 'The Polarity Protein Par6 Induces Cell Proliferation and Is Overexpressed in Breast Cancer', *Cancer Research*, 68(20), pp. 8201–8209.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. and Takeichi, M. (1994) 'A Drosophila Homolog of Cadherin Associated with Armadillo and Essential for Embryonic Cell-Cell Adhesion', *Developmental Biology*, 165(2), pp. 716–726.

Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1993) 'Identification of a Drosophila homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein.', *The Journal of cell biology*, 121(5), pp. 1133–40.

Ohara, K., Enomoto, A., Kato, T., Hashimoto, T., Isotani-Sakakibara, M., Asai, N., Ishida-Takagishi, M., Weng, L., Nakayama, M., Watanabe, T., Kato, K., Kaibuchi, K., Murakumo, Y., Hirooka, Y., Goto, H. and Takahashi, M. (2012) 'Involvement of Girdin

in the determination of cell polarity during cell migration', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–13.

Ohata, S., Aoki, R., Kinoshita, S., Yamaguchi, M., Tsuruoka-Kinoshita, S., Tanaka, H., Wada, H., Watabe, S., Tsuboi, T., Masai, I. and Okamoto, H. (2011) 'Dual Roles of Notch in Regulation of Apically Restricted Mitosis and Apicobasal Polarity of Neuroepithelial Cells', *Neuron*, 69, pp. 215–230.

OpenStax, Anatomy & Physiology. (2016) Chapter 4. The Tissue Level of Organization. OpenStax CNX.

Oshita, A., Kishida, S., Kobayashi, H., Michiue, T., Asahara, T., Asashima, M. and Kikuchi, A. (2003) 'Identification and characterization of a novel Dvl-binding protein that suppresses Wnt signalling pathway', *Genes to Cells*. Blackwell Science Ltd, 8(12), pp. 1005–1017.

Ota, H., Hikita, T., Nishioka, T., Matsumoto, M., Ito, J., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M., Kaibuchi, K., Sobue, K. and Sawamoto, K. (2013) 'Proteomic analysis of Girdin-interacting proteins in migrating new neurons in the postnatal mouse brain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 442(1–2), pp. 16–21.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y. and Wrana, J. L. (2005a) 'Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF $\beta$  Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity', *Science*, 307(5715), pp. 1603–1609.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y. and Wrana, J. L. (2005b) 'Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF $\beta$  Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity', *Science*, 307(5715), pp. 1603–1609.

Park, J. Y., Hughes, L. J., Moon, U. Y., Park, R., Kim, S.-B., Tran, K., Lee, J.-S., Cho, S.-H. and Kim, S. (2016) 'The apical complex protein Pals1 is required to maintain cerebellar progenitor cells in a proliferative state.', *Development (Cambridge, England)*. Company of Biologists, 143(1), pp. 133–46.

Paul, A., Gunewardena, S., Stecklein, S. R., Saha, B., Parelkar, N., Danley, M., Rajendran, G., Home, P., Ray, S., Jokar, I., Vielhauer, G. A., Jensen, R. A., Tawfik, O. and Paul, S. (2014) 'PKC $\alpha$  signaling promotes triple-negative breast cancer growth and metastasis', *Cell Death and Differentiation*, 21(9), pp. 1469–1481.

Paul, S. M., Ternet, M., Salvaterra, P. M. and Beitel, G. J. (2003) 'The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase is required for septate junction function and epithelial tube-size control in the *Drosophila* tracheal system.', *Development (Cambridge, England)*, 130(20), pp. 4963–74.

Peifer, M. (1993) 'The product of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is part of a multi-protein complex resembling the vertebrate adherens junction.', *Journal of cell science*, 105 (Pt 4), pp. 993–1000.

Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002) 'Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis', *Nature*, 416(6877), pp. 143–149.

Perez-Mockus, G., Roca, V., Mazouni, K. and Schweisguth, F. (2017) 'Neutralized regulates Crumbs endocytosis and epithelium morphogenesis via specific Stardust isoforms.', *The Journal of cell biology*, 216(5), pp. 1405–1420.

Perez-Moreno, M. and Fuchs, E. (2006) 'Catenins: Keeping Cells from Getting Their Signals Crossed', *Developmental Cell*. Cell Press, 11(5), pp. 601–612.

Plant, P. J., Fawcett, J. P., Lin, D. C. C., Holdorf, A. D., Binns, K., Kulkarni, S. and Pawson, T. (2003) 'A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl', *Nature Cell Biology*, 5(4), pp. 301–308.

Pocha, S. M. and Knust, E. (2013) 'Complexities of Crumbs function and regulation in tissue morphogenesis.', *Current biology: CB*. Elsevier, 23(7), pp. R289-93.

Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. and Knust, E. (2011) 'Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs.', *Current biology: CB*, 21(13), pp. 1111–7.

Puseenam, A., Yoshioka, Y., Nagai, R., Hashimoto, R., Suyari, O., Itoh, M., Enomoto, A., Takahashi, M. and Yamaguchi, M. (2009) 'A novel Drosophila Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 315(19), pp. 3370–3380.

Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B. M. and Macara, I. G. (2005) 'The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin', *The Journal of Cell Biology*, 171(6), pp. 1061–1071.

Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. (2001) 'A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster.', *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(6), pp. 1114–25.

Ribeiro, P., Holder, M., Frith, D., Snijders, A. P. and Tapon, N. (2014) 'Crumbs promotes expanded recognition and degradation by the SCF(Slimb/β-TrCP) ubiquitin ligase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(19), pp. E1980-9.

Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y. and Moberg, K. H. (2010) 'Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila via the FERM-domain protein Expanded.', *Current biology: CB*, 20(7), pp. 582–90.

Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C.-J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. and Margolis, B. (2002) 'The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost.', *The Journal of cell biology*, 157(1), pp. 161–72.

Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H.-P., Lee, C.-Y. and Doe, C. Q. (2003) 'Drosophila aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia.', *The Journal of cell biology*, 163(5), pp. 1089–98.

Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K. and Parker,



- P. J. (2010) 'PKC and the control of localized signal dynamics', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), pp. 103–112.
- Roux, K. J., Kim, D. I. and Burke, B. (2013) 'BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions', in *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 19.23.1-19.23.14.
- Van Roy, F. and Berx, G. (2008) 'The cell-cell adhesion molecule E-cadherin Introduction to E-cadherin: Historical overview of its discovery and classic experiments', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, pp. 3756–3788.
- Sarpal, R., Pellikka, M., Patel, R. R., Yan, F., Huì, W., Godt, D., Tepass, U. and Shing, L. K. (2012) 'Mutational analysis supports a core role for Drosophila a-Catenin in adherens junction function', *Journal of Cell Science*, 125(1), pp. 233–245.
- Sasaki, K., Kakuwa, T., Akimoto, K., Koga, H. and Ohno, S. (2015) 'Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-G  $\beta$ 3 signaling', *Journal of Cell Science*, 128(13), pp. 2244–2258.
- Sato, T., Fujita, N., Yamada, A., Ooshio, T., Okamoto, R., Irie, K. and Takai, Y. (2006) 'Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells.', *The Journal of biological chemistry*, 281(8), pp. 5288–99.
- Schimanski, C. C., Schmitz, G., Kashyap, A., Bosserhoff, A. K., Bataille, F., Schäfer, S. C., Lehr, H. A., Berger, M. R., Galle, P. R., Strand, S. and Strand, D. (2005) 'Reduced expression of HUGL-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene Igl, contributes to progression of colorectal cancer', *Oncogene*, 24(19), pp. 3100–3109.
- Schlessinger, K., McManus, E. J. and Hall, A. (2007) 'Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 178(3), pp. 355–61.
- Schneider, I. (1972) 'Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster.', *Journal of embryology and experimental morphology*, 27(2), pp. 353–65.
- Selbie, L. A., Schmitz-Peiffer, C., Sheng, Y. and Biden, T. J. (1993) 'Molecular cloning and characterization of PKC  $\iota$ , an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells.', *The Journal of biological chemistry*, 268(32), pp. 24296–302.
- Shahbazi, M. N., Megias, D., Epifano, C., Akhmanova, A., Gundersen, G. G., Fuchs, E. and Perez-Moreno, M. (2013) 'CLASP2 interacts with p120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions', *The Journal of Cell Biology*, 203(6), pp. 1043–1061.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2017) 'Cancer statistics, 2017', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), pp. 7–30.
- Simões, S. de M., Blankenship, J. T., Weitz, O., Farrell, D. L., Tamada, M.,

Fernandez-Gonzalez, R. and Zallen, J. A. (2010) 'Rho-kinase directs Bazooka/Par-3 planar polarity during *Drosophila* axis elongation.', *Developmental cell*, 19(3), pp. 377–88.

Simpson, F., Martin, S., Evans, T. M., Kerr, M., James, D. E., Parton, R. G., Teasdale, R. D. and Wicking, C. (2005) 'A novel hook-related protein family and the characterization of hook-related protein 1.', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(6), pp. 442–58.

Sotillos, S., Díaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. and Campuzano, S. (2004) 'DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*', *Journal of Cell Biology*, 166(4), pp. 549–557.

Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., Kirchner, T., Behrens, J. and Brabletz, T. (2008) 'The Transcriptional Repressor ZEB1 Promotes Metastasis and Loss of Cell Polarity in Cancer', *Cancer Research*, 68(2), pp. 537–544.

Staller, M. V, Yan, D., Randklev, S., Bragdon, M. D., Wunderlich, Z. B., Tao, R., Perkins, L. A., Depace, A. H. and Perrimon, N. (2013) 'Depleting gene activities in early *Drosophila* embryos with the "maternal-Gal4-shRNA" system.', *Genetics*. Genetics Society of America, 193(1), pp. 51–61.

Strand, D., Raska, I. and Mechler, B. M. (1994) 'The *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein is a component of the cytoskeleton.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 127(5), pp. 1345–60.

Subbaiah, V. K., Narayan, N., Massimi, P. and Banks, L. (2012) 'Regulation of the DLG tumor suppressor by  $\beta$ -catenin.', *International journal of cancer*. Europe PMC Funders, 131(10), pp. 2223–33.

Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T. and Ohno, S. (2001) 'Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures.', *The Journal of cell biology*, 152(6), pp. 1183–96.

Swarup, S. and Verheyen, E. M. (2012) 'Wnt/Wingless Signaling in *Drosophila*', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), pp. a007930–a007930.

Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J. and Ohno, S. (1998) 'Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*.', *Development (Cambridge, England)*, 125(18), pp. 3607–14.

Takagishi, M., Sawada, M., Ohata, S., Kaibuchi, K., Sawamoto, K., Takahashi, M., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, K., Weng, L., Ushida, K., Ara, H. and Matsui, S. (2017) 'Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus', *CellReports*, 20, pp. 960–972.

Takeichi, M. (1991) 'Cadherin Cell Adhesion Receptors as a Morphogenetic

Regulator', *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1451–1455.

Tanentzapf, G. and Tepass, U. (2003) 'Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization', *Nature Cell Biology*, 5, pp. 46–52.

Tepass, U. (1996) 'Crumbs, a Component of the Apical Membrane, Is Required for Zonula Adherens Formation in Primary Epithelia of *Drosophila*', *Developmental Biology*, 177(1), pp. 217–225.

Tepass, U. (2009) 'FERM proteins in animal morphogenesis', *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(4), pp. 357–367.

Tepass, U. (2012) 'The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(July), pp. 655–685.

Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Török, T. and Hartenstein, V. (1996) 'shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia', *Genes and Development*, 10(6), pp. 672–685.

Tepass, U. and Hartenstein, V. (1994) 'The Development of Cellular Junctions in the *Drosophila* Embryo', *Developmental Biology*. Academic Press, 161(2), pp. 563–596.

Tepass, U. and Knust, E. (1990) 'Phenotypic and developmental analysis of mutations at the crumbs locus, a gene required for the development of epithelia in *Drosophila melanogaster*', *Roux's Archives of Developmental Biology*, 199, pp. 189–206.

Tepass, U., Theres, C. and Knust, E. (1990) 'crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia.', *Cell*, 61(5), pp. 787–99.

Thiery, J. P., Aclouque, H., Huang, Y. . R. and Nieto, M. A. (2009) 'Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease', *Cell*, 139, pp. 871–890.

Thompson, E. W. and Newgreen, D. F. (2005) 'Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial- Mesenchymal Transition?', *American Association for Cancer Research*, 65(14), pp. 5991–5995.

Tomiyama, L., Sezaki, T., Matsuo, M., Ueda, K. and Kioka, N. (2014) 'Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation.', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 34(July 2013), pp. 1–9.

Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y. and Takeichi, M. (1996) 'Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo.', *Genes & development*, 10(6), pp. 659–71.

Vermeulen, S., Van Marck, V., Van Hoorde, L., Van Roy, F., Bracke, M. and Mareel,

M. (1996) 'Regulation of the Invasion Suppressor Function of the Cadherin/Catenin Complex', *Pathology - Research and Practice*, 192(7), pp. 694–707.

Vilmos, P. and Kurucz, É. (1998) 'Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system', *Immunology Letters*. Elsevier, 62(2), pp. 59–66.

Walther, R. F. and Pichaud, F. (2010) 'Crumbs/DaPKC-dependent apical exclusion of Bazooka promotes photoreceptor polarity remodeling.', *Current biology: CB*, 20(12), pp. 1065–74.

Wang, J., Cai, Y., Penland, R., Chauhan, S., Miesfeld, R. L. and Ittmann, M. (2006) 'Increased expression of the metastasis-associated gene Ehm2 in prostate cancer', *The Prostate*, 66(15), pp. 1641–1652.

Wang, Y.-C., Khan, Z., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2012) 'Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding', *Nature*, 484(7394), pp. 390–393.

Wang, Y., Kaneko, N., Asai, N., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Kato, T., Asai, M., Murakumo, Y., Ota, H., Hikita, T., Namba, T., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Ming, G., Song, H., Sawamoto, K. and Takahashi, M. (2011) 'Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(22), pp. 8109–22.

Warner, S. J., Yashiro, H. and Longmore, G. D. (2010) 'The Cdc42/Par6/aPKC Polarity Complex Regulates Apoptosis-Induced Compensatory Proliferation in Epithelia', *Current Biology*, 20(8), pp. 677–686.

Watson, R. A., Rollason, T. P., Reynolds, G. M., Murray, P. G., Banks, L. and Roberts, S. (2002) 'Changes in expression of the human homologue of the Drosophila discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias.', *Carcinogenesis*, 23(11), pp. 1791–6.

Wei, S.-Y., Escudero, L. M., Yu, F., Chang, L.-H., Chen, L.-Y., Ho, Y.-H., Lin, C.-M., Chou, C.-S., Chia, W., Modolell, J. and Hsu, J.-C. (2005) 'Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with DE-Cadherin to mediate cell adhesion.', *Developmental cell*, 8(4), pp. 493–504.

Weng, L., Enomoto, A., Ishida-Takagishi, M., Asai, N. and Takahashi, M. (2010) 'Girding for migratory cues: Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis', *Cancer Science*, 101(4), pp. 836–842.

Weng, L., Enomoto, A., Miyoshi, H., Takahashi, K., Asai, N., Morone, N., Jiang, P., An, J., Kato, T., Kuroda, K., Watanabe, T., Asai, M., Ishida-Takagishi, M., Murakumo, Y., Nakashima, H., Kaibuchi, K. and Takahashi, M. (2014) 'Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin.', *The EMBO journal*, 33(18), pp. 1–15.

Whiteman, E. L., Liu, C.-J., Fearon, E. R. and Margolis, B. (2008) 'The transcription

factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes.', *Oncogene*. NIH Public Access, 27(27), pp. 3875–9.

Whitney, D. S., Peterson, F. C., Kittell, A. W., Egner, J. M., Prehoda, K. E. and Volkman, B. F. (2016) 'Binding of Crumbs to the Par-6 CRIB-PDZ Module Is Regulated by Cdc42', *Biochemistry*, 55(10), pp. 1455–1461.

Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T. and Knoblich, J. A. (2008) 'Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization.', *Cell*. Europe PMC Funders, 135(1), pp. 161–73.

Wodarz, A., Grawe, F. and Knust, E. (1993) 'CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during Drosophila epithelial development.', *Mechanisms of development*, 44(2–3), pp. 175–87.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E. (1995) 'Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila.', *Cell*, 82(1), pp. 67–76.

Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E. (2000) 'Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 150(6), pp. 1361–74.

Wu, D. and Pan, W. (2010) 'GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling', *Trends in Biochemical Sciences*, 35, pp. 161–168. doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.002.

Wu, V. M. and Beitel, G. J. (2004) 'A junctional problem of apical proportions: epithelial tube-size control by septate junctions in the Drosophila tracheal system.', *Current opinion in cell biology*, 16(5), pp. 493–9.

Wu, X.-S., Bao, T.-H., Ke, Y., Sun, D.-Y., Shi, Z.-T., Tang, H.-R. and Wang, L. (2016) 'Hint1 suppresses migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro by modulating girdin activity', *Tumor Biology*. Springer Netherlands, 37(11), pp. 14711–14719.

Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D. C. and Muthuswamy, S. K. (2012) 'Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell–cell cohesion', *Nature Cell Biology*, 15(2), pp. 189–200.

Yamaguchi, M., Suyari, O., Nagai, R. and Takahashi, M. (2010) 'dGirdin a new player of Akt /PKB signaling in Drosophila Melanogaster.', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 15, pp. 1164–71.

Yamanaka, H. and Nishida, E. (2007) 'Wnt11 stimulation induces polarized accumulation of Dishevelled at apical adherens junctions through Frizzled7', *Genes to Cells*, 12(8), pp. 961–967.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Izumi, N., Suzuki, A., Mizuno, K. and Ohno, S. (2006) 'Lgl mediates apical domain disassembly by suppressing the PAR-3-aPKC-PAR-6 complex to orient apical membrane polarity.', *Journal of cell science*, 119(Pt 10), pp. 2107–18.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A. and Ohno, S. (2003) 'Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity.', *Current biology : CB*, 13(9), pp. 734–43.

Yao, S., Ireland, S. J., Bee, A., Beesley, C., Forootan, S. S., Dodson, A., Dickinson, T., Gerard, P., Lian, L.-Y., Risk, J. M., Smith, P., Malki, M. I., Ke, Y., Cooper, C. S., Gosden, C. and Foster, C. S. (2012) 'Splice variant PRKC- $\zeta$ -PrC is a novel biomarker of human prostate cancer', *British Journal of Cancer*, 107(2), pp. 388–399.

Yonemura, S. (2011) 'Cadherin–actin interactions at adherens junctions', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 23(5), pp. 515–522.

Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A. and Tsukita, S. (1995) 'Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells', *Journal of Cell Science*, 108, pp. 127–142.

Yu, H., Ye, L., Mansel, R. E., Zhang, Y. and Jiang, W. G. (2010) 'Clinical Implications of the Influence of Ehm2 on the Aggressiveness of Breast Cancer Cells through Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 Expression', *Mol Cancer Res*, 8(11), pp. 1501–12.

Zhan, L., Rosenberg, A., Bergami, K. C., Yu, M., Xuan, Z., Jaffe, A. B., Allred, C. and Muthuswamy, S. K. (2008) 'Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma.', *Cell*, 135(5), pp. 865–78.

Zhang, K., Zhao, H., Ji, Z., Zhang, C., Zhou, P., Wang, L., Chen, Q., Wang, J., Zhang, P., Chen, Z., Zhu, H. H. and Gao, W.-Q. (2016) 'Shp2 promotes metastasis of prostate cancer by attenuating the PAR3/PAR6/aPKC polarity protein complex and enhancing epithelial-to-mesenchymal transition', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 35(10), pp. 1271–1282.

Zhang, L., Li, J., Young, L. H. and Caplan, M. J. (2006) 'AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), pp. 17272–17277.

Zhang, X., Zhu, J., Yang, G.-Y., Wang, Q.-J., Qian, L., Chen, Y.-M., Chen, F., Tao, Y., Hu, H.-S., Wang, T. and Luo, Z.-G. (2007) 'Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C', *Nature Cell Biology*, 9(7), pp. 743–754.

Zheng, B. and Cantley, L. C. (2007) 'Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), pp. 819–22.

Zhou, B., Wu, Y. and Lin, X. (2011) 'Retromer regulates apical-basal polarity through recycling Crumbs.', *Developmental biology*, 360(1), pp. 87–95.

Zhou, Q., Dai, J., Chen, T., Dada, L. A., Zhang, X., Zhang, W., Decamp, M. M., Winn,

R. A., Sznajder, J. I. and Zhou, G. (2017) 'Downregulation of PKC  $\zeta$  / Pard3 / Pard6b is responsible for lung adenocarcinoma cell EMT and invasion', *Cellular Signalling*. Elsevier, 38(June), pp. 49–59.

Zhou, W. and Hong, Y. (2012) 'Drosophila Patj plays a supporting role in apical-basal polarity but is essential for viability.', *Development (Cambridge, England)*, 139(16), pp. 2891–6.

Zhu, J., Shang, Y., Wan, Q., Xia, Y., Chen, J., Du, Q. and Zhang, M. (2014) 'Phosphorylation-dependent interaction between tumor suppressors Dlg and Lgl.', *Cell research*, 24(4), pp. 451-63.

Rapport-Gratuit.com