

Université de Montréal

**dSTRIPAK régule les fonctions catalytiques et non-catalytiques
de la kinase Ste20 Slik**

par

Camille V. De Jamblinne

Programme de Biologie Moléculaire, option Biologie des Systèmes

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor

en Biologie Moléculaire

option Biologie des Systèmes

Décembre, 2020

© Camille V. De Jamblinne, 2020

Résumé

De nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires sont à la base des changements structurels (appelés la morphogenèse) qui ont lieu durant le développement d'un organisme. En effet, le cytosquelette est dynamiquement modifié par des cascades de signalisation intracellulaires contrôlant ainsi la morphogenèse cellulaire durant la division ou l'organisation d'un épithélium. L'homéostasie entre les différents processus morphogénétiques est établie grâce à des échanges de molécules signalisatrices. Le cortex de la cellule, composé de la membrane plasmique et du réseau de protéines du cytosquelette sous-jacent, est responsable d'intégrer les changements de forme cellulaire et d'organiser les éléments structurels requis pour la communication intercellulaire. Donc la composition du cortex cellulaire varie constamment en réponse aux besoins morphogénétiques. Toutefois, les réseaux de signalisation qui contrôlent cette plasticité corticale ne sont pas toujours connus.

Ce travail a identifié une nouvelle voie de signalisation impliquée dans l'organisation du cortex cellulaire. Le laboratoire d'accueil (Dr Carréno) ainsi que celui du Dr Hipfner utilisent la drosophile comme organisme modèle pour l'étude fondamentale de la morphogenèse cellulaire et tissulaire. Le Dr Carréno et le Dr Hipfner avaient précédemment découvert que la kinase Ste20 Slik était responsable d'activer la dMoésine par phosphorylation. Celle-ci lie le cytosquelette à la membrane plasmique. L'activation de la dMoésine par Slik contrôle ainsi la stabilité corticale durant la mitose et l'intégrité épithéliale chez la drosophile. Durant mon projet de recherche, nous avons ensuite mis en évidence que le complexe phosphatase-kinase dSTRIPAK promeut la localisation corticale de Slik afin d'activer la dMoésine à la membrane plasmique. Nous avons également révélé que dSTRIPAK contrôle, tout comme Slik et dMoésine, la morphogenèse mitotique et l'intégrité du tissu épithélial.

D'autre part, le Dr Hipfner avait précédemment constaté que Slik induisait une signalisation de croissance à distance, de façon indépendante de son activité catalytique. Mes recherches ont amené à découvrir que Slik est localisée le long de filopodes spécialisés dans la signalisation à distance, appelés cytonèmes. En outre, nos

résultats révèlent que Slik allonge les cytonèmes, alors que dSTRIPAK est nécessaire à leur biogenèse et fonction de signalisation. Slik et dSTRIPAK contrôlent ainsi la croissance tissulaire au cours du développement embryonnaire de la mouche. Il reste à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des cytonèmes par dSTRIPAK/Slik.

Au final nos recherches ont mené à la découverte que le complexe dSTRIPAK régule les fonctions catalytiques et non-catalytiques de Slik. Nous avons ainsi identifié une nouvelle voie de signalisation contrôlant la morphogénèse cellulaire et tissulaire, par le biais du cytosquelette et de la communication intercellulaire. Ces processus sont essentiels au maintien de l'homéostasie durant l'embryogenèse. Toutefois, l'altération de ces processus morphogénétiques peut causer la tumorigenèse. Notre travail de recherche participe donc potentiellement à l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

Mots-clés : Morphogénèse mitotique, Intégrité épithéliale, Cytonèmes, Cortex cellulaire, Cytosquelette, kinase Sterile20 Slik, STRIPAK, dMoésine/ERM

Abstract

Many cellular and molecular mechanisms are involved in the structural changes (morphogenesis) taking place during embryonic development. Indeed, the cytoskeleton is dynamically modified by intracellular signaling cascades, controlling cell morphogenesis during division or epithelial organization. Signal transduction mechanisms establishes homeostasis during morphogenetic processes. The cell cortex, composed by plasma membrane and underlying cytoskeleton meshwork, is responsible for integrating cell shape changes and organizing structural elements required for intercellular communication. The composition of the cell cortex is thus constantly changing in response to morphogenetic needs. However, the signaling network controlling this cortical plasticity is still unclear.

This work has identified a new signaling pathway involved in cell cortex organization. The laboratories of Dr Carréno and Dr Hipfner use *Drosophila* as a model organism to study cell and tissue morphogenesis. Dr Carréno and Dr Hipfner had previously found that Ste20 Slik kinase was responsible for dMoesin activation by phosphorylation. dMoesin acts as a cross-linker between the cytoskeleton and the plasma membrane. This way, activation of dMoesin by Slik controls cortical stability during mitosis and epithelial integrity in *Drosophila*. This research project found that dSTRIPAK phosphatase activity promotes cortical localization of Slik in order to activate dMoesin at the plasma membrane. In addition, it showed that dSTRIPAK, as Slik and dMoesin, controls mitotic morphogenesis and epithelial tissue integrity.

On top of that, Dr Hipfner has previously shown that Slik induces growth signaling at distance and independently of its catalytic activity. My research has led to the discovery that Slik is located along specialized signaling filopodia, called cytonemes. In addition, our data showed that Slik lengthens cytonemes, while dSTRIPAK is necessary for their biogenesis and signaling function. Slik and dSTRIPAK thus control tissue growth during the embryonic development of *Drosophila*. We have not determined the molecular mechanisms involved in the formation of cytonemes by dSTRIPAK/Slik yet.

Together, our research projects led to the discovery that the dSTRIPAK complex regulates the catalytic and non-catalytic functions of Slik. We have thus identified a new signaling pathway controlling cell and tissue morphogenesis, through the cytoskeleton and intercellular communication. These processes are essential for maintaining homeostasis during embryogenesis. However, alteration of these morphogenetic processes can cause tumorigenesis. Our research might lead to the exploration of new anti-cancer therapeutic avenues.

Keywords : Mitotic morphogenesis, Epithelial integrity, Cytosomes, Cell cortex, Cytoskeleton, Sterile20 kinase Slik, STRIPAK, dMoesin/ERM

Table des matières

Résumé	2
Table des matières	6
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations.....	15
Remerciements.....	18
Préface	21
CHAPITRE 1: Introduction.....	24
1. La morphogenèse	25
1.1 Le cortex cellulaire.....	26
1.1.1 La membrane plasmique est une « mosaïque fluide et hétérogène »	26
1.2.2 La cytosquelette et son remodelage dynamique	29
1.1.3 Les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette	33
1.2 L'arrondissement cellulaire à l'entrée en mitose.....	34
1.2.1 Le cycle cellulaire et le rôle de la mitose	34
1.2.2 La gymnastique cellulaire à l'entrée de la mitose	35
1.2.4 Les cellules S2 de drosophile pour étudier la morphogenèse mitotique	37
1.3 La perte d'intégrité épithéliale durant la transition épithélio-mésenchymateuse .	38
1.3.2 Le rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse	38
1.3.2 La TEM est caractérisée par une perte d'intégrité épithéliale	38
1.3.3 Le disque imaginal de l'aile de drosophile pour étudier l'intégrité épithéliale	39
1.4 La morphogenèse contrôlée par le biais des cytonèmes	40
1.4.1 La découverte des cytonèmes chez la drosophile	41
1.4.2 Les caractéristiques morphologiques des cytonèmes	42
1.4.3 Les caractéristiques fonctionnelles des cytonèmes du disque de l'aile	43
1.4.4 Les régulateurs connus des cytonèmes	45
1.4.5 Les cellules S2 comme modèle d'étude des cytonèmes	47
2. La kinase Slik régule la morphogenèse.....	48
2.1 Les fonctions catalytiques de la kinase Slik.....	48
2.1.1 Slik contrôle la stabilité corticale durant la mitose	48
2.1.2 Slik contrôle l'intégrité du tissu épithéliale	50
2.2 La fonction non-catalytique de Slik	51

2.3 Slik est une kinase Ste20 appartenant à la sous-famille GCK-V	52
2.3.1 La composition de la famille Ste20	52
2.3.2 La conservation des kinases GCK-V	54
2.3.3 La structure-fonction des kinases GCK-V	55
2.4 Les fonctions morphogénétiques associées à Lok et Slk	57
2.4.1 Les kinases Lok et Slk régulent l'activité des ERMs	58
2.4.2 Les autres effecteurs des kinases Lok et Slk	58
3. ERM comme effecteur des kinases GCK-V	61
3.1 La famille des ERMs	61
3.1.1 Les protéines ERM chez les mammifères	61
3.1.2 L'unique ERM chez la drosophile, dMoésine	62
3.2 Les ERMs sont activées par changement de conformation	62
3.2.1 La structure des ERMs	62
3.2.2 L'activation des ERMs en plusieurs étapes	64
3.3 Les fonctions morphogénétiques associées aux ERMs	66
3.3.1 Les ERMs organisent le cytosquelette au cortex cellulaire	66
3.3.1 Les ERMs sont surexprimées dans plusieurs cancers	67
4. Le complexe STRIPAK.....	68
4.1 STRIPAK, le complexe phosphatase qui régule des kinases Ste20.....	68
4.1.1 La découverte du complexe STRIPAK	68
4.1.2 L'hétérotrimère PP2A au cœur du complexe STRIPAK	69
4.1.3 Les Striatines forment le centre organisateur de STRIPAK	70
4.1.4 Les protéines STRIP participent au recrutement de kinases	71
4.1.5 Les protéines adaptatrices	71
4.1.6 La conservation par l'évolution du complexe STRIPAK	72
4.2 Les interactions fonctionnelles au sein du complexe STRIPAK	73
4.2.1 Régulation des résidus activateurs de kinases par STRIPAK	73
4.2.2 Régulation de la localisation de kinases par STRIPAK	76
4.3 Les fonctions morphogénétiques associées à dSTRIPAK.....	77
5. Objectifs et stratégies expérimentales	79
5.1 Objectif 1: Déterminer comment le complexe STRIPAK active la dMoésine	79
5.1.1 Mise en contexte	79
5.1.2 Hypothèse et objectifs spécifiques	79
5.2 Objectif 2: Comprendre comment Slik induit une communication à distance	80
5.2.1 Mise en contexte	80
5.2.2 Hypothèse et objectifs spécifiques	80
5.3 Stratégies expérimentales	80

CHAPITRE 2: STRIPAK régule la localisation de Slik pour contrôler la morphogénèse mitotique et l'intégrité épithéliale.....	83
1. Résumé.....	84
2. Article.....	85
2.1 Abstract.....	87
2.2 Introduction.....	88
2.3 Results.....	91
2.3.1 A genome wide RNAi screen identifies dSTRIPAK as an activator of Moesin	91
2.3.2 dSTRIPAK phosphatase activity regulates Moesin phosphorylation	94
2.3.3 PP2ASTRIPAK interacts with Slik and regulates its phosphorylation state	98
2.3.4 PP2ASTRIPAK regulates Slik localization at the cell cortex	101
2.3.5 PP2ASTRIPAK regulates Slik localization by phosphorylation to control Moesin activation	104
2.3.6 Strip and Cka control Slik cortical association in mitosis and mitotic morphogenesis	106
2.3.7 Strip and Cka control epithelial tissue integrity in Drosophila epithelia	110
2.3.8 Strip and Cka control Slik localization and function in the wing disc epithelium	112
2.4 Discussion.....	117
2.5 Materials and Methods.....	120
2.5.1 Primary and secondary screens	120
2.5.2 dsRNA production and primers	120
2.5.3 Confirmation mini-screens	121
2.5.4 cDNA constructs	121
2.5.5 S2 cell culture, dsRNA treatment, transfection, or drug treatments	121
2.5.6 S2 stable cell lines and time-lapse microscopy	121
2.5.7 Immunostaining imaging and image analysis of S2 cells	122
2.5.8 Cell lysis, SDS-PAGE and Western blot analysis	123
2.5.9 Co-Immunoprecipitation assays	123
2.5.10 In vitro kinase assay	124
2.5.11 RNA extraction for quantitative real-time PCR	124
2.5.12 Drosophila stocks and culture	125
2.5.13 Immunostaining imaging and image analysis of imaginal discs	125
2.5.14 Statistical analysis	126
2.6 Procedures.....	127
2.6.1 dsRNA primer sequences	127
2.6.2 cDNA sequences of Slik mutants	128
2.7 Notes.....	130
2.7.1 Acknowledgments	130
2.7.2 Fundings	130

2.7.3 Author contributions	130
3. Questions en suspens dans le projet de recherche.....	131
3.1 Caractériser l'interaction entre Slik et le complexe dSTRIPAK.....	131
3.2 Comment dSTRIPAK induit la déphosphorylation de Slik?	134
3.3 Quelle(s) kinase(s) contrecarre(nt) l'activité de dSTRIPAK sur Slik?	135
3.4 Vérifier que dSTRIPAK contrôle la morphogenèse mitotique et épithéliale par le biais de la dMoésine	137
CHAPITRE 3: dSTRIPAK/Slik contrôle la biogenèse des cytonèmes et la signalisation à distance chez la drosophile	139
1. Résumé.....	140
2. Manuscript.....	141
2.1 Abstract.....	143
2.2 Introduction	144
2.3 Results.....	146
2.3.1 Endogenous Slik is present on cytonemes in S2 cells	146
2.3.2 Slik overexpression induces cytoneme elongation in a kinase-independent manner, and through its CTD	149
2.3.3 Strip and Cka are required for the formation of cytonemes and Slik-induced cytoneme elongation	153
2.3.4 Strip and Cka are required for Slik-induced signaling response in wing discs	157
2.3.5 Slik-positive cytonemes present dynamic vesicular trafficking events and participate to intercellular communication	158
2.4 Discussion	163
2.4.1 Slik cortical localization correlates with cytoneme formation	163
2.4.2 dSTRIPAK regulates both Slik catalytic and non-catalytic functions	164
2.4.3 dSTRIPAK but not Slik is required for cytoneme biogenesis	165
2.5 Materials and Methods	166
2.5.1 cDNA constructs	166
2.5.2 S2 cell culture, transfections and drug treatments	166
2.5.3 Immunofluorescence: PFA- and MEM-fixations	167
2.5.4 Image acquisition and data treatment in S2 cells	167
2.5.5 Drosophila stocks and culture	168
2.5.6 EdU labelling, immunostaining and image analysis of imaginal discs	168
2.5.7 Statistical analysis	168
2.6 Notes	170
2.6.1 Acknowledgments	170
2.6.2 Fundings	170
2.6.3 Author contributions	170

3. Questions en suspens dans le projet de recherche.....	171
3.1 dSTRIPAK/Slik nous renseigne sur la biogenèse des cytonèmes.....	171
3.1.1 Slik induit l'élongation des cytonèmes sans être requis pour leur biogenèse	171
3.3.2 La fonction kinase de Slik réduit-elle la taille des cytonèmes?	173
3.3.3 Comment Strip et Cka sont nécessaires à la biogenèse des cytonèmes?	175
3.4 Slik induit une signalisation de croissance à distance	178
3.4.1 Les cytonèmes Slik-positifs transportent et libèrent des vésicules extracellulaires?	179
3.4.2 Comment Slik induit la signalisation de prolifération non-autonome?	181
CHAPITRE 4: Discussion et Perspectives	184
1. Slik est une protéine périphérique non-permanente régulée par phosphorylation	185
1.1 La localisation de Slik en périphérie	185
1.2 La phosphorylation de Slik modifie sa liaison ionique avec la membrane plasmique?.....	187
1.3 La phosphorylation de Slik modifie sa conformation spatiale?	188
2. dSTRIPAK participe à la régulation spatiotemporelle de la dMoésine	191
2.1 Slik est enrichie au cortex cellulaire à l'entrée de la mitose	191
2.2 dSTRIPAK déphosphoryle Slik durant la transition G2/M?	193
2.3 L'assemblage de dSTRIPAK/Slik suite à la fragmentation mitotique du Golgi? ..	195
2.4 Et si dSTRIPAK régulaient d'autres fonctions catalytiques de Slik?	198
2.5 Et si cette voie de signalisation était conservée par l'évolution?	199
3. dSTRIPAK/Slik contrôle la formation et la signalisation des cytonèmes.....	201
3.1 L'identification des protrusions cellulaires.....	201
3.2 Le rôle des protrusions cellulaires dans le cancer.....	203
4. Études de la composition du cortex cellulaire	204
5. Conclusion	206
Références	208

Liste des figures

Figure 1.1 La composition de la membrane plasmique	27
Figure 1.2 Les charges modulent l'association de protéines périphériques	29
Figure 1.3 Les principaux régulateurs de la dynamique de l'actine	31
Figure 1.4 La polymérisation et l'équilibre dynamique des microtubules.....	32
Figure 1.5 Réarrangement du cortex cellulaire à l'entrée en mitose	36
Figure 1.6 Les phénotypes de la transition épithélio-mésenchymateuse	39
Figure 1.7 Les cytonèmes établissent un gradient de molécules de signalisation	41
Figure 1.8 Les cytonèmes sont des filopodes spécialisés dans la signalisation.....	43
Figure 1.9 Les différents types de cytonèmes des cellules épithéliales du disque imaginal alaire.....	45
Figure 1.10 La régulation spatio-temporelle de la dMoésine phosphorylée par Slik ...	49
Figure 1.11 Slik induit de la prolifération non-autonome.....	51
Figure 1.12 La composition de la famille Sterile20	54
Figure 1.13 La conservation par l'évolution des kinases GCK-V	55
Figure 1.14 Chaque domaine de la kinase Slik présente des activités distinctes	59
Figure 1.15 Les protéines ERM sont hautement conservées par l'évolution.....	62
Figure 1.16 La structure cristalline d'une protéine ERM en conformation fermée.....	64
Figure 1.17 Modèle d'activation de la dMoésine dans les cellules S2 de drosophile ..	65
Figure 1.18 La Ser/Thr protéine phosphatase PP2A est hétérotrimérique	69
Figure 1.19 Modèle de l'organisation structurelle de STRIPAK	71
Figure 1.20 La conservation par l'évolution des composants de STRIPAK.....	73
Figure 1.21 STRIPAK régule l'activité catalytique de kinases Ste20	75
Figure 1.22 STRIPAK régule la localisation de kinases Ste20	77
Figure 2.1 A genome-wide RNAi screen identifies the dSTRIPAK complex as a Moesin activator	92
Figure 2.2 Depletion of Mob4, SImap and FGOP2, three dSTRIPAK adaptor proteins, slightly decrease p-moesin levels	96
Figure 2.3 dSTRIPAK phosphatase activity regulates Moesin phosphorylation	98
Figure 2.4 PP2ASTRIPAK interacts with Slik and regulates its phosphorylation state	99
Figure 2.5 Slik isoforms are over-phosphorylated in absence of PP2ASTRIPAK without affecting its kinase activity	100

Figure 2.6 PP2ASTRIPAK regulates Slik localization at the cell cortex.....	102
Figure 2.7 Slik localization is affected by PP2ASTRIPAK inhibition or kinase inhibition 103	
Figure 2.8 PP2ASTRIPAK regulates Slik localization by phosphorylation to control Moesin activation	106
Figure 2.9 PP2ASTRIPAK regulates Slik cortical association in mitosis	108
Figure 2.10 Strip and Cka control mitotic morphogenesis in cultured S2 cells	109
Figure 2.11 Strip and Cka control epithelial tissue integrity in Drosophila epithelia.....	111
Figure 2.12 Strip and Cka control Slik localization and function in the wing disc epithelium.....	114
Figure 2.13 Strip or Cka depletion has little effect on total Moesin and E-Cadherin (Shotgun) levels and distribution.....	115
Figure 2.14 The ability of Slik to phosphorylate Moesin in discs depends on PP2ASTRIPAK.....	116
Figure 2.15 Le CTD n'est pas nécessaire pour l'association de Slik à dSTRIPAK.....	133
Figure 2.16 L'activité kinase de Slik ne contrôle pas sa localisation corticale	136
Figure 3.1 Endogenous Slik is present on cytonemes in S2 cells	147
Figure 3.2 Actin-dependent cytonemes are visualized by plasma-membrane markers 148	
Figure 3.3 Slik overexpression induces cytoneme elongation in a kinase-independent manner and through its CTD.....	151
Figure 3.4 Slik localizes at S2 cell cortex and cytonemes, and SlikCTD is sufficient to induce signaling response in vivo	152
Figure 3.5 Strip and Cka are required for cytoneme biogenesis and Slik-induced cytoneme elongation.....	155
Figure 3.6 Unlike Strip and Cka, Slik and Moesin are not required for cytoneme formation	156
Figure 3.7 SlikCTD cortical localization is not regulated by PP2A.....	157
Figure 3.8 Strip and Cka are required for Slik-induced signaling response.....	158
Figure 3.9 Slik or SlikCTD is present on basal and apical cytonemes in vivo	159
Figure 3.10 Slik-positive cytonemes present vesicular trafficking events implicated in intercellular communication	161
Figure 3.11 Slik promotes intercellular exchange of material with neighboring cells ...	162
Figure 3.12 Slik et Rho1 colocalisent au cortex cellulaire et le long de cytonèmes.....	172
Figure 3.13 Modèle d'étude: Slik induit l'élongation des cytonèmes par Rho1/Dia	173
Figure 3.14 Slik Δ CTD réduit la taille des cytonèmes dépendamment de dMoésine ...	175

Figure 3.15 Comment dSTRIPAK est requis pour la biogenèse des cytonèmes?.....	178
Figure 3.16 Slik est présente dans les fractions de vésicules extracellulaires	180
Figure 3.17 Slik induit des protrusions d'actine apicales dans le disque de l'aile.....	182
Figure 4.1 SlikCTD polybasique est responsable de la localisation corticale de Slik ..	188
Figure 4.2 Modèle d'étude: Slik est une protéine périphérique non-permanente régulée par phosphorylation	190
Figure 4.3 Modèle d'étude: Pi(4,5)P2, Slik et Pp1-87B participent à l'activation spécifique de la dMoésine en mitose	193
Figure 4.4 Strip et Cka colocalisent avec le cis-Golgi, qui se fragmente en mitose	196
Figure 4.5 Modèle d'étude: La fragmentation du Golgi induit l'activation de la dMoésine par dSTRIPAK/Slik.....	197
Figure 4.6 Similitudes et différences entre les différents protrusions cellulaires de signalisation	202
Figure 4.7 L'étude de la composition du cortex cellulaire pourrait nous renseigner sur les fonctions catalytiques et non-catalytiques de Slik.....	205

Liste des tableaux

Table 2.1 Validated genes and their activation score	93
Tableau 4.1 Fonctions associées à l'activation des ERMs par les kinases GCK-V	199

Liste des abréviations

A-B-C	aa	acide aminé
	ADF	Actin Depolymerizing Factor
	ADP	Adénosine Diphosphate
	ADN(c)	Acide Désoxyribonucléique (complémentaire)
	ARN(i)	Acide Ribonucléique (interférent)
	ATP	Adénosine Triphosphate
	Arp2/3	Actin related proteins 2 and 3
	ASP	Air sac primordium
	BrdU	Bromodésoxyuridine
	CAP	Cyclase-associated protein
	CD44	Cluster de Différenciation 44
	C-ERMAD	Carboxy-terminal ERM Associated Domain
	CTD	Carboxy-Terminal Domain
	D-E-F	DAG
DP		Disc Propre
EBP50		ERM-binding phosphoprotein 50
ECT2		Epithelial Cell Transforming protein 2
ERM		Ézrine Radixine Moésine (Ezrin Radixin Moesin)
ESCRT		Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
EV		Extracellular vesicles
FERM		Four-point-one Ezrin Radixin Moesin
FAK		Focal Adhesion Kinase
FGF		Fibroblast Growth Factor
FRAP		Fluorescence recovery after photobleaching
G-H-I	GAP	GTPase Activating Protein
	GCK	Germinal Center Kinase
	GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
	GDP	Guanosine Diphosphate
	GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
	GFP	Green Fluorescent Protein
	GTP	Guanosine Triphosphate
	GRASP	GFP Reconstitution Across Synaptic Partner
	GST	Glutathione S-transferases
	HeLa	Henrietta Lacks
	IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate

J-K-L	JNK	c-Jun Amino-terminal Kinase
	KD	Kinase Dead
	LGN	Leucine-Glycine-Asparagine repeat protein
	KO	Knock-Out
M-N-O	MAP	Microtubules Associated Protein
	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
	MCAK	Mitotic Centromere-Associated Kinesin
	MMP	Matrix Metalloproteinase
	MTOC	Microtubule-Organizing Center
	MVB	Multivesicular Body
	NCD	Non-Conserved Domain
	NF2	Neurofibromatosis type 2
	NuMa	Nuclear Mitotic apparatus protein
	OA	Okadaic Acid
P-Q-R	PAK	p21-Activating Kinase
	pH	potentiel Hydrogène
	pl	point Isoélectrique
	Pi(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
	PM	Peripodial Membrane
	PP	Protéine Phosphatase
	ROCK	Rho-associated protein Kinase
S-T-U	SCAR	Suppressor of Cyclic AMP Receptor
	SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
	Ste20	Sterile20
	STRIPAK	Striatin Interacting Phosphatase and Kinase
	TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
	TGF-β	Transforming Growth Factor β
	TNT	Tunneling Nanotube
	UAS	Upstream Activation Sequence
V-W-X-Y-Z	WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
	WAVE	WASP family Verprolin homologous protein
	WT	Wildtype

*A l'origine de toute connaissance, nous rencontrons la curiosité !
Elle est une condition essentielle du progrès.*

Alexandra David-Néel
exploratrice 1868 - 1969

Remerciements

Avant d'entreprendre le voyage intellectuel qu'impliquent la rédaction et la lecture de ma thèse, je prends le temps de remercier ceux et celles qui ont pleinement contribué à sa réalisation. En effet, bien que cette thèse ne porte que mon nom en première page, elle cache de nombreuses personnes qui m'ont aidée tout au long de mon doctorat. Les voici :

Je remercie tout d'abord le **Dr Sébastien Carréno**, mon directeur de recherche de m'avoir chaleureusement accueillie lors de mon stage de maîtrise. Le charme du Québec, la recherche à l'IRIC et surtout la confiance qu'il m'a octroyée, m'ont fait revenir pour 5 années de plus. C'est avec cette même confiance qu'il a su me stimuler tout au long de mon parcours et m'accompagner même pendant les moments plus difficiles. Son enthousiasme et sa passion communicative lorsqu'une découverte fortuite surgit ont rythmé mes années de recherche. Son implication dans le projet a surtout forgé mon esprit critique, essentiel pour devenir un chercheur autonome. Enfin, je le remercie aussi d'avoir laissé libre cours à ma créativité et à mes initiatives, tant sur le plan scientifique, que dans ma vie personnelle. Cet équilibre a contribué à mon épanouissement dans ce métier.

Mon quotidien n'aurait pas été pareil sans mes chers collègues de laboratoire, devenus amis, **Virginie Mondin** et **Kevin Leguay**. Sur des airs rythmés de Calvin Harris, nous avons échangé de nombreuses idées, certaines plus scientifiques que d'autres. Ils ont pleinement participé à l'avancement de mon projet de recherche, et à recharger mes batteries lors de pannes de motivation. Je tiens particulièrement à remercier Virginie pour son écoute et son soutien en tout temps. De façon synchro, nous avons évolué, rencontré des imprévus avec nos chères cellules S2, et partagé des joies à travers d'autres événements. Je pense évidemment aussi à **Dr Khaled Ben El Kadhi** et à **Barbara Decelle** à qui je dois mes débuts en culture cellulaire et en microscopie. Leur patience et leur dévouement ont permis de nous transmettre les expertises du laboratoire.

Je tiens ensuite à remercier l'UdeM et l'IRIC. En effet, grâce à cet environnement stimulant et propice aux collaborations, j'ai eu le privilège de côtoyer des chercheurs exceptionnels. À commencer par notre fidèle collaborateur, le **Dr David Hipfner**. En effet, mon travail n'aurait pas vu le jour sans la contribution précieuse de David et de son équipe: Neera, Mernoush, et Mathieu. Notre fascination pour les mêmes molécules a fait de nos rencontres des moments de partage agréables et productifs. Je suis persuadée que le projet cytonèmes connaîtra un fier succès, grâce aussi à Basile que je remercie ! J'ai également eu l'occasion d'échanger avec le **Dr Philip Roux** lors d'essais kinases. Je le remercie pour sa collaboration amicale et ses remarques constructives.

Ensuite, je tiens à remercier les équipes du Fly-meeting, dont les chercheurs, le **Dr Marc Therrien**, le **Dr Vincent Archambault** et le **Dr Gregory Emery**. Grâce aux Fly-meetings hebdomadaires, j'ai pu m'enrichir de leurs raisonnements scientifiques. De plus, j'ai bénéficié de leurs conseils avisés lors de mes présentations et à l'occasion de nos rencontres au stand café. J'ai également saisi l'opportunité d'être assistante du cours de communication scientifique donné par Vincent et Gregory. Cela m'a permis de découvrir davantage les personnes intègres et passionnées qu'ils sont. Je remercie particulièrement Marc, d'avoir accepté d'être président de tous mes comités de suivi incluant le comité de thèse. J'ai ainsi pu bénéficier de son objectivité, de ses connaissances étendues, et de son soutien tout au long de mon parcours. Ses critiques constructives ont pleinement contribué à développer mon esprit critique.

Je remercie également le **Dr Jean-François Côté** d'avoir accepté d'être membre du jury et d'évaluer ma thèse. Ses connaissances pointues en morphogenèse cellulaire permettront certainement de challenger mon travail. Merci sincère au **Dr Nathalie Lamarche-Vane** qui a accepté d'être examinatrice externe de ma thèse. Son expertise et sa curiosité scientifique m'avaient apporté de nouvelles pistes de réflexion lors de mon dernier comité de suivi.

Évidemment l'IRIC ne serait pas tel sans ses plateformes technologiques et l'accompagnement soigneux de ses étudiants. Je remercie ainsi **Christian Charbonneau** pour les heures de formation aux microscopes, grâce auxquelles j'ai apprivoisé différentes techniques d'imagerie. Merci à **Pascale Le Thérizien** pour son

suivi tout au long du cheminement. J'ai également eu le plaisir de m'inspirer du dévouement du **Dr Julie Montovani**. Je la remercie chaleureusement pour l'organisation d'ateliers divers, d'événements de réseautage, du club de rédaction, etc. par lesquels elle nous accompagne avec compassion et enthousiasme dans notre parcours étudiant. Je remercie enfin l'IRIC et les Programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal pour le support financier tout au long de mon parcours.

Mais que serait l'ambiance à l'IRIC sans son comité d'étudiants créatifs et dédiés au bien-être des occupants du Pavillon Marcelle-Coutu? Rien de tel pour s'intégrer que des 5à7 et des BBQs festifs. J'ai ainsi eu le plaisir de rencontrer des super personnes en dégustant de bonnes bières locales et belges. Je tiens donc à remercier de tout cœur l'ensemble **des membres de l'AÉIRIC**. De plus, l'événement « Dans les coulisses de la recherche » m'a fait découvrir une passion pour la vulgarisation scientifique. Bravo Myreille et Thomas pour votre brillante idée et votre capacité à la mettre en oeuvre ! Une dernière facette liée à l'IRIC est notre groupe de course à pied: **les coureurs du Zigzag**. Je salue et remercie vivement Eugénie, Jack, Evelyne, Mathilde, Julie, Myreille et Jean-David pour ces heures de transpirations lors desquelles nous partageons et nous nous vidons la tête pour mieux avancer !

Finalement, je veux exprimer un énorme remerciement à **ma famille et à mes amis**. Sans le soutien de mes parents, je n'aurais pas pu entreprendre le projet de venir faire mon doctorat outre-Atlantique. Je remercie de tout cœur ma fratrie et belle-famille de comprendre avec difficulté, mais compassion mon quotidien au labo. Malgré la distance, ils ont suivi de près mon parcours et connaissent désormais le Québec et sa fameuse poutine. Je tiens aussi à remercier chaleureusement mes amis de répondre toujours présents, que ce soit pour découvrir les environs canadiens ou festoyer lors de nos retours au plat pays. Merci à Christina pour le soutien virtuel qu'elle me porte au quotidien. Enfin, **Harold**, mon mari, je ne te remercierai jamais assez du soutien inconditionnel, des nombreux conseils fructueux, et des sacrifices que tu as faits pour être à mes côtés durant mes études. Promis je m'arrête ici... je crois :)

Préface

La plasticité cellulaire est fascinante, surtout lorsqu'elle est mise au service de miracles, tels que la formation d'un nouveau-né. Elle est toutefois aussi exploitée à mauvais escient, comme pour la progression du cancer. La division cellulaire est l'événement clé au sein de ces deux événements contradictoires sur le plan de l'humanité. En effet, alors que l'embryogenèse crée l'être humain, la tumorigenèse participe à son extinction. L'OMS a classé les cancers en 7^e cause principale de décès dans le monde (en 2016) (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Au Québec malheureusement, le cancer est la première cause de mortalité (<https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/fr/tv.action?pid=1310039401>), et désormais suivie de près par le Covid-19 en l'an 2020. Ces données nous donnent une motivation intrinsèque de poursuivre la recherche fondamentale qui œuvre à offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour combattre cette maladie.

Ainsi le laboratoire du Dr Sébastien Carréno a retenu toute mon attention lors de mes choix de stages de maîtrise. En effet, son laboratoire étudie les mécanismes moléculaires qui régulent la morphogenèse cellulaire durant des processus essentiels, tels que la division et la migration. J'ai ensuite poursuivi mon doctorat au sein de son équipe, lors duquel j'ai eu l'occasion d'étudier, d'observer, et d'admirer la complexité de la division cellulaire. L'utilisation d'un organisme modèle, tel que la *Drosophila melanogaster*, permet de restreindre cette complexité et d'identifier de nouvelles molécules impliquées.

Sébastien et depuis 10 ans les recherches menées dans son laboratoire examinent une famille de protéines en particulier: les ERMs, connues pour réguler la morphogenèse cellulaire. Chez la mouche, il existe un orthologue unique, la dMoésine. J'aime comparer cette protéine à un crochet: une fois activé, il s'ouvre et 'accroche' le cytosquelette à la membrane de la cellule. À l'inverse, lorsqu'il est inactivé, il se ferme et ne stabilise plus le cytosquelette en périphérie cellulaire. Sébastien et le Dr David Hipfner avaient précédemment découvert que la kinase Ste20 Slik était responsable de l'activation de la dMoésine. Par le biais du crochet dMoésine, la kinase Slik participe à la

stabilité du cytosquelette, essentielle pour maintenir la forme cellulaire durant la division et l'organisation d'un épithélium en développement. De cette façon, la perte d'activité de Slik ou de la dMoésine cause une division cellulaire chaotique et une perte de l'intégrité épithéliale. Ces deux événements peuvent mener à la tumorigenèse. Il était donc primordial de connaître les régulateurs en amont de cette voie de signalisation.

Avant mon arrivée au laboratoire, l'agent de recherche Barbara Decelle avait effectué un criblage génomique sur les cellules S2 de drosophiles afin de découvrir de nouveaux activateurs en amont de dMoésine. Parmi ceux-ci étaient présents des composants de dSTRIPAK, un complexe régulateur de kinases Ste20. J'ai fait la découverte que dSTRIPAK régule la localisation de Slik au cortex cellulaire par phosphorylation. Or, sa localisation est essentielle pour sa fonction catalytique envers la dMoésine. En collaboration avec le laboratoire du Dr David Hipfner, nous avons ainsi révélé que dSTRIPAK régule la morphogenèse mitotique et l'intégrité épithéliale.

De manière intéressante, le Dr David Hipfner avait précédemment découvert une fonction non-catalytique attribuée à Slik: sa surexpression dans le disque imaginal de l'aile induisait une prolifération non-autonome du tissu sus-jacent. Toutefois, il était inconnu comment cette signalisation à distance a lieu. En parallèle, des étudiants au laboratoire avaient observé que Slik exogène se localisait sur des fines protrusions d'actine dans les cellules S2. Ensemble, ces résultats nous ont menés à émettre l'hypothèse que des cytonèmes (des filopodes spécialisés dans la communication intercellulaire chez la drosophile) étaient à l'origine de la signalisation à distance induite par Slik. Ainsi j'ai découvert que les cellules S2 présentaient effectivement des cytonèmes sur lesquels Slik endogène était localisée. Ensuite, j'ai constaté que Slik allonge les cytonèmes, alors que les composants de dSTRIPAK sont nécessaires à leur formation. Avec l'aide précieuse d'Ophélie Delcorte et de Marie Bordet (étudiantes à la maîtrise) ainsi que Basile Rambaud (étudiant au doctorat), nous avons caractérisé ces phénotypes. Le laboratoire de David a révélé que les mêmes composants de dSTRIPAK étaient requis pour la signalisation à distance induite par Slik *in vivo*. Ces résultats corrélatifs indiquent que Slik participe à la morphogenèse du disque de l'aile par le biais de cytonèmes. De plus, cette fonction non-catalytique de Slik est dépendante du

complexe dSTRIPAK. Alors que la localisation corticale de Slik, par dSTRIPAK, régule son activité kinase, il reste à définir si elle affecte son activité non-catalytique.

Par ce récit de mon cheminement de recherche, il est évident que mon manuscrit de thèse commence par un tour d'horizon de la morphogenèse à ses différents niveaux (Chapitre 1). Tout d'abord je vais « zoomer » sur la composition du cortex de la cellule, en me focalisant ici sur l'implication des protéines périphériques dans la plasticité cellulaire. Ceci sera illustré par la morphogenèse cellulaire durant la mitose et l'organisation du tissu épithélial durant la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce processus de différenciation illustre également qu'un événement essentiel au développement embryonnaire peut être fatal dans le cas de la tumorigenèse. Dans ces deux parties, il ne s'agit pas de couvrir l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués, mais surtout de saisir l'importance de la plasticité du cortex cellulaire dans ces processus morphogénétiques. Ces sections seront également accompagnées de l'argumentation de notre choix de modèle organisme: la drosophile. Je vais ensuite aborder la communication intercellulaire par le biais des cytonèmes. Ces filopodes spécialisés sont essentiels durant l'embryogenèse et également impliqués dans la progression tumorale. Ensuite, je passerai en revue les connaissances sur Slik, dMoésine, et le complexe dSTRIPAK. Ceci permettra d'avoir un esprit critique sur les explorations menées au sein des projets de recherche (Chapitres 2 et 3). À la fin de chaque projet de recherche, j'en profite pour soulever les questions qui restent en suspens, analyser les limites de ma recherche, et proposer des perspectives. Enfin, dans la discussion de ma thèse (Chapitre 4), je réunis les différents fils de la morphogenèse pour interpréter davantage les résultats et porter un regard plus général sur mon travail.

CHAPITRE 1: Introduction

1. La morphogenèse

Qui n'est pas fasciné par les mécanismes qui permettent qu'un œuf fécondé donne naissance à un organisme complexe? Le chemin est long entre un œuf initialement sphérique et la forme humaine du nouveau-né. Ce chemin passe par différents stades du développement, lors desquels l'organisme prend forme grâce à des changements structurels précisément contrôlés dans le temps et dans l'espace.

L'ensemble des changements structurels qui prennent place durant le développement d'un organisme est nommé « la morphogenèse » (d'après la racine grecque « morph » signifiant forme, et « genèse » signifiant création). Alors que la morphogenèse était initialement basée sur un modèle biomathématique de substances chimiques (morphogènes) diffusant à travers le tissu [1], elle est surtout régulée par de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires. Effectivement, le développement d'un organisme dépend d'un équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort des cellules qui le composent. Cet équilibre dynamique, ou homéostasie est hautement contrôlé grâce à la communication entre les cellules.

Ainsi différents niveaux de régulation de la morphogenèse existent. Tout d'abord, de nombreux réseaux de signalisation organisent le cytosquelette sous la membrane plasmique (cortex cellulaire) pour répondre à différents besoins morphogénétiques. Ces mécanismes moléculaires adaptent ainsi la forme de la cellule (morphogenèse cellulaire) lors de sa prolifération, sa migration, sa différenciation, et même sa mort programmée. Ensuite, ces processus cellulaires ont à leur tour une répercussion sur la formation du tissu qu'elles constituent (morphogenèse tissulaire). Enfin, l'échange de molécules de signalisation entre les cellules (la communication intercellulaire) permet de coordonner ces processus morphogénétiques. L'homéostasie ainsi créée est essentielle durant le développement embryonnaire, mais également durant la croissance ou le vieillissement de l'organisme. Une rupture de cette homéostasie peut par exemple conduire à une prolifération cellulaire anarchique qui est à l'origine d'un cancer. Ainsi de nombreux mécanismes moléculaires qui contrôlent l'embryogenèse sont également impliqués dans la tumorigenèse.

1.1 Le cortex cellulaire

Comme mentionné ci-avant, la régulation du cortex cellulaire permet de satisfaire différents processus morphogénétiques. Le cortex de la cellule est composé de la membrane plasmique et du maillage sous-jacent de protéines du cytosquelette. Il comprend également des protéines qui régulent les interactions entre ces deux composants majeurs [2]. Ainsi la composition du cortex cellulaire définit la façon dont les cellules vont intégrer le remodelage du cytosquelette durant par exemple la division cellulaire. L'organisation du cortex va également établir la polarité et l'adhésion cellulaires nécessaires à la formation d'un tissu. Enfin, le cortex permet aussi le trafic et la fusion des vésicules endo-/exocytaires requis lors de communications intercellulaires. Malgré sa fonction centrale dans la morphogénèse, la plasticité du cortex cellulaire est loin d'être entièrement comprise. Nous verrons ci-dessous sa composition et les principaux mécanismes qui gouvernent son organisation.

1.1.1 La membrane plasmique est une « mosaïque fluide et hétérogène »

La composition de la membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche lipidique qui contient à la fois des phospholipides et des protéines [3]. Plus de la moitié des phospholipides membranaires servent avant tout d'élément structurel des membranes. Une minorité des phospholipides, les phosphoinositides, jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire (p.ex. $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ hydrolysé en messagers secondaires IP_3 et DAG). Les protéines présentes à la membrane plasmique sont elles aussi impliquées dans la transduction de signaux. Elles sont divisées en deux catégories: les protéines membranaires intégrales ou périphériques [3] (Figure 1.1). Comme leurs noms l'indiquent, les protéines intégrales (ou intrinsèques) sont totalement (p.ex. le récepteur couplé aux protéines G) ou partiellement (p.ex. la protéine d'adhésion CD44) insérées dans la bicouche lipidique. Elles sont expérimentalement dissociables par des détergents qui rompent les interactions hydrophobes. À l'inverse, les protéines périphériques se dissolvent par des détergents polaires, car elles sont associées à la surface interne (ou cytosolique) de la membrane plasmique. Elles interagissent soit

avec des protéines intégrales (p.ex. les petites protéines G), soit avec des têtes polaires des phospholipides membranaires (p.ex. les protéines ERMs lient le $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$) [4].

En 1972, Singer et Nicolson ont modélisé la membrane plasmique comme une « mosaïque fluide » [3]. La notion de « mosaïque » s'explique par la présence aléatoire des protéines membranaires dans la bicouche lipidique. La notion « fluide » fait référence au mouvement constant des lipides et protéines membranaires. Depuis, ce modèle s'est raffiné et deux notions supplémentaires sont à retenir: (i) l'hétérogénéité latérale de la membrane plasmique par la présence de domaines enrichis en certains lipides ou protéines; et (ii) les protéines qui lient occasionnellement les membranes [4]. En effet, alors que les protéines membranaires intégrales intègrent la membrane plasmique directement après leur synthèse, les protéines périphériques peuvent basculer entre un état 'soluble' dans le cytosol, et un état 'lié' à la membrane. Donc la membrane plasmique pourrait être définie comme une « mosaïque fluide et hétérogène ». Nous nous intéressons plus particulièrement à cette dernière caractéristique.

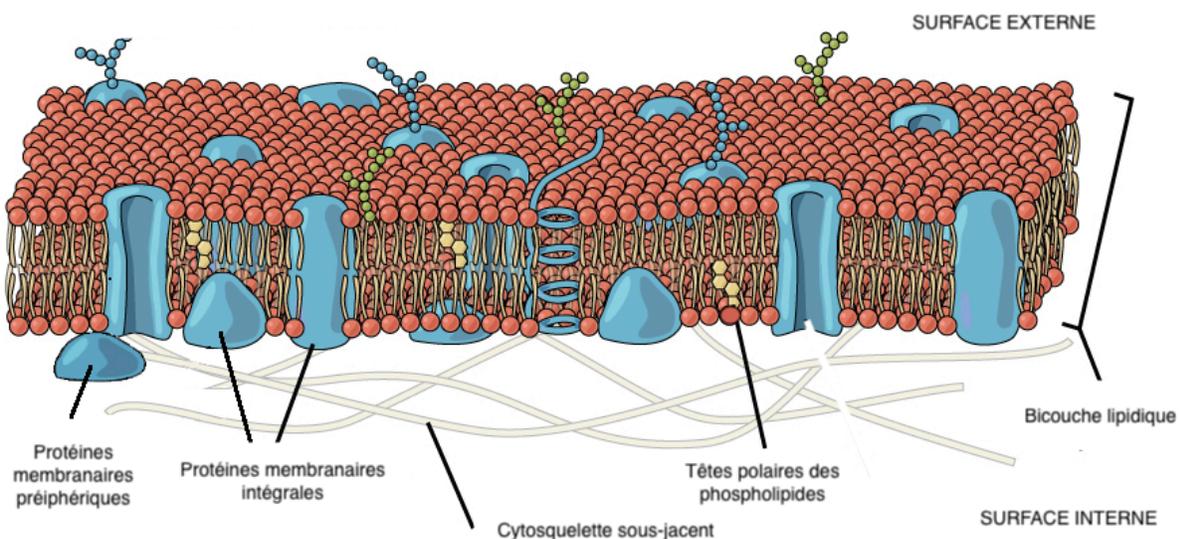


Figure 1.1 **La composition de la membrane plasmique**

La membrane plasmique se compose d'une bicouche lipidique (rouge) et de protéines membranaires (bleu). Parmi les protéines membranaires, il y a une distinction entre les protéines intégrales (totalement ou partiellement insérées dans la bicouche lipidique) et les protéines périphériques (associées aux protéines intégrales ou aux têtes polaires des phospholipides membranaires). Figure adaptée de OpenStax Biology, Rice University.

Les protéines en visite à la membrane plasmique

Les protéines périphériques s'associent à la membrane plasmique de différentes façons. Elles peuvent ainsi être classifiées sur la base de la nature de l'interaction avec la membrane plasmique [4]. Dans le cas des interactions fortes, il s'agit surtout de liaisons hydrophobes. P.ex. les protéines myristoylées ou palmitoylées (ajouts de groupement lipidiques) s'intègrent ainsi dans la bicouche lipidique [5]. Dans le cas des interactions faibles, il s'agit surtout des liaisons ioniques. Effectivement, la surface interne de la membrane plasmique a un profil électrostatique globalement négatif par la présence des têtes polaires des phospholipides [6]. Cette charge négative est déterminante pour l'association de protéines chargées positivement. Ainsi, perturber les charges membranaires en affectant l'homéostasie des phosphoinositides, aura des conséquences sur la présence de protéines périphériques (Figure 1.2B). À l'inverse, modifier la charge protéique, en ajoutant p.ex. des groupements phosphates chargés négativement (PO_4^{3-}) peut aussi perturber leur localisation à la membrane plasmique (Figure 1.2A) [6]. P.ex. la phosphorylation du domaine polybasique de la GTPase K-Ras induit sa dissociation de la membrane plasmique et par conséquent induirait la mort cellulaire (l'apoptose) [7].

En conclusion, des voies de signalisation contrôlent l'association non permanente de certaines protéines périphériques. De cette façon, la composition du cortex cellulaire est modifiée et par conséquent sa fonctionnalité.

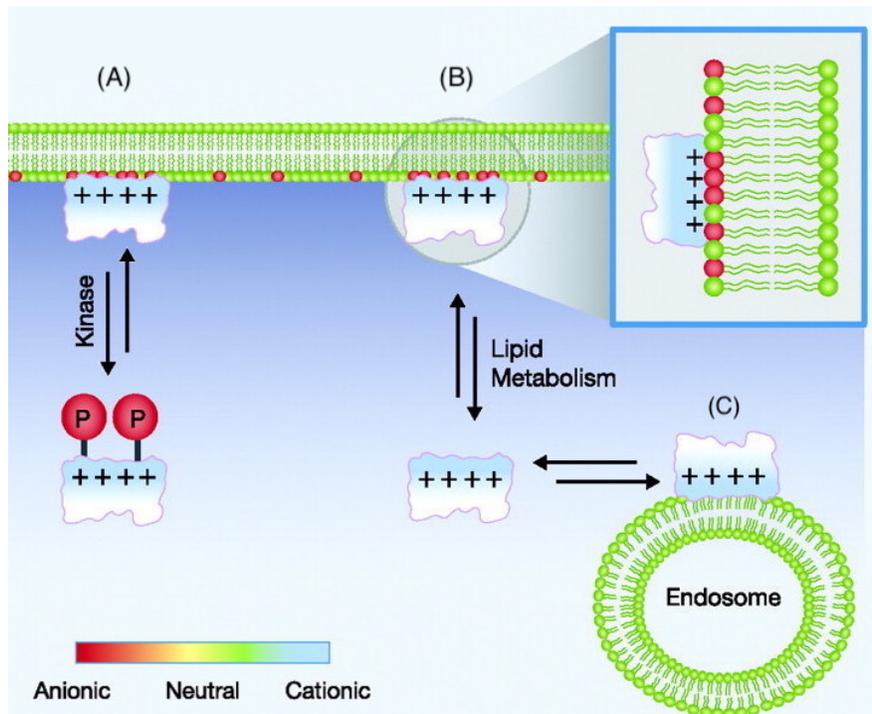


Figure 1.2 **Les charges modulent l'association de protéines périphériques**

(A) La phosphorylation des protéines dissocie les résidus cationiques de la membrane plasmique. **(B)** Le métabolisme lipidique modifie la charge de la surface membranaire, conduisant à la dissociation des résidus cationiques des protéines périphériques. **(C)** La charge à la surface membranaire des vésicules endocytaires et sécrétoires peut également affecter la localisation des protéines sur les plateformes de signalisation intracellulaires. Les charges anioniques, neutres et cationiques sont respectivement représentées en rouge, vert et bleu comme indiqué par l'échelle du gradient de charge électrique. Figure adaptée de © [6].

1.2.2 La cytosquelette et son remodelage dynamique

Le cortex de la cellule est majoritairement composé d'un réseau dense de protéines du cytosquelette sous la membrane plasmique. Par ordre croissant de diamètre, le cytosquelette comprend des filaments d'actine (~7 nm de diamètre), des filaments intermédiaires (~10 nm), et des microtubules (~25 nm). Nous nous intéressons ici au cytosquelette d'actine et des microtubules, car ils subissent un remodelage dynamique lors de processus morphogénétiques. Nous verrons que ce dynamisme est dû à des propriétés intrinsèques au cytosquelette, mais également grâce à la participation de protéines régulatrices.

La dynamique d'actine et ses principaux régulateurs

Les filaments d'actine se forment suite à l'assemblage dynamique de monomères d'actine globulaire (actine-G) (étape d'élongation). Cette polymérisation requiert initialement la formation d'un oligomère stable composé de trois actine-G (étape de nucléation). Après polymérisation, l'activité ATPase de l'actine hydrolyse l'ATP liée en ADP. Les filaments d'actine sont ainsi polarisés et se polymérisent plus rapidement à leur extrémité chargée positivement, dite « barbue » qu'à leur extrémité chargée négativement, dite « pointue ». *In vitro*, cette polymérisation intrinsèque de l'actine filamenteuse varie selon la concentration en actine-G libre [8].

Dans la cellule, de nombreuses protéines associées à l'actine favorisent les étapes de nucléation ou d'élongation pour promouvoir la formation des filaments d'actine (Figure 1.3). Parmi ceux-ci, nous retenons le complexe protéique Arp2/3 qui par sa ressemblance avec l'actine agit comme une protéine de nucléation pour polymériser ou ramifier les filaments d'actine [9]. Le complexe Arp2/3 est principalement activé par les protéines SCAR/WAVEs de la famille WASP. Un autre exemple de nucléateur d'actine sont les Formines qui stabilisent des dimères d'actine-G préalablement couplés ou non à la Profiline [8]. Cette dernière protéine, tout comme la protéine CAP, favorise l'échange d'ADP en ATP sur l'actine-G. Par ailleurs, les filaments d'actine polymérisés peuvent aussi être stabilisés par la liaison aux protéines de Capping à l'extrémité « barbue ». À l'inverse, les filaments peuvent être désassemblés soit spontanément, soit par d'autres protéines régulatrices, telles que ADF/Cofiline [8].

Ces protéines régulatrices organisent les filaments d'actine en différentes structures cellulaires d'ordre supérieur. Ainsi des bottes de filaments d'actine parallèles vont constituer des filopodes [10], alors que des maillages denses de filaments d'actine vont former des lamellipodes au cortex cellulaire [11]. Par ailleurs, les filaments d'actine peuvent s'assembler avec la Myosine II pour former un réseau d'Actomyosine [12]. Ce réseau est responsable de la contractilité cellulaire, requise dans les fibres de stress durant la migration [12] ou dans l'anneau contractile durant la division des cellules [13]. Donc le remodelage dynamique des filaments d'actine est un acteur majeur de la morphogénèse cellulaire.

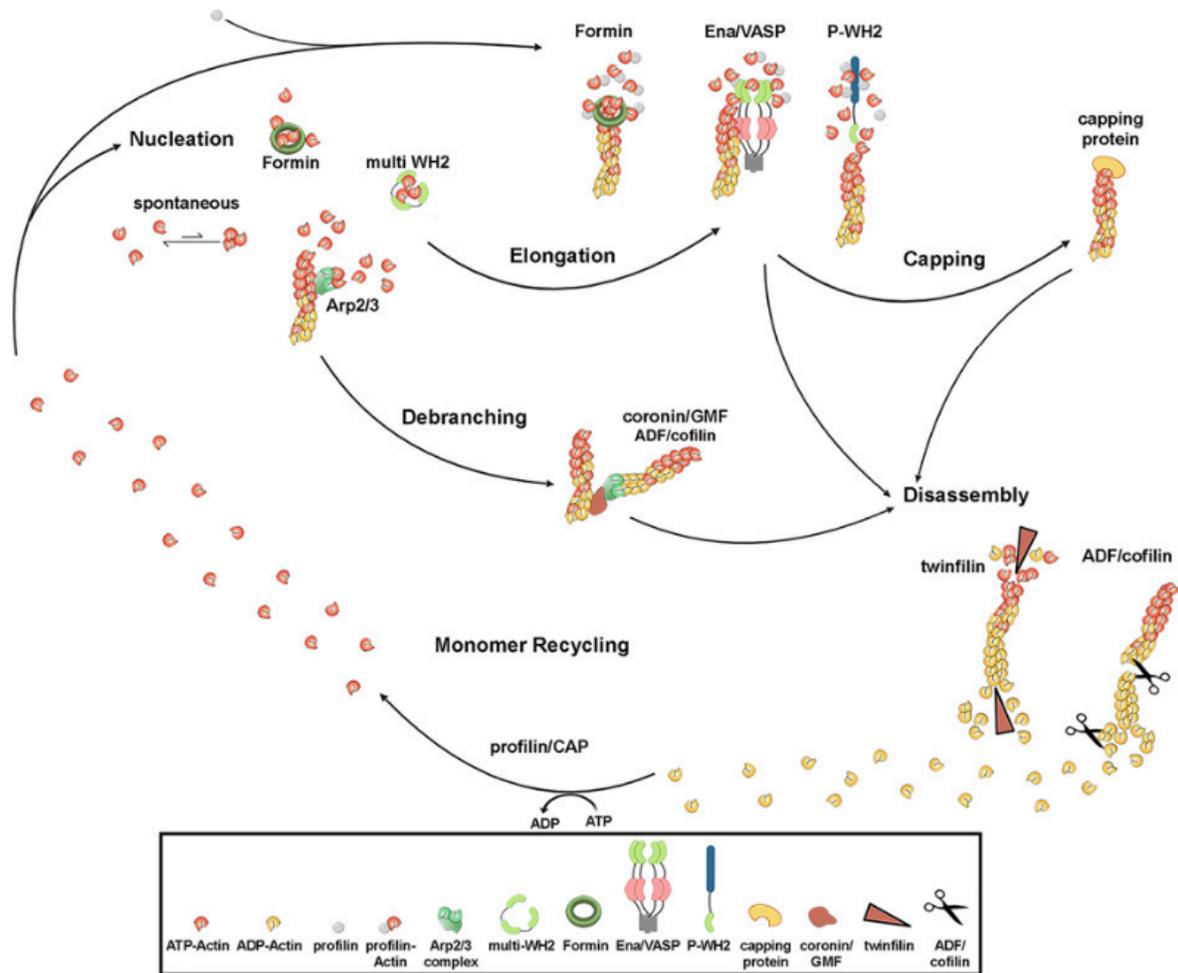


Figure 1.3 **Les principaux régulateurs de la dynamique de l'actine**

Divers facteurs, tels que le complexe Arp2/3, des Formines ou protéines contenant des domaines WH2 peuvent catalyser la nucléation des filaments à partir des monomères d'actine chargés d'ATP. Par la suite, des Formines, des protéines Ena/VASP ou des protéines hébergeant un module polyproline-WH2 allongent les filaments naissants. L'allongement peut être interrompu par des protéines Capping. Le branchement de filaments, créé par le complexe Arp2/3, peut être déconnecté par les protéines de la Coronine/GMF ainsi que les familles de ADF/Cofilines. Twinfiline catalyse le désassemblage des extrémités des filaments. La Profiline ou la protéine CAP recycle l'ADP-actine en ATP-actine, ainsi favorable à la polymérisation. Figure issue de © [8].

La dynamique des microtubules et ses principaux régulateurs

Alors que la dynamique des filaments d'actine est surtout mise en avant lors de la migration cellulaire, le remodelage des microtubules est la star durant la division cellulaire. En effet, les microtubules présentent une réorganisation dynamique au cours du cycle cellulaire. Les microtubules de l'interphase assurent le trafic intracellulaire et maintiennent l'architecture cellulaire. En mitose, les microtubules forment le fuseau

mitotique pour permettre la ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles [14].

Les microtubules sont formés suite à la dimérisation de tubulines α et β (étape d'élongation). Les dimères s'assemblent de manière polarisée en protofilaments linéaires, s'organisant ensuite en cylindres creux qui constituent les microtubules. De façon comparable aux filaments d'actine, c'est à l'extrémité positive que la tubuline β catalyse l'hydrolyse de GTP en GDP durant la polymérisation. Cette polymérisation dans la cellule requiert une étape de nucléation initiée par un anneau de tubuline γ au centre organisateur de microtubules (MTOC), le centrosome [15] (Figure 1.4A). Les microtubules peuvent aussi se polymériser dans le cytoplasme ou à l'appareil de Golgi [16].

L'équilibre dynamique entre la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules est appelé « catastrophe » lorsqu'il est en faveur de la dépolymérisation. La transition inverse est appelée « sauvetage » [15] (Figure 1.4B). L'équilibre peut aussi se stabiliser en état de « pause ».

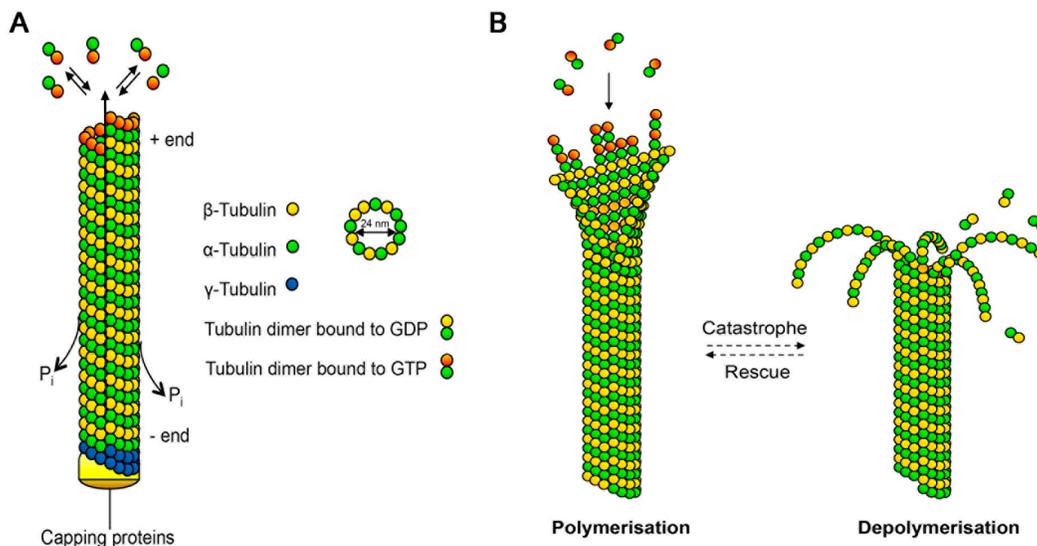


Figure 1.4 La polymérisation et l'équilibre dynamique des microtubules

(A) Les microtubules forment un cylindre creux nucléé à partir d'anneaux de tubuline γ , et composé d'hétérodimères de tubulines α et β . Ceux-ci s'assemblent de manière polarisée en protofilaments linéaires, avec la sous-unité de tubuline β associée à la GTP orientée vers l'extrémité positive en croissance. (B) L'équilibre dynamique existe en faveur de la polymérisation (état de sauvetage) ou en faveur de la dépolymérisation (état de catastrophe). Figure adaptée de © [15].

Des protéines associées aux microtubules (MAPs) influencent la dynamique des microtubules. Il y a des MAPs qui stabilisent ou stimulent la polymérisation, menant à un état de « sauvetage ». P.ex. la protéine Tau participe à l'organisation des microtubules dans les axones. L'absence ou dysfonctionnement de Tau peut causer des maladies neurodégénératives, dites « tauopathie », comme l'Alzheimer [17]. À l'inverse, d'autres MAPs déstabilisent les microtubules, favorisant l'état de « catastrophe ». C'est le cas de la sous-famille de Kinésine-13, dont MCAK qui favorise la réduction de la taille des microtubules dans le fuseau mitotique [18].

Enfin et de façon importante, des protéines motrices se déplacent le long des microtubules. Elles sont distinguées en deux familles de protéines motrices selon leur orientation: les Kinésines se déplacent vers l'extrémité positive formant un transport antérograde, et les Dynéines permettent le transport rétrograde de cargaisons vers l'extrémité négative des microtubules [19]. Les Dynéines forment un complexe stable avec la Dynactine multi-protéique [20]. Ces transports orientés le long des microtubules permettent la locomotion de vésicules intracellulaires, d'organites, de filaments intermédiaires, ou de chromosomes.

1.1.3 Les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette

Le remodelage dynamique du cytosquelette est l'acteur principal de la morphogénèse cellulaire. Toutefois, la « mosaïque fluide et hétérogène » qu'est la membrane plasmique joue un rôle central dans la coordination de la gymnastique du cytosquelette. Divers types de communications existent entre la membrane plasmique et le cytosquelette pour mener à bien les processus morphogénétiques.

Des voies de signalisation régulent l'organisation du cytosquelette. Les voies médiées par les petites Rho GTPase, RhoA, Cdc42 et Rac1 sont les plus connues [21]. Ainsi Rac1 p.ex. bascule entre une forme active à la membrane plasmique (grâce à une prénylation et des GEFs) et une forme inactive dans le cytosol dû à l'action de GAPs spécifiques [22]. Une fois activée, elle recrute entre autres les protéines WAVES responsables de l'activation du complexe Arp2/3 [23]. La ramification d'actine filamenteuse au cortex cellulaire peut ainsi générer des lamellipodes. D'autre part,

certaines protéines forment une interaction entre la membrane plasmique et des protéines associées au cytosquelette. P.ex. le complexe trimérique composé d'une petite protéine G associée à la membrane plasmique (G α i), LGN et NuMa recrute le complexe Dynéine-Dynactine pour stabiliser des microtubules astraux et ainsi orienter le fuseau mitotique [24]. Enfin, certaines protéines s'associent directement à la membrane plasmique et au cytosquelette sous-jacent. Les membres de la famille ERM lient ainsi les filaments d'actine et les microtubules, suite à leur interaction avec le Pi(4,5)P₂ et leur activation par phosphorylation (chapitre 1, section 3.2.2).

Au travers de ces exemples, nous retenons que l'organisation et la composition du cortex cellulaire dépendent de voies de signalisation complexes. Ainsi le cortex varie constamment pour répondre aux besoins cellulaires. Les sections suivantes vont illustrer ce propos à l'aide de mise en contextes plus concrets.

1.2 L'arrondissement cellulaire à l'entrée en mitose

1.2.1 Le cycle cellulaire et le rôle de la mitose

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes est divisé en 4 phases. La première phase de croissance G1 prépare la cellule à la réplication de son ADN en phase de synthèse S. La seconde phase de croissance G2 prépare la cellule à la mitose M. Les trois premières phases (G1, S, G2) constituent l'interphase, et peuvent être précédées d'un stade quiescent G0 hors du cycle cellulaire. Durant la dernière phase, la mitose, la cellule mère se divise pour former deux cellules filles génétiquement identiques. Pour ce faire, le changement de la forme cellulaire et la ségrégation des chromosomes sont précisément coordonnés. Une perte de coordination peut causer l'apparition de cellules filles mutées et cancéreuses. La composition du cortex cellulaire et les facteurs impliqués dans sa réorganisation durant la mitose jouent un rôle clé dans cette coordination. L'entrée en mitose est ainsi caractérisée par un réarrangement majeur du cortex cellulaire.

1.2.2 La gymnastique cellulaire à l'entrée de la mitose

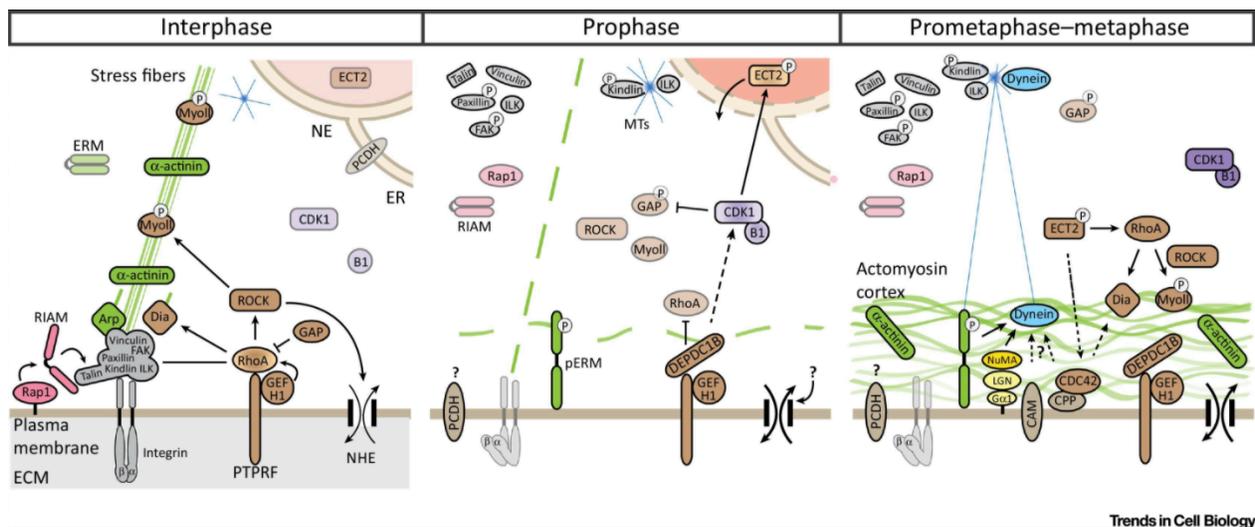
En interphase, les filaments d'actine sont organisés en diverses structures (fibres de stress, lamellipodes, filopodes). Lorsque la cellule eucaryote entre en mitose (**prophase**), ces structures se fragmentent et les filaments d'actine sont majoritairement délocalisés au cortex cellulaire. De même, les microtubules en interphase se dépolymérisent pour être recyclés aux centrosomes dupliqués et former des microtubules dits « astraux ». Ces événements s'accompagnent de changements au cortex cellulaire (Figure 1.5), tels que:

- (i) La dissociation des points focaux d'adhésion cause la dé-adhésion partielle de la cellule. Effectivement, en prophase, les protéines périphériques responsables de la formation de points focaux d'adhésion (Paxilline, Taline, FAK, Rap1), basculent dans le cytoplasme suite à leur inactivation [25, 26]. Il reste toutefois de fines fibres d'actine qui stabilisent les cellules en mitose [27].
- (ii) L'ancrage des microtubules astraux au cortex cellulaire organise le fuseau mitotique. Les ERMs basculent entre une forme inactive dans le cytoplasme et active à la membrane plasmique. En mitose, les ERMs sont majoritairement activés [28]. Ainsi ils stabilisent les filaments d'actine sous la membrane et lient les microtubules astraux [29-32]. Les ERMs régulent également la localisation du complexe trimérique Gai/LGN/NuMa au cortex [28].
- (iii) La délocalisation d'actine sous la membrane plasmique forme un réseau d'Actomyosine dense. Les effecteurs en aval de RhoA sont responsable de cette organisation [33]. En effet, RhoA activée stimule la Formine mDia pour stimuler la polymérisation d'actine. En parallèle, la kinase effectrice de RhoA, ROCK, phosphoryle la Myosine II. Cette phosphorylation active induit la contractilité corticale en mitose.

Le réseau d'Actomyosine augmente par sa contraction la rigidité corticale, nécessaire à l'arrondissement des cellules en mitose (**prométaphase**). De plus, la pression hydrostatique et le volume cellulaire augmentent à ce stade [34]. Par ailleurs, la membrane nucléaire se fragmente permettant ainsi aux microtubules «

kinétochoriens » de lier les kinétochores sur les chromosomes condensés en prophase. Alors que les microtubules astraux et polaires placent les centrosomes aux pôles, les microtubules kinétochoriens subissent des cycles successifs de polymérisation/dépolymérisation afin de déplacer les chromosomes. La **métaphase** est ainsi caractérisée par l'alignement des chromosomes sur le plan équatorial, grâce à l'organisation du fuseau mitotique stabilisé au cortex cellulaire rigide et arrondi.

Ces changements morphologiques sont rythmés par de nombreuses cascades de signalisation en aval de kinases et phosphatases. Toutefois, la coordination entre la progression mitotique et les changements morphologiques n'est pas encore totalement élucidée.



Trends in Cell Biology

Figure 1.5 Réarrangement du cortex cellulaire à l'entrée en mitose

Au cours de l'interphase, les points focaux d'adhésion (FA) contribuent à l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (ECM). Des fibres de stress ancrées à FA, comprenant des filaments d'actine et de la Myosine II, sont générées par les nucléateurs d'actine mDia1 et Arp2/3. Les petites GTPases RhoA et Rap1 favorisent l'assemblage des fibres de stress et l'intégrité des FA. Au début de la mitose, les FA et fibres de stress se désassemblent. La phosphorylation mitotique des composants FA contribue au désassemblage de FA. La perte d'adhérence permet un arrondissement mitotique et l'activation coordonnée de la kinase dépendante de la cycline B1 (Cdk1). L'activation des échangeurs Na/H (NHE) au niveau de la membrane plasmique contribue au gonflement et à l'arrondissement des cellules, ainsi qu'à une augmentation de la pression hydrostatique. La phosphorylation dépendante de Cdk1 de p190RhoGAP (GAP) et du RhoGEF ECT2, qui se déplace du noyau dans le cytoplasme, entraîne une activation globale de RhoA. Les GTPases RhoA stimulées par ECT2, favorisent l'assemblage du cortex d'actomyosine par l'activation de MyoII (via ROCK) et mDia1. Les protéines ERM activées assurent la fixation corticale de l'actomyosine en liant l'actine à la membrane plasmique. Le cortex d'actomyosine et les ERM phosphorylés participent au positionnement du fuseau mitotique avec d'autres facteurs de recrutement de la Dynéine localisés au niveau de la membrane plasmique. Figure issue de © [26].

1.2.4 Les cellules S2 de drosophile pour étudier la morphogenèse mitotique

La mouche à fruit *Drosophila melanogaster* est initialement connue pour les études génétiques sur l'hérédité menées par le Dr Thomas Morgan [35]. Cependant, depuis 1970 plusieurs techniques de recherche en biologie moléculaire et biologie du développement ont été mises au point. Depuis que son génome (~13 000 gènes codants) a été séquencé en l'an 2000, la drosophile est devenue plus attrayante pour la recherche fondamentale [36]. Effectivement, son génome contient environ 60% de gènes homologues à celui de l'humain (~35 000 gènes codants), dont beaucoup moins de paralogie. Ainsi la mouche est idéale pour étudier des voies de signalisation complexes et conservées, car elle permet d'éviter la redondance fonctionnelle entre les membres d'une même famille. Enfin, la drosophile présente un temps de génération court et de faibles coûts de maintenance. L'ensemble de ces critères place la mouche à fruit comme modèle de choix pour l'étude fondamentale sur la morphogenèse [37].

Les cellules Schneider 2 (S2) sont dérivées d'une lignée cellulaire de type macrophage, issue d'une culture d'embryon de *Drosophila melanogaster* au stade tardif [38]. Elles sont couramment utilisées pour étudier la division cellulaire. Parmi les mécanismes moléculaires cités précédemment, nous retenons ces principales similitudes et différences:

- (i) Les petites cellules S2 (~10 μm de diamètre) sont semi-adhérentes, et présentent une forme arrondie en interphase. À l'entrée en mitose, elles deviennent tout de même entièrement sphériques avec une rigidité corticale augmentée.
- (ii) La drosophile et l'homme partagent de nombreuses familles de protéines impliquées dans le cycle cellulaire [39]. Les principales cascades de signalisation en mitose sont hautement conservées par l'évolution.

Donc les cellules S2 sont un modèle de recherche adéquat pour identifier de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la morphogenèse mitotique.

1.3 La perte d'intégrité épithéliale durant la transition épithélio-mésenchymateuse

Après avoir illustré la plasticité du cortex de la cellule lors de sa transition en mitose, nous révisons désormais un processus fondamental au cours de la morphogenèse tissulaire: la transition épithélio-mésenchymateuse.

1.3.2 Le rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse

L'ensemble des modifications morphogénétiques qui permettent aux cellules épithéliales de devenir mésenchymateuses, est défini sous le nom « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM). Cette transition permet aux épithéliums de former la plupart des organes durant le développement embryonnaire. Chez l'adulte, la TEM dans un tissu sain est finement contrôlée pour répondre aux besoins, tels que la régénération tissulaire et la cicatrisation [40, 41]. De plus, pour maintenir l'intégrité du tissu sain, les cellules défaillantes subiront de l'apoptose. Cependant, dans un tissu cancéreux, les cellules défaillantes dont la mort cellulaire n'est pas induite subiront la TEM [42-44]. Ce processus morphogénétique favorise ainsi la cancérogenèse en donnant aux cellules épithéliales cancéreuses (ou carcinome) les capacités non-adhérentes, invasives et migratoires des cellules mésenchymateuses. Donc connaître les facteurs qui régulent l'intégrité épithéliale et la TEM est important.

La TEM implique de nombreuses modifications transcriptionnelles, menant à des changements morphologiques majeurs [40]. Sans rentrer dans les détails moléculaires, nous verrons les principales caractéristiques morphologiques de la TEM, car ils servent de marqueurs pour identifier ce processus biologique complexe (Figure 1.6).

1.3.2 La TEM est caractérisée par une perte d'intégrité épithéliale

La caractéristique principale du tissu épithélial est la polarisation apico-basale des cellules cylindriques ou cuboïdes qui le composent. Ainsi la surface apicale interagit avec l'environnement extérieur, alors que la surface basale est en contact avec la matrice extracellulaire à l'intérieur de l'organisme. Les membranes latérales des cellules épithéliales forment quant à elles des adhésions intercellulaires fortes [45]. Cette polarisation caractéristique dépend de la présence de nombreux complexes protéiques

qui organisent le cytosquelette aux différentes surfaces des cellules épithéliales [45]. Parmi ceux-ci, une ERM stabilise p.ex. le cytosquelette à la surface apicale pour former des microvillosités [46, 47]. Aux surfaces latérales, la glycoprotéine transmembranaire E-Cadhérine constitue le composant majeur des jonctions adhérentes des cellules épithéliales [48].

La TEM est caractérisée par la perte de cette polarité apico-basale et une dissociation de l'épithélium (Figure 1.6). Cela se traduit par la perte d'expression d'E-Cadhérine, et l'augmentation de l'expression de deux marqueurs mésenchymateux, N-Cadhérine et Vimentine [41, 49]. De plus, le réarrangement de ces protéines structurales s'accompagne de la réorganisation du cytosquelette, notamment par le biais des Rho GTPases [50]. Finalement, les cellules en transition expriment des métalloprotéases matricielles (MMPs) afin d'induire la dégradation de la matrice extracellulaire et se répandre dans le tissu sous-jacent [51]. Enfin, elles acquièrent également des capacités migratoires.

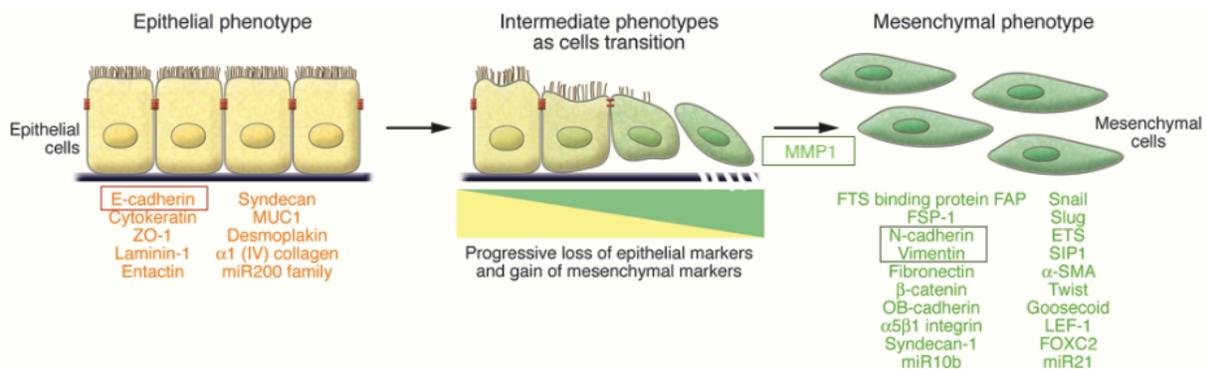


Figure 1.6 **Les phénotypes de la transition épithélio-mésenchymateuse**

La TEM implique une transition fonctionnelle de cellules épithéliales polarisées vers des cellules mésenchymateuses mobiles. Les marqueurs de cellules épithéliales et mésenchymateuses sont listés. Figure adaptée de © [40].

1.3.3 Le disque imaginal de l'aile de drosophile pour étudier l'intégrité épithéliale

Parmi les techniques de recherche en biologie du développement mises au point chez *Drosophila melanogaster*, la plus avantageuse pour l'étude de la morphogénèse est le système d'expression ciblée GAL4-UAS. En effet, ce système, conçu pour exprimer une construction d'intérêt de façon ciblée dans le temps et dans l'espace,

permet de surmonter les limites des mutations embryonnaires mortelles chez les mammifères [52]. L'utilisation de ce système dans les disques imaginaux de drosophile offre ainsi la possibilité d'étudier les mécanismes qui contrôlent l'intégrité épithéliale dans un contexte de développement [45]. Effectivement, les disques imaginaux sont des groupes de cellules épithéliales au stade larvaire, qui donnent naissance à des structures spécifiques de la mouche adulte, après la métamorphose.

Ainsi, le disque imaginal de l'aile est un sac épithélial qui se différencie en l'aile de la mouche. Ce sac épithélial est composé de deux épithéliums distincts et continus, séparés par une lumière interne. D'une part, l'épithélium dit « disque propre (DP) » est composé d'une couche unique de cellules cylindriques. D'autre part, la « membrane péripodiale (PM) » est constituée d'une seule couche de cellules épithéliales pavimenteuses. Le disque imaginal se différencie en réponse à un gradient de signalisation précis, qui va diviser le sac en compartiments antérieur (A) ou postérieur (P), et dorsal (D) ou ventral (V) [53]. Cette subdivision spatiale permet le développement précis d'une aile fonctionnelle de la mouche. Cette différenciation distincte reflète surtout l'expression de gènes spécifique (dits sélecteurs) dans chaque compartiment qui le compose [53]. Grâce à ces gènes sélecteurs et l'utilisation du système d'expression ciblée GAL4-UAS, des constructions d'intérêts peuvent être exprimées dans le compartiment de son choix, à un stade embryonnaire précis. Bien que le disque de l'aile de la drosophile a ainsi permis d'identifier plusieurs régulateurs de l'intégrité épithéliale, les cascades de signalisation sous-jacentes restent encore mal comprises.

1.4 La morphogenèse contrôlée par le biais des cytonèmes

La communication intercellulaire permet de maintenir une homéostasie durant le développement embryonnaire, la croissance ou le vieillissement de l'organisme. Les cellules utilisent une variété de mécanismes pour communiquer entre elles sur des distances courtes ou plus longues. Un mécanisme de plus en plus étudié dans la morphogenèse est le transfert de molécules de signalisation à distance grâce à des protubérances cellulaires. Plusieurs de ces protubérances ont été définies à ce jour: les nanotubes tunnels (TNTs), les ponts intercellulaires, et les cytonèmes [54]. Ces

dernières structures cellulaires ont été découvertes dans le disque imaginal de l'aile de drosophile [55].

1.4.1 La découverte des cytonèmes chez la drosophile

La drosophile comme modèle pour étudier la communication intercellulaire a révélé l'existence de gradients moléculaires qui spécifient différentes structures spatiales durant l'embryogenèse [56]. La molécule de signalisation qui induit cette différenciation spatiale selon son gradient de concentration est définie comme étant « un morphogène » [1, 57]. Ainsi, plusieurs morphogènes, tels que Wg (*Wingless*), Hh (*Hedgehog*) [58, 59], ou Dpp (*Decapentaplegic*, TGF- β) [60, 61] ont été caractérisés chez la mouche.

Initialement, des biomathématiciens ont proposé que le gradient de morphogène soit formé par une combinaison de diffusion et dégradation, pour induire une réponse cellulaire précise dans l'espace [1, 62]. Toutefois, cette modélisation soulevait plusieurs questions [63]. La nature des morphogènes, telle que la modification lipidique de Hh [64], n'était notamment pas cohérente avec le modèle de diffusion simple dans le milieu extracellulaire. Grâce au progrès dans les techniques d'imagerie, un nouveau type de structure cellulaire, appelé cytonèmes, a été identifié dans des cellules épithéliales au troisième stade larvaire [55]. Ces protrusions assurent le transfert de morphogènes à distance et forment un gradient de signalisation [65] (Figure 1.7). Cette découverte a remis en question la vision classique de la signalisation formée par simple diffusion [55]. Dès lors, la caractérisation des cytonèmes ne cesse de s'affiner.

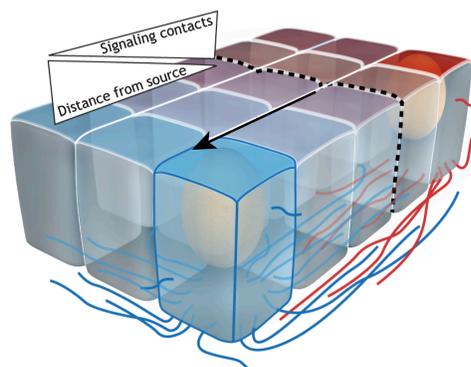


Figure 1.7 Les cytonèmes établissent un gradient de molécules de signalisation

Les cellules émettrices (rouges) et réceptrices (bleues) de signaux communiquent entre elles grâce aux cytonèmes durant le développement. Les cytonèmes génèrent la distribution spatiale des morphogènes et peuvent faciliter la dispersion graduelle (flèche) des signaux en fonction de leur étendue et de leur dynamique [65]. Ce gradient est également établi par les cytonèmes des cellules réceptrices [66]. Figure issue de © [67].

1.4.2 Les caractéristiques morphologiques des cytonèmes

Comme son étymologie l'indique, les cytonèmes (« cyto » signifie cytoplasme; « neme » signifie fils) sont de fines extensions cytoplasmiques. Ainsi, l'expression de la protéine fluorescente, soluble et cytoplasmique GFP a permis initialement de les observer [55]. Par leur composition à base d'actine filamenteuse, les cytonèmes sont considérés comme étant des filopodes. De plus, leur morphogénèse est sensible à l'inhibition de la polymérisation d'actine [65, 68-70]. À l'inverse, les cytonèmes ne contiennent pas de microtubules [67] (Figure 1.8A).

Dans le disque imaginal, les cytonèmes sont décrits comme étant des protubérances polarisés et orientés, mais n'atteignent pas toujours de points distincts. Ils se distinguent d'ailleurs des TNTs ou des ponts intercellulaires par leurs extrémités fermées [54]. Les protrusions observées *in vivo* ont une longueur minimale d'un diamètre de cellule $\sim 10 \mu\text{m}$ [65, 71], et les plus longs détectés étaient de $\sim 700 \mu\text{m}$ [55]. Ils ont une largeur d'environ $\sim 200 \text{ nm}$ [55, 68].

La particularité des cytonèmes est l'existence d'un trafic vésiculaire à l'intérieur ou le long de ces protubérances, qui forme des renflements membranaires [70, 71]. Alors que cela a été décrit dès leur découverte [55], ce trafic n'a été caractérisé que récemment pour le morphogène Hh. En effet, la vidéomicroscopie *in vivo* a permis de constater que plusieurs composants de la signalisation Hh se déplacent sur des structures ponctuées le long des cytonèmes [65, 68]. Par colocalisation avec le marqueur d'exosome CD63, il a été suggéré que Hh et Ihog (le corécepteur de Hh) soient transportés dans des précurseurs d'exosomes le long des cytonèmes [72]. Le fractionnement cellulaire et la microscopie électronique ont ensuite confirmé que Hh est effectivement contenu dans des vésicules extracellulaires (EV), des corps multivésiculaires (MVB) et à la membrane plasmique [72] (Figure 1.8B). Enfin, la technique de GRASP (qui permet d'imager les contacts membranaires aux synapses

[73]) a révélé que les cytonèmes forment des contacts comparables aux terminaisons synaptiques de neurones [70].

En conclusion, à ce jour les cytonèmes sont définis comme des filopodes spécialisés sur lesquels des vésicules extracellulaires contenant des molécules de signalisation se déplacent afin d'être sécrétées au niveau de synapses transitoires formées au contact de cellules cibles.

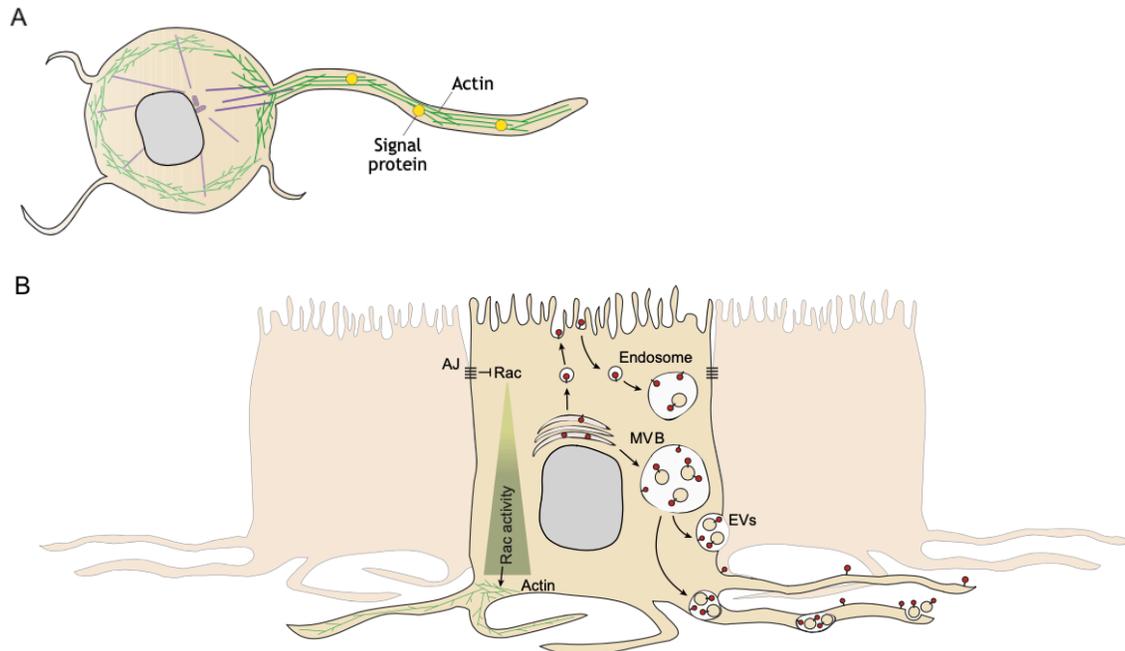


Figure 1.8 Les cytonèmes sont des filopodes spécialisés dans la signalisation

(A) Les cytonèmes ou filopodes de signalisation sont des extensions membranaires fermées à base d'actine. Ils peuvent contenir des microtubules à la base de la protrusion. **(B)** Dans le disque de l'aile, la sécrétion basolatérale de Hedgehog (Hh) est réalisée par un mécanisme de recyclage médié par des MVB depuis la surface apicale vers la surface basolatérale de l'épithélium. Les vésicules contenant Hh sont ensuite transportées par des cytonèmes et sécrétées au niveau de synapses. Figure adaptée de © [67].

1.4.3 Les caractéristiques fonctionnelles des cytonèmes du disque de l'aile

Différentes cellules de drosophile au troisième stade larvaire, telles que les myoblastes, les cellules trachéales, et les cellules épithéliales du disque de l'aile et de l'œil, forment des cytonèmes [67, 74]. Les types de cytonèmes se distinguent par le transport de composants associés à une signalisation spécifique [74]. Ainsi différents types de cytonèmes proviennent soit de cellules distinctes, soit d'une même cellule, mais avec des orientations opposées [74]. De cette façon, les cytonèmes induisent une

signalisation précise dans l'espace durant le développement embryonnaire. À ce jour, deux types de cytonèmes formés par les cellules épithéliales du disque alaire ont été identifiés:

- (i) Les cytonèmes de la surface apicale de l'épithélium DP sont responsables de la signalisation Dpp. En effet, ces cytonèmes décorés par le récepteur de Dpp, Tkv (*Thickveins*) sont orientés vers la rangée de cellules à la frontière des comportements A/P qui expriment Dpp [75] (Figure 1.9a). D'autres cytonèmes exprimant Tkv se projettent depuis des cellules épithéliales du sac aérien (ASP) vers la source de Dpp [74, 76] (Figure 1.9b). Enfin, des protubérances orientées dans l'axe D/V et atteignant les cellules de l'épithélium pavimenteux sus-jacent ont été décrites comme transportant Tkv [71]. La présence du marqueur d'endosome précoce Rab5 a confirmé le trafic vésiculaire le long de ces protrusions de ~10 µm. Cependant, ces structures ne sont pas identifiées à ce jour car elles expriment aussi le marqueur de microvillosités: Prominine-GFP. Durant l'embryogenèse, la signalisation Dpp participe à la différenciation dorso-ventrale du disque de l'aile [60, 61].
- (ii) Les cytonèmes de la surface basale de l'épithélium DP régulent la signalisation Hh (Figure 1.9c). Ces protubérances orientées dans l'axe A/P ont une taille variable de 20 à 80 µm [65, 75] qui corrèle avec le gradient de signalisation de Hh [65]. Les cytonèmes des cellules épithéliales du compartiment P transportent le morphogène Hh vers le compartiment A [65]. Tandis que l'orientation inverse est observée pour les cytonèmes qui transportent le récepteur de Hh, Ptc (*Patched*) et le corécepteur Ihog [70]. Hh est responsable de la différenciation antéro-postérieure, avec la formation de denticules uniquement sur l'épiderme antérieur de la mouche. La drosophile mutante pour *Hh* est entièrement recouverte de denticules, inspirant ainsi son nom anglais *Hedgehog* (hérisson) [77].

Les cytonèmes sont désormais considérés comme des structures essentielles qui contrôlent la morphogenèse de la mouche. Toutefois, l'absence d'un marqueur spécifique ne facilite pas leur identification et différenciation des autres protrusions de la membrane cytoplasmique.

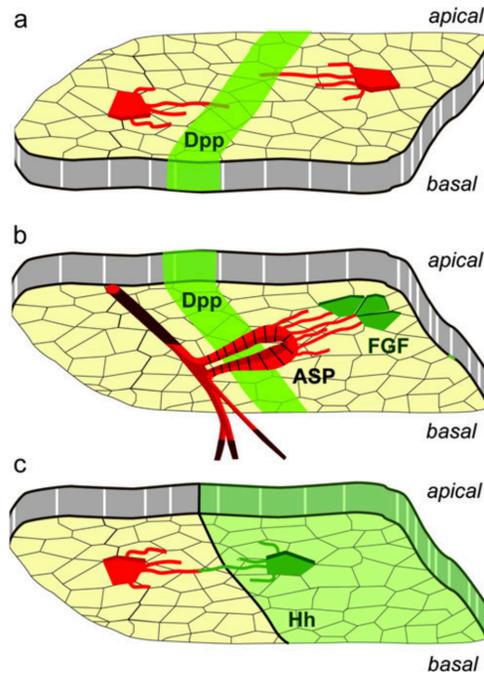


Figure 1.9 **Les différents types de cytonèmes des cellules épithéliales du disque imaginal alaire**

Les régions vertes présentent des cellules productrices de morphogène, les cellules rouges sont les cellules réceptrices. **(a)** Dpp est exprimé dans la région centrale (vert) du disque alaire et les cellules situées des deux côtés prolongent des cytonèmes apicaux contenant le récepteur Thickvein (Tkv) (rouge). **(b)** Les cellules épithéliales du sac aérien ASP (rouge) prolongent les cytonèmes contenant soit le récepteur Tkv pour entrer en contact avec les cellules exprimant Dpp, soit le récepteur de FGF pour entrer en contact avec les cellules exprimant le FGF dans le disque alaire (vert). **(c)** Hh exprimé dans les cellules du compartiment P (vert) est transporté par des cytonèmes basaux pour interagir avec les cytonèmes des cellules du compartiment A (rouge) contenant le récepteur Patched (Ptc). Figure issue de © [78].

1.4.4 Les régulateurs connus des cytonèmes

Les fines structures d'actine que sont les cytonèmes, sont sensibles aux méthodes de fixation classiques [55, 68]. Donc leur biogenèse est majoritairement étudiée par vidéomicroscopie. Ainsi des marqueurs du cytosquelette d'actine ou des marqueurs membranaires couplés à un fluorochrome ont permis de caractériser les cytonèmes ainsi que certains régulateurs [65, 71].

Les régulateurs du cytosquelette d'actine

Les cytonèmes sont des structures dépendantes de l'actine. La suppression individuelle des protéines SCAR/WAVEs, la Formine Diaphanous (Dia), la protéine Capping- α (Cp α), cause une diminution de la taille des cytonèmes *in vivo* [65, 69, 70].

Ces régulateurs, communs aux autres structures à base d'actine, affectent également la fonction de signalisation des cytonèmes [69]. De plus, le gradient apicobasal de l'activité de Rac contrôle la formation de filopodes à la surface apicale ou basale des cellules épithéliales du disque alaire [79]. L'activation constitutive d'une Rho GTPase atypique, RhoD, cause la formation de protrusions d'actine fines et non-adhérentes dans des cellules de mammifères [80]. Bien qu'il manque un marqueur spécifique qui permette de distinguer les cytonèmes des autres structures à base d'actine, la nucléation et polymérisation d'actine semble nécessaire à leur biogenèse.

Toutefois, d'autres travaux soutiennent l'effet inverse. En effet, les cellules S2 traitées avec de la Cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, présentent une élongation et un élargissement des cytonèmes [68]. Ce même traitement induit la formation de longues fines extensions cytoplasmiques, semblables aux cytonèmes, dans des neutrophiles humains [81]. Donc, il n'est pas encore établi comment l'actine participe à leur biogenèse.

D'autres régulateurs de la signalisation par les cytonèmes

Outre les protéines associées à l'actine, d'autres types de protéines sont impliqués dans la signalisation des cytonèmes. Premièrement, l'expression des morphogènes ou d'un composant associé à sa signalisation affecte la formation des cytonèmes. Ainsi, la surexpression de Dpp ou Hh induit l'extension de cytonèmes [68, 75]. Ensuite, des protéines impliquées dans la formation de vésicules extracellulaires, incluant des composants du complexe ESCRT, la protéine de recyclage endosomal Rab11, et la protéine membranaire Flotilline2, affectent la sécrétion de Hh et ainsi l'établissement de son gradient [72, 82]. De plus, des protéines d'adhésion synaptiques, telles que Neuroglian (Nrg) et Capricious (Caps) sont impliquées dans les contacts fonctionnels des cytonèmes *in vivo* [76]. Les protéines SNAREs essentielles à la fusion membranaire aux synapses, régulent également la sécrétion de récepteur Ptc [82]. Enfin, la perte de fonction de la Dynamine, une GTPase qui régule la fission de vésicules endocytées à la membrane plasmique, réduit la longueur et l'abondance des cytonèmes du sac aérien [76]. De manière contradictoire, l'inhibition chimique de la Dynamine, induit la formation de cytonèmes dans des neutrophiles humains [81].

Ces protéines régulatrices identifiées régulent également d'autres processus cellulaires distincts. À ce jour, les mécanismes moléculaires spécifiques à la morphogénèse et signalisation des cytonèmes ne sont donc pas connus.

1.4.5 Les cellules S2 comme modèle d'étude des cytonèmes

Des expériences préliminaires de culture de cellules isolées du disque imaginal de l'aile et de cellules S2 ont révélé l'existence de cytonèmes polarisés en culture [55]. Plus récemment, une nouvelle méthode de fixation a permis de détecter des cytonèmes fonctionnels dans des cellules S2 cultivées [68].

En effet, les cytonèmes caractérisés dans cette étude ont une longueur minimale de 2 μm , et allant jusqu'à 4 fois le diamètre de la cellule $\sim 40 \mu\text{m}$, avec une largeur moyenne de $\sim 230 \text{ nm}$ [68]. Comme décrit précédemment (section 1.4.4) ces structures à base d'actine étaient sensibles au traitement Cytochalasine D, mais pas à l'inhibition de la polymérisation de microtubules par le Nocodazole. Conformément aux résultats rapportés *in vivo*, les cellules dépourvues de la Formine Dia présentaient des cytonèmes de taille réduit. Enfin, le morphogène Hh et la protéine transmembranaire nécessaire à sa sécrétion, Disp (*Dispatched*), colocalisaient le long des cytonèmes. De plus, la détection de points distincts Hh-positifs dans des cellules avoisinantes suggérait la signalisation par le biais des cytonèmes. Bien que les cellules S2 n'expriment pas le facteur de transcription Ci (*Cubitus interruptus*) de Hh, nécessaire pour tester la communication intercellulaire, les résultats obtenus dans les cellules S2 récapitulent ceux obtenus *in vivo* [68].

La plus grande limitation actuelle dans le domaine est le manque de marqueur spécifique pour les différencier des autres protubérances cellulaires [54]. L'utilisation de cellules en culture comme modèle de recherche facilitera l'étude de la machinerie moléculaire spécifique à la biogénèse des cytonèmes, et qui potentiellement établira leur identification.

2. La kinase Slik régule la morphogenèse

La kinase Slik (*Sterile20-like kinase*) a été identifiée dans un crible génétique pour l'altération de la morphogenèse épithéliale chez la drosophile [83]. Depuis, il a été découvert que cette kinase de type Ste20 régule la morphogenèse à différents niveaux. En effet, Slik promeut l'organisation du cytosquelette au cortex cellulaire durant la division [29] ainsi que pour l'intégrité épithéliale [84]. Alors que ces dernières fonctions sont dues à son activité catalytique, Slik présente également une fonction non-catalytique dans l'induction de la prolifération de manière autonome et non-autonome [85]. Ainsi elle contrôle la croissance de la mouche à fruit [83].

2.1 Les fonctions catalytiques de la kinase Slik

La kinase Slik est impliquée dans l'organisation du cytosquelette au cortex cellulaire par le biais de son substrat, la dMoésine, l'unique orthologue des ERM_s chez la drosophile. Effectivement, la dMoésine est activée par phosphorylation suite à son association aux têtes polaires du $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ membranaire (chapitre 1, section 3.2.2). Dr Sébastien Carréno et Dr David Hipfner ont précédemment découvert que l'activité kinase de Slik est responsable de cette phosphorylation activatrice sur la Thr559 de la dMoésine (T559-dMoésine) dans les cellules S2 de drosophile et le disque imaginal de l'aile [29, 84, 85]. Cette voie de signalisation contrôle plusieurs processus morphogénétiques, tels que la morphogenèse mitotique (chapitre 1, section 2.1.1) et l'intégrité épithéliale (chapitre 1, section 2.1.2).

2.1.1 Slik contrôle la stabilité corticale durant la mitose

Dans les cellules S2 de drosophile, notre laboratoire a précédemment montré que la dMoésine contrôle la forme des cellules et l'organisation du fuseau durant la mitose [29, 32, 86]. Nous avons découvert que l'entrée de la mitose est caractérisée par une augmentation de la phosphorylation sur la T559-dMoésine au cortex de la cellule (Figure 1.10). Dans ces cellules, Slik est responsable du niveau basal de phosphorylation de la dMoésine en interphase et de l'activation spécifique de la dMoésine en mitose [29]. La dMoésine activée augmente la rigidité corticale en couplant les forces de l'actine filamenteuse à la membrane plasmique [29, 30]. Ainsi, la dMoésine

phosphorylée favorise l'arrondissement des cellules en métaphase. En anaphase, elle s'accumule à l'équateur pour former le sillon de clivage. De plus, elle est inactivée aux pôles par la phosphatase PP1-87B [86, 87]. Cette redistribution entraîne l'élongation polaire en anaphase et la cytokinèse en télophase.

Dans les cellules dépourvues de PP1-87B, la dMoésine suractivée rigidifie le cortex polaire en anaphase, empêchant ainsi l'élongation cellulaire et la cytokinèse (Figure 1.10). Par conséquent, des cellules deviennent polyploïdes [86]. Au contraire, dans les cellules dépourvues de la dMoésine, de Slik ou de $Pi(4,5)P_2$, le cortex est trop souple. Les cellules ne contrôlent alors pas correctement la morphogénèse mitotique et présentent des renflements cytoplasmiques anormaux [29, 86]. De plus, le fuseau mitotique est désorienté et cela peut causer de l'aneuploïdie dans les cellules filles. Donc la régulation spatio-temporelle de la dMoésine est essentielle au bon déroulement de la morphogénèse mitotique et le maintien de la stabilité génomique. Alors que les trois régulateurs sont connus, comment ils sont contrôlés durant la mitose n'est pas encore élucidé.

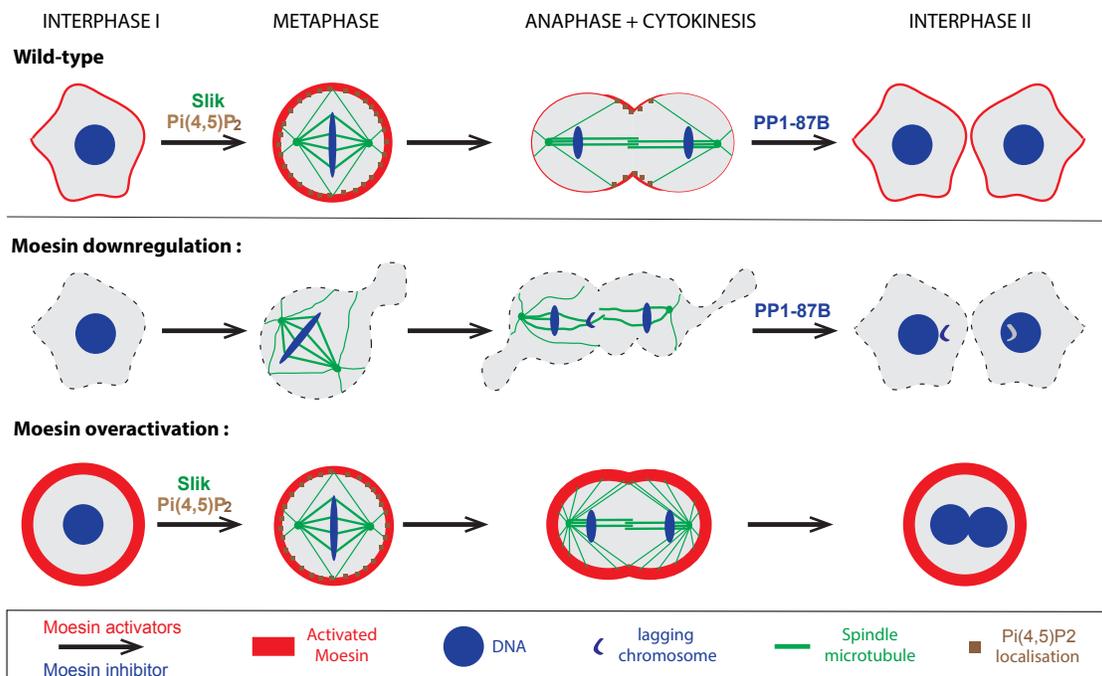


Figure 1.10 La régulation spatio-temporelle de la dMoésine phosphorylée par Slik

En rouge est illustré le niveau de phosphorylation de la T559-dMoésine au cours de la mitose dans des cellules S2 de drosophile. Dans les cellules sauvages, la kinase Slik est responsable du niveau basal de phosphorylation en interphase, ainsi que de l'augmentation à l'entrée en

mitose [86]. La phosphatase PP1-87B est responsable de l'inactivation de la dMoésine aux pôles en anaphase [87]. La perte d'activité de la dMoésine cause une perte de rigidité corticale accompagnée par une désorganisation du fuseau mitotique [29, 30]. À l'inverse, un gain de fonction de la dMoésine provoque une rigidité cellulaire excessive et de la binucléation [86, 87]. Figure réalisée par S.Carréno.

2.1.2 Slik contrôle l'intégrité du tissu épithéliale

La kinase Slik est également responsable du niveau de phosphorylation T559-dMoésine dans le disque imaginal de l'aile de la mouche [85]. Cette voie de signalisation contrôle le maintien du tissu épithélial [84, 88]. En effet, les protéines Slik et dMoésine colocalisent majoritairement avec l'actine corticale à la surface apicale de l'épithélium. Il a été montré que dMoésine est essentiel à l'organisation de l'actine filamenteuse à la surface apicale de l'épithélium [88]. Les cellules épithéliales dépourvues de la dMoésine perdent leurs caractéristiques épithéliales. En effet, les cellules mutantes qui sont triées à la base de l'épithélium, n'expriment plus de marqueurs de polarité cellulaire, et se comportent comme des cellules migratoires. Ces caractéristiques rappellent la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les larves dépourvues de dMoésine sont non-viables. Les phénotypes de TEM et létalité sont exacerbés par la diminution de l'expression de Rho1 [88].

En parallèle, Dr David Hipfner a révélé que les cellules épithéliales dépourvues de Slik sont triées à la base de l'épithélium et subissent de l'apoptose [84]. Lorsque la mort cellulaire est inhibée par l'expression du baculovirus anti-apoptotique p35, les cellules triées à la base de l'épithélium présentent une redistribution de l'actine filamenteuse et une perte d'expression de l'E-Cadhérine. Toutefois, la polarité apico-basale était maintenue dans les cellules mutantes restées dans l'épithélium [84]. Donc Slik participe au maintien du tissu épithélial, sans être essentielle à la polarité apico-basale. Enfin et de manière intéressante, une expérience de sauvetage a permis de vérifier que la perte de l'intégrité épithéliale en absence de Slik est due à son activité kinase sur la dMoésine. Effectivement, l'expression du mutant phosphomimétique (T559D) de la dMoésine restaure la morphogenèse tissulaire, ainsi que la viabilité des mutants [84]. Toutefois, les régulateurs en amont de cette voie catalytique sont méconnus.

2.2 La fonction non-catalytique de Slik

Lors d'études morphogénétiques du disque imaginal de l'aile, Dr David Hipfner a découvert que la surexpression de Slik cause une forte prolifération tissulaire lorsque l'apoptose est inhibée. De façon inattendue, cette prolifération cellulaire était indépendante de son activité catalytique [83] et de la dMoésine [84]. En effet, aussi bien l'expression de Slik sauvage (Slik^{WT}) que l'expression de son mutant catalytiquement inactif (Slik^{KD}) dans les cellules de l'épithélium proprement dit (DP) accroissent la réplication de l'ADN observé par incorporation du BrdU de ces cellules. De façon surprenante, cette prolifération accrue n'était pas restreinte aux cellules épithéliales DP exprimant Slik^{WT/KD}, mais elle se manifestait également dans les cellules de la membrane péripodiale (PM) sus-jacente [83]. Donc Slik induit une communication intercellulaire à distance, indépendamment de son activité catalytique (Figure 1.11).

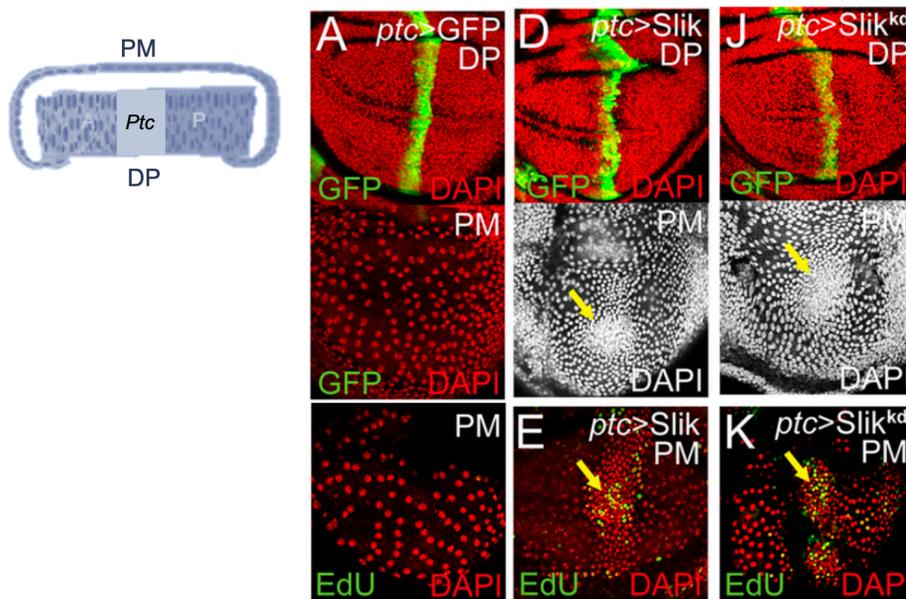


Figure 1.11 **Slik induit de la prolifération non-autonome**

Images confocales prises au niveau du disque des cellules proprement dites (DP) et des cellules à membrane péripodiale (PM) d'un disque d'aile dans lequel (A) GFP; (D) Slik ; (J) Slik^{KD} a été exprimée dans une bande centrale de cellules DP (verte) à l'aide du gène sélecteur *ptc*-GAL4. (A) Les couches de cellules DP et PM se distinguent facilement par le compactage serré des cellules DP (visualisées par coloration nucléaire avec DAPI) par rapport aux cellules PM étalées. Notez que *ptc*-GAL4 n'induit pas d'expression au centre du PM. (E, K) L'expression de Slik ou Slik^{KD} induite par *ptc*-GAL4 dans les cellules DP induit une prolifération ectopique des cellules PM sus-jacentes (indiquées par des flèches jaunes), comme en témoigne l'incorporation au EdU (vert). Figure adaptée de [85].

Dans le but de comprendre comment Slik promeut la prolifération cellulaire, l'équipe du Dr David Hipfner a fait plusieurs découvertes intéressantes. Premièrement, l'effet pro-prolifératif de Slik dépend de la MAP3K Raf, mais pas de la voie classique des ERK/MAPKs [83]. Deuxièmement, le domaine C-terminal de Slik (SlikCTD) est requis pour la localisation apicale de Slik et sa fonction de prolifération non-autonome. Toutefois, SlikCTD n'est pas nécessaire à l'activité kinase de Slik pour phosphoryler la dMoésine [85]. À l'inverse, les résidus sur le segment d'activation de Slik sont impliqués dans les fonctions catalytique et non-catalytique de Slik [85]. En effet, les mutations phospho-déficientes des résidus activateurs (section 2.3.3), causent une baisse de son activité kinase sur la dMoésine, ainsi qu'une suppression du phénotype de prolifération cellulaire excessive [85]. Donc, comment Slik induit la prolifération cellulaire de manière indépendante de son activité kinase reste une énigme à ce jour. En collaboration avec le Pr. David Hipfner, nous avons émis **l'hypothèse que Slik agit par le biais des cytonèmes (objectif 5.2)**.

2.3 Slik est une kinase Ste20 appartenant à la sous-famille GCK-V

2.3.1 La composition de la famille Ste20

Le génome humain code pour plus de 500 protéines kinase, et celui de la drosophile pour près de la moitié [89, 90]. Les kinases sont d'abord distinguées selon les résidus qu'elles sont susceptibles de phosphoryler: soit spécifiquement les acides aminés sérines et thréonines (Ser/Thr kinase) ou les tyrosines (Tyr kinase), soit tous ces résidus (kinases à double spécificité) [91]. Ensuite, les kinases qui partagent une forte identité sont regroupées en familles. Ainsi, les membres de la famille Ste20 (*Sterile20*) sont des Ser/Thr kinases qui contiennent un motif signature conservé (~10 acides aminés) dans le domaine kinase [92]. Cette famille a initialement été créée et nommée par homologie avec la protéine kinase Ste20p chez la levure [93].

Chez les mammifères, la famille Ste20 est composée de 28 Ser/Thr kinases classifiées en 10 sous-familles, dont 2 sous-familles de PAKs et 7 sous-familles de GCKs [94] (Figure 1.12). Les PAKs et les GCKs se différencient par la présence de leurs domaines kinases en C-terminal ou N-terminal, respectivement [92]. Tout comme leur

orthologue Ste20p chez la levure, la majorité des kinases de type Ste20 sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire par le biais de la cascade des MAPKs. Elles sont ainsi considérées comme des MAP4K [90]. Toutefois, plusieurs kinases Ste20 régulent d'autres voies de signalisation, telles que la mort cellulaire et le remodelage du cytosquelette.

Alors que cette diversité fonctionnelle contraste avec leurs domaines kinases bien conservés, elle pourrait s'expliquer par la variété des domaines non-catalytiques. En effet, les kinases relaient des signaux extracellulaires en phosphorylant des protéines cibles, appelées substrats, dans une cascade de signalisation. Pour reconnaître un nombre limité de substrats parmi les milliers de protéines présentes dans la cellule, les kinases disposent de différents domaines. D'une part, leurs domaines catalytiques reconnaissent des séquences consensus de phosphorylation, parfois à l'aide de sites d'interactions [95]. D'autre part, les domaines non-catalytiques de la kinase jouent un rôle clef dans le choix des substrats, par leurs recrutements, les interactions avec des protéines adaptatrices ou d'échafaudages, ou par la localisation des kinases [95, 96]. Les fonctions régulatrices de différents domaines non-catalytiques sont encore peu connues à ce jour.

Chez la drosophile, chaque sous-famille Ste20 est représentée par un orthologue unique (Figure 1.12), évitant ainsi les interférences fonctionnelles des homologues de la même sous-famille [92, 97].

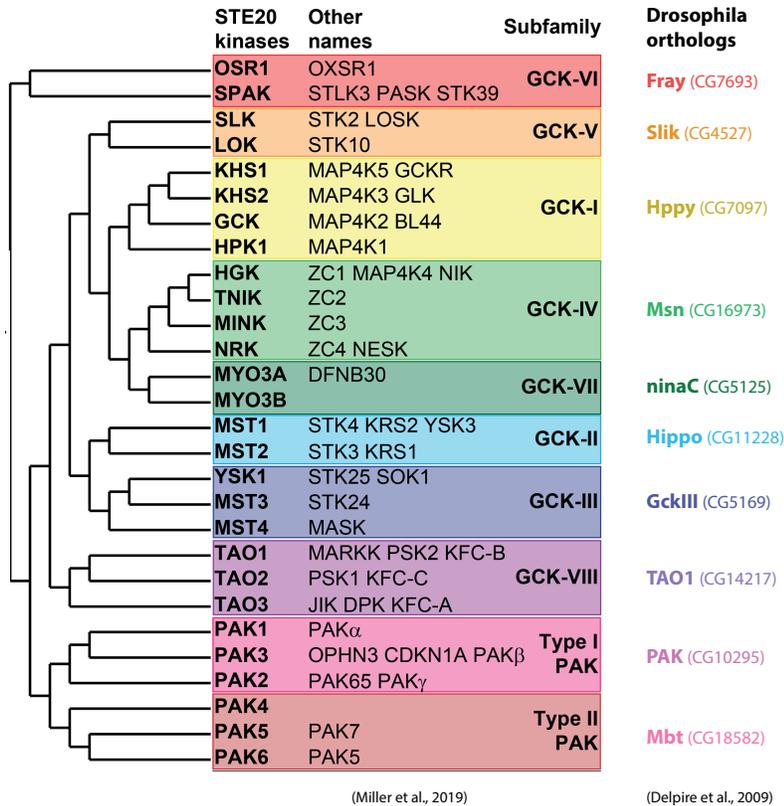


Figure 1.12 La composition de la famille Sterile20

Chez les mammifères, 28 Ser/Thr kinases sont divisées en 10 sous-familles sur base de leur identité [94]. Chez la *Drosophila Melanogaster*, il existe un orthologue unique par sous-famille, indiqué ici par son nom et son annotation CG# (Flybase) [97]. Figure adaptée de © [94].

2.3.2 La conservation des kinases GCK-V

Le motif signature présent dans les domaines kinases de Lok et Slik chez les mammifères ont révélé que ces kinases faisaient partie de la grande famille Ste20 [98, 99]. La drosophile présente un orthologue unique, Slik [83].

La similitude de séquence entre ces trois kinases est largement limitée à leur domaine catalytique (~60% d'identité et ~80% de similitude) et leur domaine C-terminal (CTD) (~40% d'identité et ~66% de similitude) (Figure 1.13). Ces deux domaines sont séparés par un domaine intermédiaire moins bien conservé (NCD) et de longueur variable [83]. Leur domaine catalytique présent en N-terminal catégorise ces trois kinases dans une sous-famille GCK. Toutefois, leurs domaines non-catalytiques (NCD et CTD) ne s'apparentent avec aucun autre membre de la famille Ste20, et les regroupent ainsi dans une sous-famille à part: GCK-V [92].

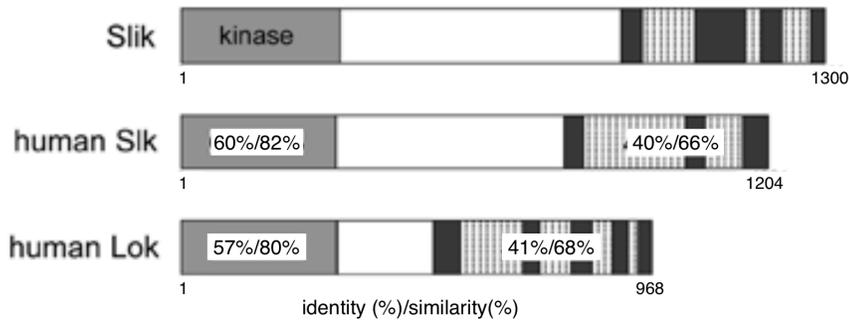


Figure 1.13 **La conservation par l'évolution des kinases GCK-V**

Comparaison de la kinase Slik avec les kinases SLK et LOK humaines. La taille des protéines en acides aminés est indiquée. Les pourcentages montrent une identité / similitude de séquence dans les domaines conservés. Les hachures dans le domaine C-terminal correspondent aux motifs coiled-coils. Figure adaptée de © [83].

2.3.3 La structure-fonction des kinases GCK-V

Le domaine kinase

Les domaines kinases sont responsables de la fonction catalytique des protéines kinase. En effet, ces domaines bien conservés par l'évolution catalysent le transfert du groupement phosphate de l'ATP vers un résidu Ser/Thr/Tyr de la séquence consensus reconnue. Les domaines kinases contiennent d'une part des motifs riches en glycine pour lier l'ATP, et d'autre part des sites de phosphorylation sur le segment d'activation pour stabiliser le domaine catalytique des kinases dans leur conformation active [100].

Effectivement, la phosphorylation d'un ou plusieurs résidus sur une région spécifique de 20 à 40 acides aminés du domaine kinase (appelé le segment d'activation) est un mécanisme de régulation commun dans les cascades de signalisation. Plusieurs kinases s'activent ainsi par autophosphorylation de leur segment d'activation, ou par transphosphorylation par d'autres kinases. Des analyses structurales par cristallographie, par ultracentrifugation et par mutagenèse dirigée des domaines catalytiques de Slk et Lok ont révélé qu'elles s'activent par *trans*-autophosphorylation suite à la dimérisation de leurs segments kinase [100]. Ainsi, induire l'homodimérisation des domaines kinases de Slk augmente l'activité catalytique *in vitro* de Slk sauvage. Comparativement, le mutant phospho-déficient des résidus

T183, S189 et T193 du segment d'activation de Slk présente une activité kinase réduite *in vitro* et *in vivo* [101, 102].

Slik possède trois résidus phosphorylables sur le segment d'activation. Le résidu T192 est conservé dans toutes les kinases Ste20, et constitue le principal site de régulation. Le résidu T186 est le moins bien conservé, et le mutant T186 seul n'affecte pas l'activité catalytique de Slik [85]. Toutefois, ces deux sites sont importants car la double mutation T186/192A abolit l'activité catalytique de Slik . Le troisième résidu T196 est également bien conservé parmi les kinases Ste20, et sa mutation seule T196A abolit également son activité catalytique. De façon intéressante, ces résidus sont également importants pour la fonction non-catalytique de Slik [85].

Le domaine non-conservé

Le domaine intermédiaire peu conservé de Slk s'apparente plus avec la protéine M-NAP (*microtubule and nuclear associated protein*) [103]. L'équipe du Dr Luc Sabourin a découvert que la kinase CK2 (*Casein Kinase 2*) phosphoryle directement deux résidus S347/348 sur le NCD de Slk [104]. La mutation de ces sites en résidus non-phosphorylable abolit la régulation de l'activité kinase de Slk par la kinase Src. Toutefois, la fonction de cette région intermédiaire peu conservée reste encore inconnue, du moins chez Slik.

Le domaine C-terminal

De nombreuses évidences indiquent que le CTD agit comme un domaine régulateur des kinases GCK-V. Premièrement, les kinases Slk s'homodimérisent par le biais des motifs *coiled-coil* présents sur le CTD [105, 106]. Des mutations dans ces motifs altèrent l'homodimérisation de la kinase et par conséquent réduisent son autophosphorylation et son activité kinase *in vivo* [102].

Deuxièmement, le CTD régule l'interaction avec d'autres voies de signalisation. Le laboratoire du Dr Anthony Bretscher a en effet révélé que le LokCTD s'associe avec les domaines FERM et C-ERMAD de l'Ézrine *in vitro* [107]. De plus, le LokCTD est nécessaire pour induire la phosphorylation *in vitro* de l'Ézrine sous sa forme entière. Les chercheurs proposent alors que le CTD agit comme un coin pour favoriser l'ouverture de

la molécule ERM et ainsi accéder à son résidu sur le C-ERMAD. De plus, l'ajout de quantité croissante de LokCTD inhibe progressivement la phosphorylation de l'Ezrine *in vitro* [107]. Le CTD agit donc soit comme un dominant négatif, soit comme un domaine auto-inhibiteur. D'autre part, le laboratoire du Dr Jean-François Côté a identifié que les 100 derniers acides aminés du SlkCTD sont nécessaires pour son association avec RhoA. De plus, cette interaction permet à la GTPase RhoA constitutivement active (RhoA^{G14V}) d'augmenter l'activité kinase de Slk envers son substrat ERM [108]. Cela semble conservé puisque l'expression de Rho1^{G14V} induit une augmentation de phosphorylation de la dMoésine, de manière dépendante de la kinase Slik. De façon intéressante, Rho1^{G14V} promeut également l'homodimérisation de Slik, mesuré par essais de proximité [108].

Enfin, le domaine CTD des kinases est responsable de leur localisation apicale dans les cellules épithéliales [47, 85]. En effet, Slik et Lok dépourvus de leur CTD sont cytoplasmiques et nucléaires, alors que l'expression de leur CTD seul est restreinte à la surface apicale.

2.4 Les fonctions morphogénétiques associées à Lok et Slk

Les homologues Lok et Slk ont majoritairement été étudiés de façon individuelle depuis leurs découvertes respectives, il y a plus de 20 ans. En effet, comme son nom l'indique, la kinase Lok (*Lymphocyte-oriented kinase*) a été identifiée dans les cellules précurseuses de lymphocytes murins [98]. D'ailleurs, les souris KO pour la kinase Lok présentent des défauts d'adhésion et de migration des lymphocytes T [109, 110]. Son orthologue humain (aussi appelé STK10) est exprimé dans plusieurs tissus avec une prédominance dans les tissus lymphoïdes [111].

Dr Luc Sabourin a identifié et caractérisé la kinase Slk chez la souris [99]. Durant le développement murin, Slk est exprimée dans les cellules souches embryonnaires et son activité est nécessaire pour la prolifération cellulaire et l'organogenèse [112]. Enfin, les analyses de l'ARNm suggèrent que Slk (aussi appelé STK2 ou LOSK) est exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères adultes [99, 113].

2.4.1 Les kinases Lok et Slk régulent l'activité des ERMs

Malgré certains rôles spécifiques, les kinases GCK-V remplissent de nombreuses fonctions morphogénétiques par le biais de leur substrat commun: les protéines de la famille ERM (chapitre 1, section 3).

Ainsi, Lok agit sur l'adhésion et la migration cellulaire potentiellement par le biais de l'activation des ERMs [110]. En effet, les souris KO pour cette kinase présentent des niveaux de phosphorylation des ERMs réduits dans les tissus lymphoïdes [110]. D'ailleurs, Lok accroît le niveau de phosphorylation des ERMs dans une lignée de lymphocytes T en culture, et cette activité entrave leur migration. Deuxièmement, les kinases Lok et Slk sont toutes deux responsables de l'activation de l'Ézrine dans les cellules épithéliales polarisées [47]. La suppression des kinases GCK-V cause une réduction majeure de la phosphorylation de l'Ézrine au cortex apical, et par conséquent entrave la biogenèse des microvillosités dans ces cellules [47]. Troisièmement, Slk phosphoryle les trois protéines ERMs *in vitro* [28]. Dans les cellules HeLa, les ERMs activés par Slk régulent la localisation du complexe trimérique Gai/LGN/NuMa et l'orientation du fuseau mitotique durant la division. Slk est ainsi impliquée dans l'organisation du cytosquelette à l'entrée en mitose [28].

2.4.2 Les autres effecteurs des kinases Lok et Slk

Les kinases de la sous-famille GCK-V régulent l'activité des ERMs dans différents processus morphogénétiques. Plusieurs études ont néanmoins découvert d'autres effecteurs des kinases Lok et Slk.

L'induction de l'apoptose

Le gène de Slk chez la levure avait initialement été nommé *Slk1* pour « *Synthetic lethal kinase* » par son identification dans un crible de létalité synthétique [114]. En effet, la mutation de ce gène dans des levures déjà affaiblies n'était pas viable. Chez les mammifères, l'expression du domaine kinase de Slk induit l'apoptose par l'activation des MAPKs, JNK1 et p38 [99, 101, 105, 115] (Figure 1.14). Pourtant, les kinases GCK-V n'induisent pas la cascade classique de signalisation des MAPKs [98, 99]. En effet et contrairement à la plupart des membres de la famille Ste20, Slk est activée suite à son

clivage par des protéases [116]. Ainsi l'activité apoptotique de Slk est augmentée dans des conditions de stress, comme montré dans les cellules rénales soumises à des lésions ischémiques aiguës [115, 117].

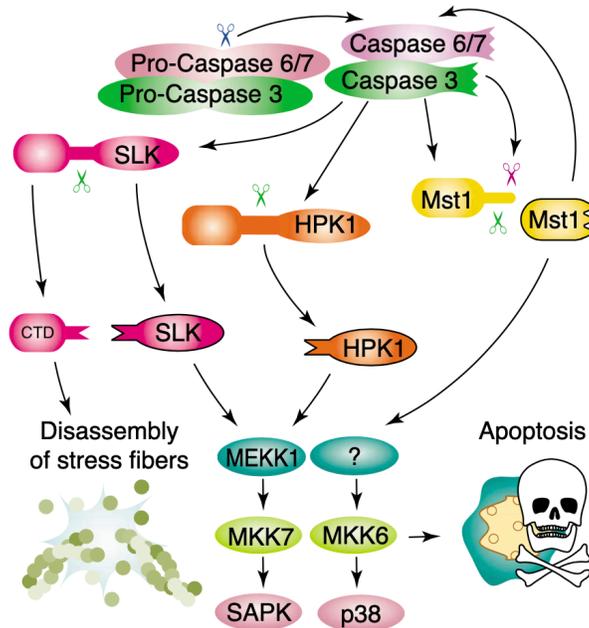


Figure 1.14 **Chaque domaine de la kinase Slk présente des activités distinctes**

Tout comme certaines autres kinases Ste20 (HPK1 et MST1), SLK est clivée par la Caspase 3 en réponse au stress [116]. La surexpression du domaine kinase de Slk induit la voie apoptotique SAPK (*Stress-activated protein kinases*)/JNK et p38. La surexpression du domaine C-terminal (CTD) induit la dissolution des fibres de stress dans le cytoplasme [116]. Figure adaptée de © [92].

L'organisation du cytosquelette

Initialement, le Dr Sabourin avait découvert que les domaines de Slk présentent des activités distinctes (Figure 1.14). D'une part, le domaine kinase de Slk induit l'apoptose et l'arrondissement des cellules de manière dépendante à son activité kinase [99]. D'autre part, le CTD de Slk promeut la dissolution des fibres de stress dans le cytoplasme, dépendamment de la GTPase Rac1 [116, 118]. En parallèle, des expériences de localisation et de co-sédimentation ont révélé que Slk est associée aux microtubules [103, 119]. Il a été montré que Slk contrôle l'organisation des microtubules radiaux dans les cellules HeLa en interphase, en phosphorylant une sous-unité du complexe Dynactine [120-122]. Par ailleurs, l'induction de la migration cellulaire dans des fibroblastes en culture, induit une redistribution de Slk avec les microtubules, Rac1

et la protéine d'adhésion Paxilline au front de migration [122-125]. De façon intéressante, la phosphorylation de S250-Paxilline par Slk est nécessaire pour le renouvellement des points focaux d'adhésion et la migration cellulaire [126].

Enfin, une interaction fonctionnelle complexe existe entre Slk et RhoA. D'une part, plusieurs résultats indiquent que RhoA est un effecteur de Slk. Par exemple, Slk phosphoryle la S188 de RhoA, causant l'inhibition de la contraction artérielle dans des cellules musculaires lisses [127]. Par ailleurs, la migration cellulaire altérée en absence de Slk est dépendante de RhoA et de sa kinase ROCK [122]. D'autre part, Slk a été récemment identifié comme effecteur de RhoA d'une manière évolutivement conservée. En effet, RhoA (ou Rho1 chez la drosophile) induit la phosphorylation des ERMs (ou dMoésine) de manière dépendante de Slk (ou Slik) [108].

La transition en G2/M

Lok et Slk ont un second substrat en commun, notamment la kinase mitotique Plk1 (*Polo-like kinase 1*) qui amorçe avec d'autres kinases mitotiques la transition G2/M. En effet, par homologie entre les domaines C-terminaux des kinases Lok, Slk et xPlkk1 de xénope, il a été découvert que Lok et Slk sont capables de phosphoryler la kinase Plk1 *in vitro* [111, 128]. Toutefois, l'activité et l'abondance des kinases GCK-V varient peu (Slk) ou pas (Lok) au cours du cycle cellulaire de cellules HeLa synchronisées [111, 128], alors que la Plk1 est activée par phosphorylation à l'entrée de la mitose. Les auteurs (Walter et al. 2013) proposent alors qu'il existe une autre forme de régulation de la kinase GCK-V.

3. ERM comme effecteur des kinases GCK-V

Les fonctions uniques de chaque kinase sont définies grâce aux différents modes de régulation en amont et aux substrats servant d'effecteurs en aval. Les kinases de la sous-famille GCK-V, tant Slik chez la drosophile que ses orthologues Lok et Slk chez les mammifères, ont comme substrats communs les protéines de la famille des ERMs.

3.1 La famille des ERMs

3.1.1 Les protéines ERM chez les mammifères

La famille des ERMs est composée de trois protéines étroitement apparentées chez les mammifères: l'Ézrine (nommé d'après sa découverte à l'Ezra Cornell University) [129]; la Radixine (du mot latin 'radix', qui signifie racine) [130]; et la Moésine (*membrane-organizing extension spike protein*) [131]. Elles ont été découvertes grâce à leur association au cytosquelette d'actine: l'Ézrine, isolée à partir des microvillosités d'entérocytes de poule [129]; la Radixine, identifiée comme composant des jonctions adhérentes dans les hépatocytes de rat [130]; et la Moésine, purifiée à partir de cellules musculaires lisses de l'utérus bovin [131, 132].

L'inactivation individuelle des ERMs chez la souris ne cause pas de létalité prénatale [133-136], suggérant une redondance fonctionnelle entre elles durant le développement. Malgré certaines fonctions non redondantes et des niveaux d'expression différents dans certains tissus, les ERMs sont effectivement co-exprimés dans la plupart des cellules. Elles agissent en réticulant la membrane cellulaire au cytosquelette d'actin et aux microtubules sous-jacents [137]. En effet, les ERMs lient directement des phosphoinositides [138] et des protéines de la membrane plasmique [139] aux filaments d'actine [137] et aux microtubules [28, 32]. Par cette fonction d'interaction, les ERMs transmettent le remodelage du cytosquelette à des structures membranaires spécifiques, et participent à la transduction de signaux extracellulaires [140-142].

3.1.2 L'unique ERM chez la drosophile, dMoésine

Le fonctionnement similaire et la co-expression des ERMs dans la plupart des cellules ne facilitent pas leur étude chez les mammifères. L'utilisation de la *Drosophile* comme organisme modèle possédant un unique gène ERM, *dMoésine*, a permis d'étudier son fonctionnement depuis 15 ans en évitant la redondance fonctionnelle [143]. Ainsi, les larves dépourvues de la dMoésine ne sont pas viables aux stades tardifs [88]. La dMoésine est bien conservée par l'évolution et présente jusqu'à 78% d'identité pour les domaines fonctionnels avec les ERMs, indiquant que ses domaines sont essentiels (Figure 1.15).

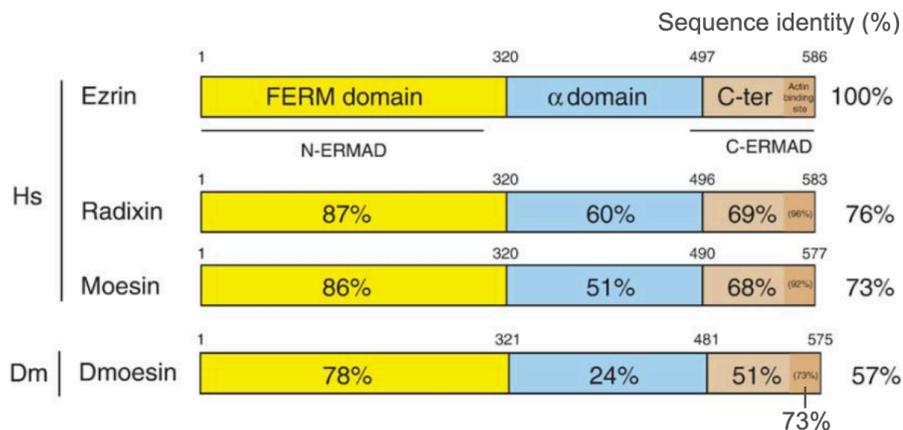


Figure 1.15 **Les protéines ERM sont hautement conservées par l'évolution**

Les identités de séquence globale de l'Ézrine, la Moésine et la Radixine humaine (Hs) et de la dMoésine de *Drosophila melanogaster* (Dm) sont indiquées. Le pourcentage d'identité de séquence pour chaque domaine informe que le domaine FERM (jaune) et le site de liaison de l'actine filamenteuse (brun) sont le mieux conservé. Figure adaptée de © [144].

3.2 Les ERMs sont activées par changement de conformation

3.2.1 La structure des ERMs

Les ERMs font partie de la super-famille des protéines 4.1, par la similarité de son domaine N-terminal (désormais nommé FERM, pour 4.1-ERM) avec d'autres protéines 4.1 [131, 145, 146]. Le domaine FERM des ERMs est suivi d'une longue région α-hélicoïdale et enfin d'un domaine C-terminal [131, 145]. Par les biais de ces domaines, les ERMs régissent l'interaction du cytosquelette cellulaire avec la membrane plasmique.

Le domaine FERM est responsable de la localisation des ERMs à la membrane plasmique, de la transduction de signaux extracellulaires, ainsi que de la liaison aux microtubules. Ce domaine de ~300 acides aminés est comparable à un trèfle par sa composition en trois sous-domaines globulaires F1, F2 et F3 [147, 148]. La fente chargée positivement entre les lobes F1 et F3 interagit par liaison ionique avec la tête polaire du $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ [138, 147]. Ainsi la mutation de résidus lysines sur les lobes F1 et F3 empêche cette liaison et altèrent la localisation subcellulaire des ERMs [149]. Chez les mammifères, la liaison au $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ permet aux ERMs de lier avec une plus grande affinité [139] des protéines d'adhésion membranaires, telles que CD43, CD44 et ICAM-2 [150, 151]. De plus, le domaine FERM lie par des sites distincts, plusieurs autres molécules de signalisation à la membrane plasmique, telles que EBP50 [152], la sous-unité régulatrice de Pi3-kinase, ou RhoGDI [139, 153]. Ainsi les ERMs sont impliquées dans d'autres voies de signalisation. Enfin et de façon importante, notre laboratoire a précédemment découvert que le domaine FERM lie directement les microtubules par deux résidus lysines conservés sur le lobe F3 [32].

Ensuite, la portion centrale de ~200 acides aminés forme une hélice de type *coiled-coil* antiparallèle [154]. La cristallographie de la Moesin de *Spodoptera frugiperda* entière a révélé une interaction entre le domaine FERM et une portion extensive de la région α -hélicoïdale lorsque la molécule est en conformation fermée [154] (Figure 1.16). Cette portion centrale est nécessaire au changement de conformation des ERMs [107].

Enfin, le domaine C-terminal de ~100 acides aminés, nommé C-ERMAD (*C-ERM Associated Domain*), est quant à lui capable de lier directement des filaments d'actine par ces 34 acides aminés terminaux [137]. Toutefois, ce site de liaison est masqué par des interactions non-covalentes entre le C-ERMAD et le FERM [148]. Les ERMs se trouvent ainsi en conformation fermée et « dormante », en monomère ou bien en homo- ou hétérodimères entre elles [155, 156]. L'activation des ERMs nécessite un changement de conformation pour démasquer les sites de liaison aux microtubules et à l'actine.

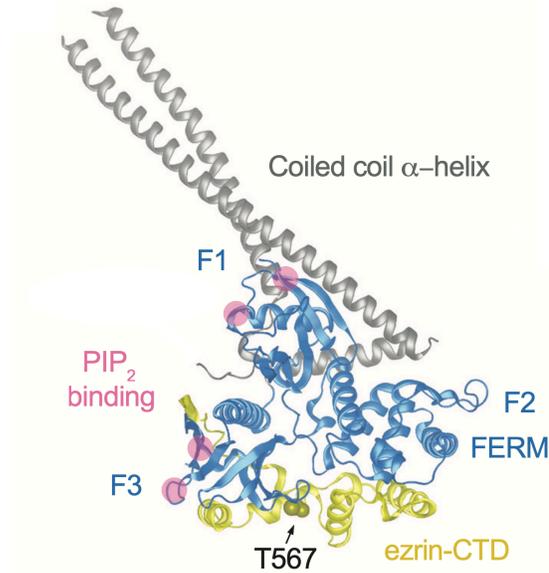


Figure 1.16 **La structure cristalline d'une protéine ERM en conformation fermée**

La structure cristalline de la Moésine de *Spodoptera frugiperda* [154]: Le domaine FERM est composé des lobes F1-3 (en bleu) et les résidus lysines de la fente entre F1 et F3 qui interagissent avec le $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ (en rose). La région α -hélicoïdale forme une spirale *coiled-coil* antiparallèle (en gris). Le domaine C-ERMAD (en jaune) avec le site de phosphorylation T567 de l'Ézrine. Figure adaptée de © [107].

3.2.2 L'activation des ERMs en plusieurs étapes

Le premier mécanisme d'activation des ERMs a été découvert en 1995, lorsque des études au cours du temps ont révélé une corrélation parfaite entre la phosphorylation des ERMs, leur colocalisation avec le cytosquelette et leurs fonctionnalités associées [157]. Le site de phosphorylation ensuite identifié est une thréonine conservée sur le domaine C-ERMAD: Moésine-T558; Ézrine-T576; Radixine-T564 [158]; ou leur orthologue dMoésine-T559 [84]. Sa phosphorylation marque leur activation, mais elle nécessite une étape au préalable.

En effet, des études biochimiques et biologiques ont proposé le modèle d'activation actuel en plusieurs étapes (Figure 1.17):

- (i) Les ERMs sont présentes en conformation dormante dans le cytoplasme, car les sites de liaisons sont masqués par l'association du FERM avec le C-ERMAD et l'hélice centrale [148, 154]. Par ailleurs, la structure cristalline indique que la thréonine conservée est inaccessible en conformation fermée [148].

- (ii) Pour leur activation, les ERM s lient d'abord le $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane plasmique. La structure cristalline du domaine FERM révèle que l'interaction avec le groupement phosphate IP_3 (inositol-1,4,5-triphosphate) du $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ cause un changement de conformation dans les lobes F3 et F2 [147, 159]. Par ailleurs, cette liaison au $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ est nécessaire pour la phosphorylation de la thréonine conservée [107, 160].
- (iii) Le changement de conformation permettrait l'accès aux kinases pour venir phosphoryler le site d'activation, tel que cela a été démontré pour Lok [107]. Cette phosphorylation stabilise l'ERM à la membrane plasmique en conformation ouverte. En effet, la thréonine conservée est localisée dans une région positivement chargée du C-ERMAD, à l'interface avec le coeur négativement chargé du FERM [148]. La structure indique que la phosphorylation favorise la conformation ouverte par répulsion électrostatique et encombrement stérique. Ces prédictions sont soutenues par la perte de fonction des mutants phospho-déficients TA [161], et le gain de fonction des mutants phosphomimétiques TD [160]. De plus, ce dernier phosphomutant est plus stabilisé à la membrane plasmique que sa forme sauvage, révélé par la méthode FRAP [162]. Les ERM phosphorylés stabilisent ainsi le cytosquelette d'actine et les microtubules à la membrane plasmique, et sont pleinement fonctionnels.

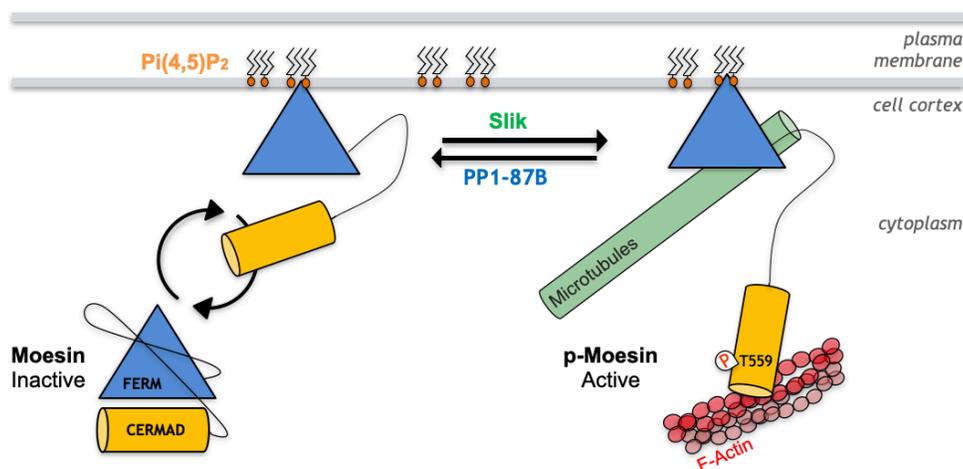


Figure 1.17 **Modèle d'activation de la dMoésine dans les cellules S2 de drosophile**
 Sur base des évidences biochimiques et biologiques faites sur les ERM et la dMoésine, nous proposons que la dMoésine soit activée par un changement de conformation en 2 étapes: (i) sa

liaison au $\text{Pi}(4,5)_2\text{P}$ à la membrane plasmique rompt l'interaction intramoléculaire entre les domaines C-ERMAD et FERM ; (ii) cette pré-ouverture permet à la kinase Slik de phosphoryler le résidu conservé T559 sur le domaine C-ERMAD. La dMoésine phosphorylée (p-dMoésine) est ouverte et active, car ses domaines de liaison à l'actine filamenteuse et aux microtubules sont ainsi fonctionnels. Figure inspirée de [107] et réalisée par C. De Jamblinne.

3.3 Les fonctions morphogénétiques associées aux ERMs

3.3.1 Les ERMs organisent le cytosquelette au cortex cellulaire

Les études de localisation, de perte ou gain de fonctions, et des analyses biochimiques chez les mammifères ainsi que chez la drosophile, indiquent que le rôle majeur des protéines ERMs réside dans l'organisation du cytosquelette au cortex cellulaire.

Tout d'abord, de nombreux résultats ont révélé que les ERMs régissent la formation et/ou le maintien de structures à base d'actine en périphérie cellulaire. Chez les mammifères, l'Ézrine est localisée sur des microvillosités de cellules épithéliales [129] et contrôle leur organisation au pôle apicale [47, 129, 157]. De même, la Radixine s'accumule et maintient l'organisation de stéréocils dans les cellules de l'oreille interne [163]. Chez la drosophile, la dMoésine polarise l'actine à la surface apicale des cellules épithéliales et maintient leur intégrité dans le tissu [88]. La dMoésine apicale régule également la formation des microvillosités dans les photorécepteurs de drosophile [164]. Les ERMs participent ainsi à la polarité apico-basale de cellules.

Ensuite, notre laboratoire a démontré que le domaine FERM de l'Ézrine et de la dMoésine co-sédimente avec des microtubules [32]. Cette interaction directe par le biais de 2 lysines conservées, est nécessaire pour organiser le fuseau mitotique lors de la division de cellules S2 [32]. De même, l'activation des ERMs régule l'orientation du fuseau mitotique dans des cellules HeLa en division [28]. Comme décrit précédemment (Chapitre 1, section 2.1), les ERMs participent activement à l'arrondissement cellulaire à l'entrée en mitose en couplant le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique [29-32]. Elles sont ensuite recrutées au sillon de clivage et participent au bon déroulement de la cytokinèse [86, 165]. Les ERMs organisent donc le cytosquelette cortical durant la mitose.

Enfin, les ERMs sont également localisés dans des podosomes, des fibres de rétractions et des filopodes. Elles régulent l'adhésion et la migration de cellules de mammifères [166, 167]. De plus, la suractivation ou surexpression d'ERMs est corrélée avec des capacités migratoires et invasives accrues dans plusieurs lignées cancéreuses [141, 168-173].

3.3.1 Les ERMs sont surexprimées dans plusieurs cancers

Le rôle des ERMs dans le cancer a suscité un intérêt accru surtout à cause de leurs similitudes avec la protéine Merlin (*Moesin/Ezrin/Radixin-like protein*) qui est codé par le gène suppresseur de tumeur NF2 [174-176]. Toutefois, la majorité des études révèlent que l'expression accrue des ERMs est défavorable à la survie des patients atteints de certains cancers. Ainsi, l'expression de l'Ézrine ou de la Moésine est associée à la progression de plusieurs cancers, tels que les carcinomes du sein [177-179], de l'ovaire [180], du cou et de la tête [181], et du larynx [182].

Des études indiquent même l'implication d'une ERM dans différentes étapes du développement d'un cancer spécifique. Pour l'Ézrine, l'un des plus documentés parmi ceux-ci est son rôle comme marqueur pronostique défavorable chez les patients atteints d'ostéosarcomes. Les niveaux d'expression d'Ézrine dans ce cancer corrént de façon significative avec la taille de la tumeur [183], le développement de métastases [184, 185], la résistance à la chimiothérapie [186], ou une mortalité accrue [187, 188]. Puisque l'Ézrine semble être impliquée dans différentes étapes du développement cancéreux et de la cascade métastatique de l'ostéosarcome, elle pourrait servir de cible thérapeutique [189]. La Moésine est par exemple plus exprimée dans le tissu de cancers pancréatiques. Son niveau d'expression corréle avec la capacité métastatique [190, 191] et à la gravité de ce cancer [192]. Enfin, la Radixine, à l'inverse de ses deux homologues, est sous-exprimée dans plusieurs tissus cancéreux (Human Protein Atlas). Toutefois, quelques études révèlent des profils d'expressions différents de la Radixine, tels que durant la progression de cancers de la prostate [193]. Bien que les ERMs soient de plus en plus définis comme des marqueurs pronostiques défavorables pour le cancer, nous ne connaissons pas encore précisément les voies de signalisation altérées.

4. Le complexe STRIPAK

Afin de découvrir de nouveaux régulateurs en amont de la dMoésine, nous (en collaboration avec Dr David Hipfner) avons effectué un criblage génomique dans les cellules S2. Parmi les potentiels activateurs de la dMoésine identifiés se trouvaient des composants du complexe dSTRIPAK (*Drosophila Striatin Interacting Phosphatase and Kinase*). L'objectif principal de mon doctorat était de comprendre **comment dSTRIPAK contrôle l'activation de la dMoésine (objectif 5.1.)**. Nous allons donc passer en revue la composition de ce complexe multiprotéique, et les interactions fonctionnelles connues à ce jour.

4.1 STRIPAK, le complexe phosphatase qui régule des kinases Ste20

4.1.1 La découverte du complexe STRIPAK

Les membres de la famille des Striatines sont considérées comme des sous-unités régulatrices (B^{'''}) de PP2A depuis la découverte qu'elles forment un complexe stable avec les sous-unités catalytiques et structurelles de PP2A [194]. Les Striatines étaient également associées à plusieurs protéines non-identifiées, suggérant qu'elles agissaient comme « des échafaudages moléculaires pour les complexes de signalisation PP2A » [194]. Bien que cette prédiction soit vraie, ce n'est que neuf ans plus tard que le laboratoire du Dr Anne-Claude Gingras identifie le large complexe multiprotéique assemblé autour de PP2A-B^{'''}/Striatines [195]. Les études protéomiques révèlent que le complexe est composé de l'hétérotrimère PP2A dont les Striatines, plusieurs protéines adaptatrices et les kinases de la sous-famille GCK-III [195]. Ce complexe a ainsi été nommé STRIPAK pour « *Striatin Interacting Phosphatase and Kinase* ». La détection d'une phosphatase et d'une kinase au sein du même complexe était particulière, et dès lors la question se posait « les kinases régulent-elles la phosphatase, ou vice versa? » [195].

À ce jour, de nombreuses études dans différents modèles de recherche ont témoigné de (i) la conservation de ce complexe à travers l'évolution; (ii) la fonction phosphatase de STRIPAK régule en effet l'activité des kinases associées ; (iii) toutes les kinases identifiées dans le complexe sont de type Sterile20 [196, 197]. STRIPAK régule

ainsi des voies de signalisation conservées, telles que la croissance et la survie des cellules, l'organisation du cytosquelette et le trafic vésiculaire.

4.1.2 L'hétérotrimère PP2A au cœur du complexe STRIPAK

PP2A est la plus abondante des Ser/Thr phosphatases dans les cellules eucaryotes. Elle forme différentes holoenzymes, dont la plupart sont des trimères, composés d'une sous-unité catalytique C, une sous-unité structurale A, et une sous-unité régulatrice B spécifique (Figure 1.18) [198]. Cette dernière détermine la spécificité des substrats et la localisation subcellulaire de PP2A. En raison de la variété de sous-unités régulatrices (B/B55, B'/B56, B'' et B'''), les holoenzymes sont impliquées dans une multitude de voies de signalisation [198]. PP2A dont la sous-unité régulatrice est la Striatine/B''' [194] s'organise en complexe d'ordre supérieur: STRIPAK [195]. L'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque [199, 200] ou par la perte de fonction de la Striatine [201-203] induit une hyperphosphorylation de plusieurs composants de STRIPAK. Les chercheurs ont ainsi suggéré que le complexe sert à orienter la fonction phosphatase de PP2A.

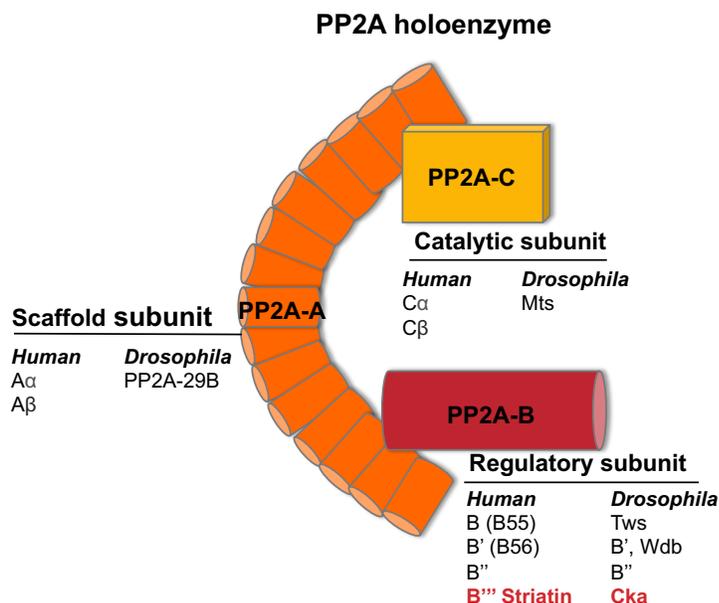


Figure 1.18 La Ser/Thr protéine phosphatase PP2A est hétérotrimérique

PP2A est composée d'une sous-unité structurale (A), d'une sous-unité régulatrice (B) et d'une sous-unité catalytique (C). PP2A-A est composée de 15 répétitions HEAT en tandem qui lient les sous-unités PP2A-C et PP2A-B [204]. Chez les mammifères il existe 2 isoformes α et β possibles de PP2A-A et PP2A-C. Chez la drosophile il existe une sous-unité de chaque,

PP2A-29B et Mts (*Microtubular star*) respectivement [205]. La sous-unité PP2A-B se compose de quatre classes: B (B55), B' (B56), B'' et B''' (Striatines), dont les orthologues chez la drosophile sont Tws (*Twins*), B' et Wdb (*Widerborst*), B'' et Cka (*Connector of kinase to AP-1*) respectivement. Figure réalisée par C. De Jamblinne.

4.1.3 Les Striatines forment le centre organisateur de STRIPAK

Les Striatines (STRN1/Striatine, STRN3/SG2NA, STRN4/Zinedine) sont centrales dans le complexe STRIPAK. En effet, elles agissent comme une chaperonne qui recrute PP2A-A/C, des protéines adaptatrices et des kinases au sein du complexe [206] (Figure 1.19). Ceci est possible grâce aux nombreux domaines d'interactions dont les Striatines sont composées.

En N-terminal elles ont un domaine de liaison à la Cavéoline et la Calmoduline, ainsi qu'un domaine *coiled-coil* [207]. Ce dernier permet aux Striatines de s'homo- ou hétéro-oligomériser. Cette dimérisation est essentielle pour son interaction directe avec la sous-unité structurelle PP2A-A [206, 208]. PP2A-A recrute ensuite PP2A-C au sein du complexe. Cette même portion est responsable de l'interaction avec les protéines STRIP, les protéines mutuellement exclusives SLMAP et SIKE1, et aussi les kinases GCK-II [206, 209]. Ensuite, les Striatines lient par leur portion intermédiaire directement CCM3, qui à son tour recrute les kinases GCK-III [206]. En C-terminal, les Striatines contiennent un domaine de répétition WD40, connu pour coordonner des assemblages complexes de protéines [210]. La portion intermédiaire et C-terminale sont responsables de l'association avec la protéine adaptatrice Mob3/4 [200, 206].

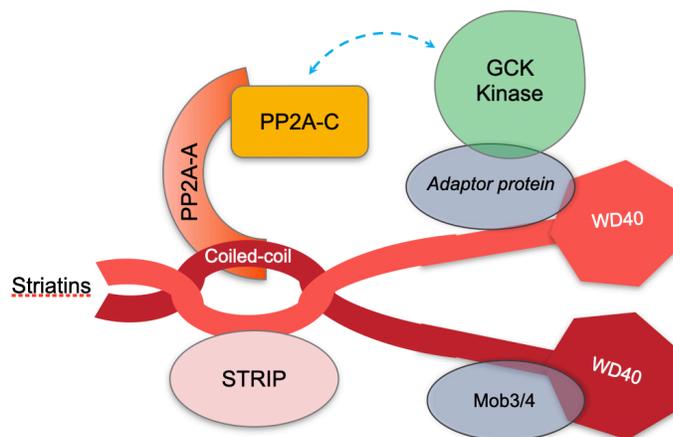


Figure 1.19 **Modèle de l'organisation structurale de STRIPAK**

Les Striatines homo-/hétéro-oligomérisées forment le centre organisateur du complexe en recrutant PP2A-A/C et STRIP par leur domaine *coiled-coil* N-terminale [206, 208]; les kinases GCKs directement (p.ex. GCK-II) [209] ou indirectement (p.ex. CCM3 lie GCK-III) par leur portion intermédiaire [206]; ainsi que d'autres protéines adaptatrices (Mob3/4) par leur domaine de répétition WD40 [200, 206]. Figure inspirée par [206] et réalisée par C. De Jamblinne.

4.1.4 Les protéines STRIP participent au recrutement de kinases

Au sein du complexe STRIPAK, des protéines non-caractérisées FAM40A et FAM40B ont été renommées STRIP1 et STRIP2 (*Striatins interacting proteins*) par leur interaction forte avec les Striatines [195]. Ces protéines de plus de 800 acides aminés ne présentent pas de domaines structurels prédictibles.

Plusieurs évidences fonctionnelles suggéraient que les STRIPs participent à l'échafaudage des kinases dans STRIPAK [211-213]. Récemment, des expériences de *GST-pull down* et de co-immunoprécipitation ont confirmé que STRIP1 recrute des kinases de manière phospho-dépendante au sein du complexe [209]. Nous considérons désormais que les composants PP2A-A (PP2A-29B chez la drosophile), PP2A-C (Mts, *Microtubular star*), les Striatines (Cka, *Connector of kinase to AP-1*), et les STRIPs (Strip) représentent la fonction phosphatase de STRIPAK, indiquée par PP2A_{STRIPAK}.

4.1.5 Les protéines adaptatrices

Mob3/4

Avant même l'identification de STRIPAK, la protéine Mob3/4 (*MOB-like protein phocein* ou mMOB1) avait été identifiée en complexe avec les Striatines [194]. De plus, elle est hyperphosphorylée en réponse à l'inhibition de PP2A par de l'acide okadaïque [199]. Plus tard, des analyses protéomiques l'ont identifiée comme un interacteur stable dans STRIPAK [195]. Toutefois, son rôle au sein du complexe n'est pas défini.

CTTNPB2/CTTNPB2NL ou SLMAP & SIKE1/FGOP2

Les protéines CTTNPB2/CTTNPB2NL, SLMAP et FGOP2 ont été identifiées dans les interactomes des Striatines et de Mob3/4. Des analyses protéomiques réciproques ont ensuite permis de déduire que STRIPAK établissait des interactions mutuellement exclusives avec ces protéines [195]. En effet, l'immunoprécipitation de CTTNPB2/NL

(*cortactin-binding proteins 2 / N-terminal*) ne contenait pas de quantités détectables de SLMAP, SIKE1 ou FGOP2 [195]. Comme son nom l'indique, une variante courte de CTTNBP2 (CBP90) interagit avec la Cortactine qui est capable de lier l'actine filamenteuse [214]. Toutefois, son rôle dans le complexe STRIPAK n'est pas connu.

D'autre part, l'immunoprécipitation de SLMAP (*sarcolemmal membrane-associated protein*) contenait les protéines apparentées SIKE1 (*Suppressor of IKKe 1*) et FGOP2 (*FGFR1 Oncogene Partner 2*), mais pas CTTNBP2/NL [195]. Des expériences biochimiques ont révélé que SIKE1 recrute SLMAP au sein du complexe, et celle-ci participe à son tour à l'échafaudage de kinases GCK de manière phospho-dépendante [202, 209]. Ce mécanisme est conservé par l'évolution, car les orthologues uniques chez la drosophile (SImap et Fgop2) recrutent la kinase Hpo dans le complexe [201, 202].

4.1.6 La conservation par l'évolution du complexe STRIPAK

Plusieurs recherches témoignent de la conservation de l'assemblage et de la fonctionnalité du complexe STRIPAK depuis les levures jusqu'aux mammifères [197]. En effet, chez la levure, l'interaction entre les orthologues de Strip et PP2A-A a été détecté par le système double hybride [215]. Chez le champignon, la Striatine humaine peut fonctionnellement remplacer son orthologue [216]. La *Drosophila melanogaster* exprime un orthologue unique de chaque composant de STRIPAK (Figure 1.20). Des analyses protéomiques dans les cellules Kc167 et des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules S2 ont permis de valider l'assemblage du complexe STRIPAK chez la drosophile, dont les kinases GckIII, Hpo (*Hippo*) et Msn (*Misshapen*) [201, 212]. Il n'est pas encore établis si d'autres kinases de type Ste20 sont associées au complexe.

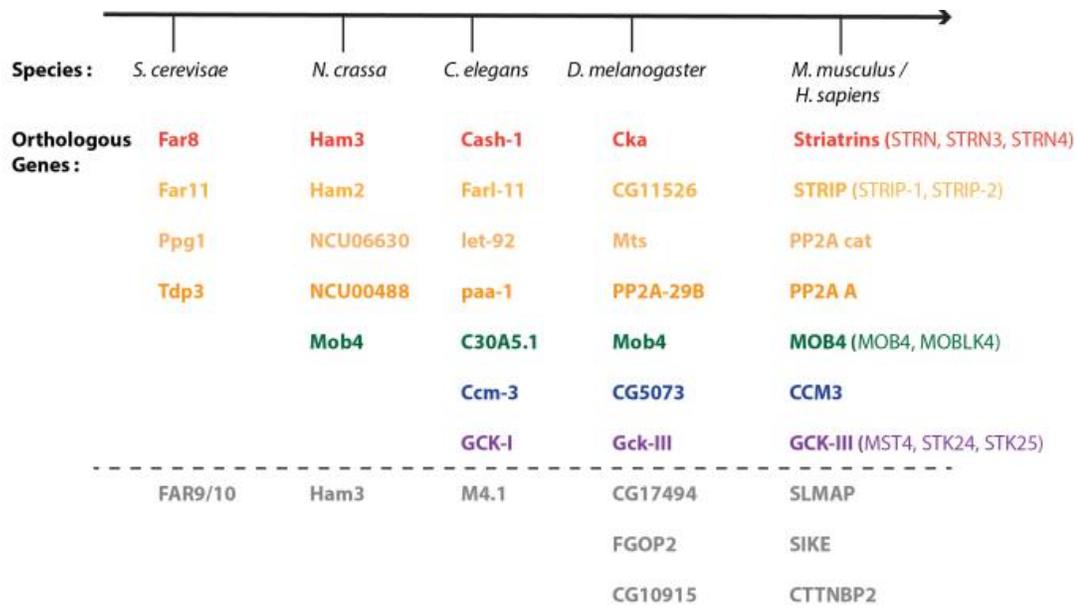


Figure 1.20 **La conservation par l'évolution des composants de STRIPAK**

Les orthologues aux composants du complexe STRIPAK dans les espèces indiquées par ordre croissant de complexité évolutive. Les orthologues sont codés par couleur pour correspondre aux groupes de paralogues humains et sont énumérés dans le même ordre. Figure adaptée de © [206].

4.2 Les interactions fonctionnelles au sein du complexe STRIPAK

La majorité des kinases Ste20 sont constitutivement activées par autophosphorylation de leur segment d'activation. Peu de voies régulatrices en amont des kinases Ste20 étaient connues jusqu'à la découverte de STRIPAK. Effectivement, l'activité phosphatase de STRIPAK (PP2A^{STRIPAK}) module les kinases Ste20 associées. À ce jour, les évidences expérimentales indiquent que PP2A^{STRIPAK} contrôle l'activité catalytique des kinases [200, 202], et/ou leur recrutement dans des sites spécifiques de la cellule [202, 206, 217]. Afin de passer en revue ces évidences expérimentales, je les ai classées par type de régulation pour chaque sous-famille GCK. Ces découvertes permettent d'estimer la complexité et variété des interactions fonctionnelles entre la phosphatase et la kinase au sein de STRIPAK.

4.2.1 Régulation des résidus activateurs de kinases par STRIPAK

La phosphorylation d'un ou plusieurs résidus sur le segment d'activation est un mécanisme de régulation commun dans les cascades de signalisation. Les kinases phosphorylées sur leurs résidus activateurs présentent ainsi une activité catalytique

accrue. Des chercheurs ont révélé que la Striatine orchestre la déphosphorylation des sites activateurs de la kinase GCK-III MST3 par PP2A [200]. En effet, l'inhibition chimique de PP2A par un traitement à l'acide okadaïque cause un retard de motilité sur gel d'électrophorèse de la kinase MST3. La mutation des sites activateurs de MST3 en Alanine non-phosphorylable abolit ce retard de motilité. De plus, la suppression des composants de PP2A^{STRIPAK} augmente la phosphorylation sur un site activateur des MST3&4 détecté à l'aide d'un anticorps spécifique [217]. STRIPAK régule ainsi négativement ces kinases GCK-III, impliquées entre autre dans le remodelage du réseau d'Actomyosine.

Deuxièmement, chez la drosophile, un crible génomique en combinaison avec une analyse protéique a permis d'identifier dSTRIPAK comme régulateur négatif de la voie de signalisation Hippo [201]. Cette voie est connue tant chez la drosophile que chez les vertébrés pour contrôler la taille des tissus, en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose [218]. La perte d'expression du complexe PP2A^{STRIPAK} (Cka et Mts chez la drosophile; STRN3 et STRIP1 chez les mammifères) entraîne une augmentation de la phosphorylation activatrice des kinases GCK-II (Hpo chez la drosophile; MST1&2 chez les mammifères) et par conséquent une hyperactivation de la voie Hippo *in vivo* [201, 209]. De plus, des analyses biochimiques ont confirmé que le domaine kinase de MST2 lie la Striatine et STRIP, alors que sa région intermédiaire lie aussi SLMAP de manière phospho-dépendante [209]. Par le biais de ces interactions, PP2A^{STRIPAK} induit la déphosphorylation des kinases GCK-II, et par conséquent régule négativement la voie Hippo [201, 202, 219].

Troisièmement, les cellules dépourvues de Striatine présentent des défauts mitotiques durant la cytokinèse, semblables à la perte de fonction de MINK1. Les chercheurs ont ainsi découvert que la surexpression de PP2A^{STRIPAK} réduit l'autophosphorylation et l'activité kinase de MINK1 (*Misshapen-like kinase*) *in vitro* [220]. Des expériences de co-immunoprécipitation ont indiqué que les membres de GCK-IV (MINK1/MAP4K6, MAP4K7/TNIK et MAP4K4/NIK/HGK chez les mammifères) sont capables de s'associer à une Striatine [220]. De plus, il a récemment été montré qu'une stimulation mitogénique induit le recrutement de MAP4K4 dans le complexe STRIPAK

[196, 203]. Cette association dépendante des Striatines, des STRIPs et de SLMAP, induit l'inactivation de MAP4K4 par PP2A_{STRIPAK}. Puisque MAP4K4, tout comme les kinases GCK-II, active la voie Hippo, le complexe STRIPAK agit comme un régulateur négatif de cette voie fondamentale dans le développement [196].

Enfin, Chen *et al.* ont récemment testé l'activité kinase *in vitro* de la majorité des membres de la famille Ste20 dans des cellules HEK (*Human embryonic kidney*) KO pour STRIP1/2 [196] (Figure 1.21). Conformément aux résultats décrits ci-dessus, les kinases appartenant aux sous-familles GCK-II, GCK-III, et GCK-IV sont suractivées en absence de STRIP1/2. La kinase Slk (GCK-V) fait également partie de cette catégorie de régulation. À l'inverse, les kinases des sous-familles PAK-I, PAK-II, et GCK-VIII, issues des cellules dépourvues de STRIP1/2, présentent une activité kinase réduite par rapport aux cellules contrôles. Enfin, d'autres kinases (GCKI et GCK-VII) n'étaient pas affectées en absence de STRIP1/2 [196].

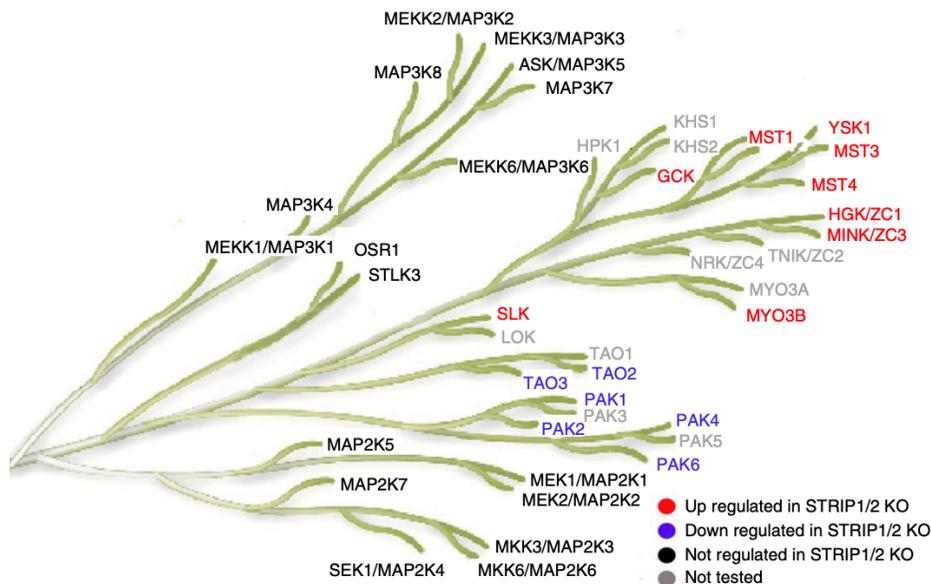


Figure 1.21 **STRIPAK régule l'activité catalytique de kinases Ste20**

Résumé des expériences d'essais kinase réalisées dans des cellules WT et KO pour STRIP1/2 qui expriment de manière transitoire les kinases indiquées. Les kinases ont ensuite été immunoprécipitées et leurs activités catalytiques ont été mesurées *in vitro* sur le substrat MBP (*Maltose-binding protein*). Figure issue de © [196].

4.2.2 Régulation de la localisation de kinases par STRIPAK

L'équipe du Dr Anne-Claude Gingras a montré que MST4 est échafaudée dans le complexe STRIPAK par le biais de la protéine adaptatrice CCM3 [206]. Dans les cellules contrôles, cette GCK-III est associée au Golgi et est responsable de son orientation périnucléaire (Figure 1.22A). Les cellules HeLa dépourvues de CCM3 présentent une localisation de MST4 restreinte au Golgi et celui-ci se dépoliarise lors de la migration cellulaire. À l'inverse, dans les cellules dépourvues de Striatines, la kinase MST4 était majoritairement diffuse dans le cytoplasme, et l'orientation du Golgi dans l'axe de la migration cellulaire était accentuée [206]. La première fonction associée à STRIPAK était ainsi la polarisation de l'appareil du Golgi par le biais de CCM3-MST4. Par ailleurs, des expériences d'immunofluorescence ont montré que la forme phosphorylée des kinases MST3&4 est enrichie à la surface extérieure du groupe de cellules A431. De plus, le recrutement périphérique de MST3-GFP est aboli en absence de CCM3 [217]. Donc la translocation de cette kinase à la surface est dépendante de STRIPAK.

Concernant les kinases GCK-II, MST2 est exprimée de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules contrôles. La surexpression de SLMAP recrute MST2 sur des structures ponctuées dans le cytoplasme [202]. De manière intéressante, le mutant phospho-déficient des résidus de la région intermédiaire de MST2 n'était plus délocalisé suite à l'expression de SLMAP (Figure 1.22B). Conformément à ces résultats, MST2 muté n'interagit plus à SLMAP testé par co-immunoprécipitation [202]. STRIPs et SLMAP recrutent effectivement la kinases MST2 au sein du complexe STRIPAK afin d'induire son inactivation par PP2A_{STRIPAK} [196, 209].

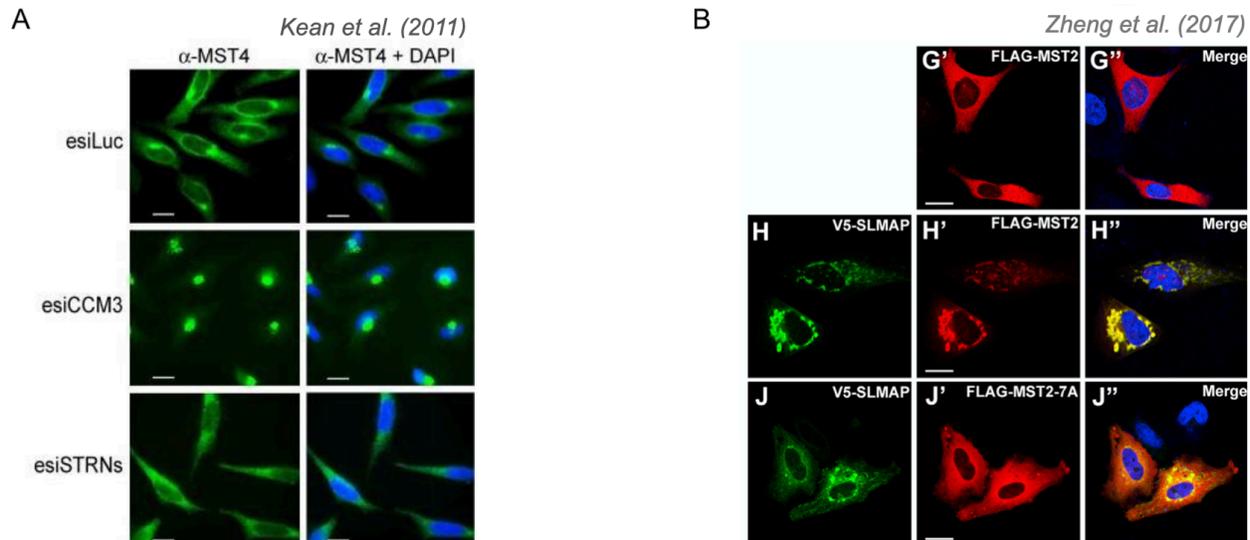


Figure 1.22 **STRIPAK régule la localisation de kinases Ste20**

(A) La suppression de CCM3 médiée par esiARN dans les cellules HeLa induit une localisation presque complète de MST4 dans l'appareil du Golgi périnucléaire. À l'inverse, la suppression des Striatines empêche cette localisation, et MST4 est diffuse dans le cytoplasme. La transfection des esiARN a été suivie d'une coloration par immunofluorescence de MST4 et DAPI. Barres d'échelle, 10 μ m. Figure issue de © [206]. (B) Localisation subcellulaire de MST2 et SLMAP. Les cellules HeLa exprimant les variants FLAG-MST2 indiqués (rouge) avec ou sans V5-SLMAP (vert) ont été visualisées par immunofluorescence de FLAG et V5. Notez la distribution cytosolique omniprésente de MST en l'absence de SLMAP co-exprimé. À noter également la colocalisation de MST2, mais pas le mutant phospho-déficient MST2-7A, dans des structures ponctuées en présence de SLMAP co-exprimé. Barres d'échelle, 25 μ m. Figure adaptée de © [202].

4.3 Les fonctions morphogénétiques associées à dSTRIPAK

Par le biais de ses kinases associées, nous venons de voir que le complexe dSTRIPAK est impliqué dans plusieurs processus morphogénétiques. Ici, nous allons examiner des fonctions du complexe mis en évidence chez la drosophile.

Premièrement, des études révèlent que dSTRIPAK contrôle le cytosquelette d'actine. En effet, un crible morphologique dans les cellules S2R⁺ de drosophile a identifié Strip comme protéine régulatrice du cytosquelette d'actine [221, 222]. Par ailleurs, la suppression de Strip ou Cka perturbait l'organisation de l'actine et la migration des cellules folliculaire de drosophile [217]. De plus, ces phénotypes étaient associés à une perte de phosphorylation de dMoésine. Conformément à ces résultats, les cellules de mammifères dépourvues des orthologues STRIP1 ou STRIP2 présentent un cytosquelette d'actine désorganisé et une migration cellulaire anormale [217, 221].

Toutefois, leur déplétion individuelle induisait des effets opposés sur la forme cellulaire et sur les niveaux de phosphorylation des ERMs.

Deuxièmement et comme décrit précédemment dSTRIPAK régule la voie Hippo qui contrôle le développement tissulaire [201, 202]. La perte de fonction de la kinase Hpo dans le disque imaginal de l'aile accroît ainsi la taille de l'aile chez l'adulte. Ce phénotype de croissance est restauré par la perte de fonction de Fgop2 et Cka [201]. D'autre part, un crible génomique dans les cellules S2 a identifié plusieurs composants de dSTRIPAK, dont Cka, Strip, Fgop2, Smap et Mob4, comme régulateurs positifs de la voie Ras/MAPK [212]. La perte de fonction de Cka *in vivo* abolit ainsi la prolifération excessive des photorécepteurs de l'œil induit par l'activation constitutive de Ras.

Dernièrement, les composants Strip et Cka sont associés au complexe macromoléculaire Dynéine-Dynactine dans les neurones de drosophile [223-225]. Dans les cellules S2, Strip régule le trafic des endosomes précoces [223] et la stabilité des microtubules [224]. Strip est ainsi impliquée dans l'élongation des axones et le branchement des dendrites chez la drosophile. En parallèle, il a été révélé que Cka, également associée à la Dynéine, régule le transport de vésicules le long des axones [225]. De plus, cette fonction est PP2A-dépendante. Chez les mammifères, des analyses protéomiques ont révélées que certains composants de STRIPAK, y compris les Striatines et les STRIPs, s'associent à la Dynéine [195, 226]. Enfin et conformément aux derniers résultats, les Striatines sont majoritairement exprimés dans les neurones [227] et leur présence est nécessaire à l'activité locomotrice et la croissance des dendrites chez les rats [228].

Le parallèle entre les évidences chez la drosophile et celles des mammifères suggèrent que des fonctions du complexe dSTRIPAK soient conservées par l'évolution. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas toujours établis.

5. Objectifs et stratégies expérimentales

5.1 Objectif 1: Déterminer comment le complexe STRIPAK active la dMoésine

5.1.1 Mise en contexte

L'objectif général du laboratoire du Dr Sébastien Carréno est d'approfondir nos connaissances sur la régulation des ERMs. En effet, les ERMs participent à la morphogenèse cellulaire durant la division, migration et l'adhésion, et également à la transmission de signaux extracellulaires. De plus, ils sont définis comme des marqueurs pronostiques défavorables dans plusieurs cancers. Barbara Decelle avait ainsi effectué un criblage génomique dans les cellules S2 de drosophile pour identifier de nouveaux régulateurs en amont de l'unique ERM, la dMoésine. Parmi les potentiels activateurs se trouvaient des composants du complexe dSTRIPAK. Kevin Leguay avait confirmé que les composants associés à la fonction phosphatase de dSTRIPAK étaient impliqués dans l'activation de la dMoésine en interphase et en mitose. Enfin, une analyse protéomique avait révélé l'association de composants de dSTRIPAK à la kinase Slik (résultat non publié).

5.1.2 Hypothèse et objectifs spécifiques

L'ensemble des données récoltées au démarrage de ma thèse suggéraient donc que dSTRIPAK contrôle l'activation de la dMoésine par le biais de Slik au cours du cycle cellulaire. L'objectif principal de mon doctorat était de déterminer comment dSTRIPAK active spécifiquement la dMoésine (**Chapitre 2**).

- Déterminer si dSTRIPAK régule la kinase Slik (expression, activité kinase, localisation)
- Tester si dSTRIPAK active la dMoésine par le biais de la régulation de Slik
- Examiner si dSTRIPAK régule les fonctions morphogénétiques associées à l'activation de la dMoésine par Slik: la morphogenèse mitotique (laboratoire du Dr Carréno) et l'intégrité épithéliale (laboratoire du Dr Hipfner).

5.2 Objectif 2: Comprendre comment Slik induit une communication à distance

5.2.1 Mise en contexte

Le laboratoire du Dr David Hipfner avait découvert que la kinase Slik présentait également une fonction non-catalytique impliquée dans la morphogenèse tissulaire. En effet, sa surexpression dans les cellules épithéliales du disque imaginal de l'aile induisait une signalisation de croissance dans des cellules sus-jacentes. En parallèle, des étudiants au laboratoire d'accueil avaient constaté que les cellules S2 surexprimant Slik présentaient des filopodes dynamiques. Le Dr David Hipfner nous a alors informés de l'existence de filopodes spécialisés dans la signalisation à distance: les cytonèmes.

5.2.2 Hypothèse et objectifs spécifiques

En collaboration avec le laboratoire du Dr David Hipfner nous avons ainsi émis l'hypothèse que Slik contrôlait la formation de cytonèmes pour induire sa signalisation à distance. Cela a mené à mon second objectif de thèse: caractériser la fonction de Slik sur la morphogenèse des cytonèmes dans les cellules S2 (**Chapitre 3**).

- Caractériser la présence de cytonèmes dans les cellules S2 en culture
- Examiner si Slik contrôle la morphogenèse des cytonèmes
- Tester si dSTRIPAK régule également les fonctions non-catalytiques de Slik sur la morphogenèse des cytonèmes (laboratoire du Dr Carréno) et la signalisation à distance (laboratoire du Dr Hipfner)

5.3 Stratégies expérimentales

Les cellules S2 de drosophile sont couramment utilisées pour étudier la mitose (Chapitre 1, section 1.2.4), et depuis peu un modèle adéquat pour caractériser les cytonèmes (chapitre1, section 1.4.5). Dans cette lignée cellulaire, les gènes sont facilement et efficacement éliminés par ARN interférents (ARNi). À l'inverse, les gènes d'intérêt fusionnés à un fluorochrome peuvent être exprimés dans les cellules S2. L'établissement de lignées stables est favorable pour contrôler le niveau d'expression,

et ainsi effectuer une caractérisation dynamique de leur fonction. Enfin, les phénotypes morphologiques associés aux effets de perte ou gain de fonction sont examinés par immunofluorescence ou par microscopie en temps réel. Les conditions contrôles sont importantes pour évaluer la variabilité des phénotypes. Pour étudier les voies de signalisation, l'ensemble des techniques biochimiques peuvent être effectués avec les cellules S2.

Dans un premier temps j'ai validé les outils de travail en évaluant la spécificité des anticorps, l'efficacité des ARNi, la disponibilité des constructions d'ADNc, et la préparation de solutions de lyse ou d'immunofluorescence adéquates pour l'étude de protéines membranaires. Doté des techniques établies au laboratoire, couplées au développement d'approches d'imagerie et biochimiques adaptées, j'ai ensuite analysé l'influence de dSTRIPAK et Slik sur le fonctionnement des cellules S2 en culture. J'ai ainsi découvert que dSTRIPAK contrôle l'activation de la dMoésine en régulant la localisation de Slik (Objectif 1). Par ailleurs, j'ai découvert que dSTRIPAK/Slik régule la biogenèse des cytonèmes dans les cellules S2 (Objectif 2).

En parallèle, le laboratoire du Dr David Hipfner, a tiré profit du système d'expression ciblée GAL4-UAS combiné au gène sélecteur *Patched (Ptc)* (Chapitre 1, section 1.3.3) pour étudier la fonction de dSTRIPAK et Slik spécifiquement dans une bande de cellules centrales du disque imaginal de l'aile (partie DP) au 3^e stade larvaire de la mouche. Son équipe a ainsi validé l'interaction génétique entre dSTRIPAK et Slik pour l'activation de la dMoésine (Objectif 1). De plus, ils ont montré que dSTRIPAK est un nouveau régulateur de l'homéostasie tissulaire en contrôlant l'intégrité épithéliale (Objectif 1), et la signalisation de croissance induite par Slik (Objectif 2).

Ces deux objectifs combinés ont mené à la découverte que dSTRIPAK régule les fonctions catalytiques et non-catalytiques de la kinase Ste20 Slik. Le complexe dSTRIPAK est ainsi impliqué dans des processus morphogénétiques importants.

**CHAPITRE 2: STRIPAK régule la localisation de Slik
pour contrôler la morphogenèse mitotique et l'intégrité
épithéliale**

1. Résumé

Les protéines étroitement apparentées ERM (Ézrine, Radixine, Moésine) régulent des processus cellulaires essentiels, tels que la rigidité corticale durant la division ou la polarité cellulaire durant la migration [31]. Ces événements ont des répercussions sur le développement et la différenciation tissulaire [2]. De plus, la surexpression ou suractivation des ERMs dans certaines lignées cancéreuses leur confèrent des capacités métastatiques [142, 229, 230]. Il est donc important de comprendre comment les ERMs sont régulés.

Le laboratoire d'accueil ainsi que celui de notre collaborateur Dr David Hipfner ont précédemment découvert que la dMoésine, le seul orthologue des ERMs chez la mouche, est activée par phosphorylation d'une thréonine conservée par la kinase Ste20 Slik. Cette voie de signalisation est essentielle pour contrôler la forme des cellules S2 durant leur mitose [29, 86] et maintenir l'intégrité des tissus épithéliaux des disques imaginaux de l'aile [84, 88]. Toutefois, comment Slik est elle-même régulée dans le temps et dans l'espace reste une énigme.

Dans un criblage génomique pour découvrir de nouveaux régulateurs de la phosphorylation de la dMoésine, nous avons identifié le complexe dSTRIPAK (*Drosophila Striatin Interacting Phosphatase and Kinase*) comme potentiel activateur. Ce complexe phosphatase contrôle l'activité de ses kinases associées et est ainsi impliqué dans des voies de signalisation conservées, telles que la prolifération et la survie des cellules, le remodelage du cytosquelette, la dynamique des voies endocytaires [197].

Dans notre travail actuel, nous avons identifié que Slik est une nouvelle kinase associée au complexe dSTRIPAK. De plus, nous avons révélé que l'activité phosphatase de dSTRIPAK réduit la phosphorylation de Slik pour promouvoir sa localisation au cortex et l'activation appropriée de la dMoésine. Conformément à cette découverte, l'inhibition de l'activité phosphatase de STRIPAK provoque des défauts de morphologie cellulaire durant la mitose et affecte l'intégrité du tissu épithélial. Nos résultats impliquent ainsi le complexe STRIPAK/Slik dans le contrôle de différents processus morphogénétiques.

2. Article

STRIPAK regulates Slik localization to control mitotic morphogenesis and epithelial integrity

Camille De Jamblinne^{1,4}, Barbara Decelle¹, Mehrnoush Dehghani^{2,3}, Mathieu Joseph^{2,4}, Neera Sriskandarajah^{2,3}, Kévin Leguay^{1,4}, Basile Rambaud^{1,4}, Sébastien Lemieux^{1,5}, Philippe P Roux^{1,4,6}, David R Hipfner^{2,3,4,7,§} and Sébastien Carréno ^{1,4,6,§}

¹ Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Canada.

² Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Canada.

³ Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Canada.

⁴ Programmes de biologie moléculaire, Université de Montréal, Canada.

⁵ Département de Biochimie, Université de Montréal, Canada.

⁶ Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Canada.

⁷ Département de Médecine, Université de Montréal, Canada.

§Corresponding authors:

Sébastien Carréno sebastien.carreno@umontreal.ca, David Hipfner david.hipfner@ircm.qc.ca



STRIPAK regulates Slik localization to control mitotic morphogenesis and epithelial integrity

Camille De Jamblinne, Barbara Decelle, Mehrnoush Dehghani, Mathieu Joseph, Neera Sriskandarajah, Kévin Leguay, Basile Rambaud, Sébastien Lemieux, Philippe Roux, David Hipfner, and Sébastien Carréno

Corresponding Author(s): Sébastien Carréno, University of Montreal and David Hipfner, IRCM

Review Timeline:

Submission Date:	2019-11-11
Editorial Decision:	2019-12-06
Revision Received:	2020-07-17
Editorial Decision:	2020-08-07
Revision Received:	2020-08-13

DOI: 10.1083/jcb.201911035

2.1 Abstract

Proteins of the Ezrin, Radixin and Moesin (ERM) family control cell and tissue morphogenesis. We previously reported that Moesin, the only ERM in *Drosophila*, controls mitotic morphogenesis and epithelial integrity. We also found that the Pp1-87B phosphatase dephosphorylates Moesin, counteracting its activation by the Ste20-like kinase Slik. To understand how this signaling pathway is itself regulated, we conducted a genome-wide RNAi screen looking for new regulators of Moesin activity. We identified that Slik is a new member of the Striatin-interacting phosphatase and kinase complex (STRIPAK). We discovered that the phosphatase activity of STRIPAK reduces Slik phosphorylation to promote its cortical association and proper activation of Moesin. Consistent with this finding, inhibition of STRIPAK phosphatase activity causes cell morphology defects in mitosis and impairs epithelial tissue integrity. Our results implicate the Slik/STRIPAK complex in the control of multiple morphogenetic processes.

Key words: Moesin, STRIPAK, Slik, mitosis, epithelium

Running title: STRIPAK controls mitotic morphogenesis and epithelial integrity

eToc summary: Cell and tissue morphogenesis are fundamental during development. The authors previously characterized Slik kinase and its effector, Moesin, as regulators of mitotic morphogenesis and epithelial integrity. Here, they identify the dSTRIPAK complex as a new regulator of Slik localization to promote Moesin activation and functions.

2.2 Introduction

Cell morphogenesis is an important process by which cells adapt their shapes to achieve different functions. Filaments of the actin and microtubule cytoskeletons play important roles during this process. Actin filaments apply forces to the cortex to contribute to plasma membrane remodeling while microtubules are important for targeted trafficking and signaling [231, 232]. Proteins of the Ezrin, Radixin and Moesin (ERM) family link actin filaments and microtubules to the plasma membrane [32]. They regulate important cellular processes, such as cell division, migration, and epithelial organization [31]. The phosphorylation of a conserved threonine residue in the C-terminus of ERMs promotes their activation. ERMs cycle between an active conformation at the plasma membrane and an inactive form in the cytosol. An intramolecular interaction between the N-terminal FERM domain and C-terminal tail (CERMAD domain) inactivates ERMs. Their activation involves a conformational switch through a multi-step mechanism: (i) PtdIns(4,5)P₂, a phospholipid of the plasma membrane, recruits ERMs to the cortex and slightly opens the molecules; (ii) this pre-opening allows access to LOK, a Sterile 20-like Ser/Thr protein kinase, that wedges in between the FERM and CERMAD domains to complete full ERM opening; (iii) the kinase phosphorylates the regulatory threonine of ERMs to stabilize their open conformation. This opening unmaskes the actin-binding site in the CERMAD and the microtubule interacting site in the FERM domain and allows ERMs to link actin and microtubule filaments at the plasma membrane to regulate cell morphogenesis.

Our laboratories have studied the function and regulation of Moesin, the only ERM orthologue in *Drosophila melanogaster* [143]. We found that Moesin controls epithelial integrity and mitotic morphogenesis [29, 32, 84-86]. In *Drosophila* wing imaginal discs, we discovered that Slik, the *Drosophila* orthologue of mammalian SLK and LOK, phosphorylates Moesin to control epithelial tissue integrity. Cells lacking either Slik or Moesin undergo an epithelial-to-mesenchymal transition, sort basally out of the wing disc epithelium, and undergo apoptosis [84, 88, 233].

In *Drosophila* S2 cells in culture, we showed that Moesin controls mitotic cell shape and organization of the mitotic spindle. We found that mitosis entry is

characterized by a ~3-fold increase in Moesin phosphorylation. We found that Slik is responsible for the basal level of Moesin phosphorylation in interphase and for the specific activation of Moesin in mitosis [29]. In metaphase, phosphorylated Moesin (p-Moesin) spreads around the cortex and increases global cortical rigidity by coupling actin forces to the plasma membrane [29, 30]. This promotes rounding of cells. In addition, Moesin–microtubule interactions regulate mitotic spindle organization [32]. In anaphase, the Ser/Thr phosphatase Pp1-87B dephosphorylates Moesin at the poles and favors p-Moesin accumulation at the equator [86, 87]. This redistribution drives cell elongation and cytokinesis. After abscission, Pp1-87B dephosphorylates Moesin to allow cortex relaxation [86]. Either inhibition or over-activation of Moesin has damaging effects in mitosis. Over-activation of Moesin over-stiffens the polar cortex in anaphase, preventing cell elongation and cytokinesis [86]. Conversely, Moesin or Slik dsRNA depletion renders the cortex too soft; cells do not control mitotic morphogenesis properly and present abnormal cortical blebs [29].

In addition to Pp1-87B and Slik, we also found that the PtdIns-4-kinase CG10260 and the PtdIns(4)P 5-kinase Skittles regulate localized PtdIns(4,5)P₂ production at the plasma membrane to control Moesin localization [86, 234, 235]. However, we still do not know how the enzymes of the signaling network activating Moesin are themselves regulated. To this end, we performed an unbiased genome-wide dsRNA screen in *Drosophila* S2 cells and measured p-Moesin levels. We found that the Striatin-interacting phosphatase and kinase complex (STRIPAK) is a positive regulator of Moesin phosphorylation. At the core of the STRIPAK complex, there is a Protein Ser/Thr phosphatase 2A (hereafter referred to as PP2A_{STRIPAK}, Figure 2.1A) [195, 236]. PP2A_{STRIPAK} is a heterotrimeric enzyme that consists of a PP2A catalytic C subunit (Mts, in *Drosophila*), a PP2A scaffold A subunit (PP2A-29B), and a Striatin regulatory B subunit (Cka). On top of this core, Striatin-interacting proteins known as STRIPs (Strip) help scaffold Ser/Thr kinases of the Ste20-like family [195, 201, 209, 212, 217].

STRIPAK controls the activity of its associated kinases, either by regulating phosphorylation of regulatory residues [200, 202] or by recruiting them to specific sites in the cell [206]. Thereby, STRIPAK affects cell proliferation and survival, cytoskeletal

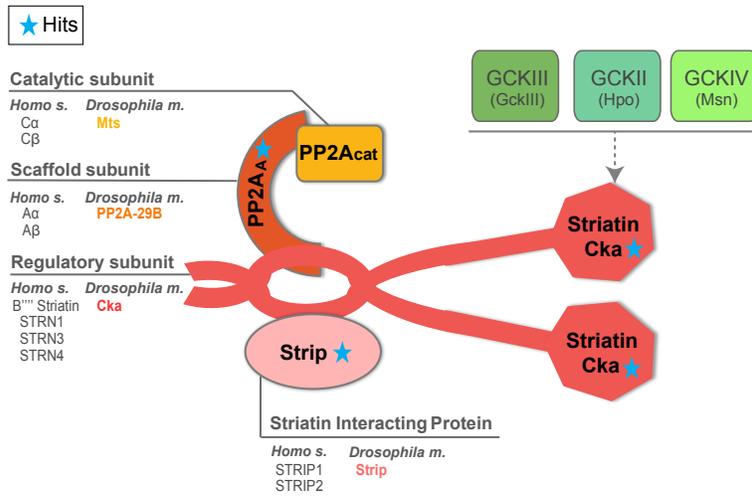
regulation, and vesicle trafficking [197]. Here, we show that Slik is a new STRIPAK-associated kinase. We found that PP2A^{STRIPAK} promotes Slik association with the cortex by regulating its phosphorylation status. Finally, we show that PP2A^{STRIPAK} controls Slik and Moesin functions to regulate mitotic morphogenesis and epithelial integrity. Our results place STRIPAK as a critical upstream regulator of cell morphogenesis through its effects on Slik and, ultimately, Moesin.

2.3 Results

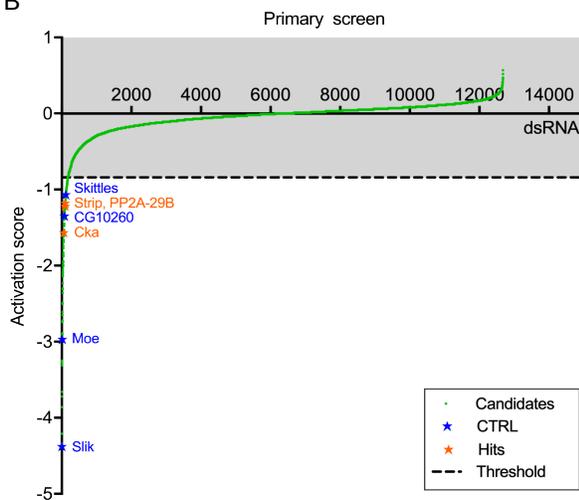
2.3.1 A genome wide RNAi screen identifies dSTRIPAK as an activator of Moesin

To identify activators of Slik and Moesin, we performed a genome-wide screen using an RNAi library covering 90% of the *Drosophila* genome. We screened for genes whose depletion triggers a decrease of Moesin phosphorylation in *Drosophila* S2 cells. To this aim, we developed an immunofluorescence high-content screening method using an antibody specific to phosphorylated Thr559 Moesin [29]. We initially identified 201 genes acting as potential Moesin activators (Figure 2.1B). Among these genes we found *moesin* itself and all previously characterized positive regulators (*slik*, *skittles* and *CG10260*) [29, 84, 86, 235], confirming the specificity and sensitivity of our screening procedure. Of the 201 genes found, we validated 51 genes in a secondary screen using alternative non-overlapping dsRNAs (Figure 2.1C and Table 2.1). Among these Moesin activators we investigated the function of a set of genes associated with the *Drosophila* STRIPAK complex (dSTRIPAK) [201]: Connector of kinase to AP-1 (Cka), Striatin-interacting protein (Strip), and PP2A scaffolding subunit (PP2A-29B).

A



B



C

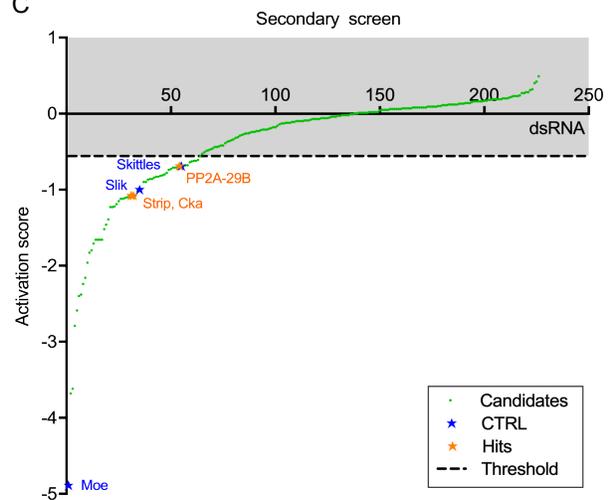


Figure 2.1 A genome-wide RNAi screen identifies the dSTRIPAK complex as a Moesin activator

(A) Representation of the dSTRIPAK complex with members controlling Moesin phosphorylation identified in screen highlighted with a blue star. **(B, C)** The activation score was calculated for each dsRNA based on the mean intensity of p-Moesin and ranked by increasing score for the primary RNAi screen (B) and secondary confirmation screen (C). Genes known to control Moesin phosphorylation are shown with blue stars and genes of dSTRIPAK are shown with orange stars. Thresholds are marked by dashed line (see materials and methods).

FBgn	CG number	SYMBOL	Activation Score
FBgn0038016	CG10042	MBD-R2	-0.87
FBgn0267350	CG10260	CG10260	-1.35
FBgn0037446	CG10267	Zif	-0.71
FBgn0011661	CG10701	Moe	-4.89
FBgn0029980	CG10778	CG10778	-0.56
FBgn0035437	CG11526	Strip	-1.08
FBgn0003943	CG11624	Ubi-p63E	-2.38
FBgn0028692	CG11888	Rpn2	-0.73
FBgn0026380	CG11981	Prosbeta3	-1.22
FBgn0250746	CG12000	Prosbeta7	-1.08
FBgn0029134	CG12323	Prosbeta5	-0.78
FBgn0001233	CG1242	Hsp83	-1.23
FBgn0028687	CG1341	Rpt1	-1.12
FBgn0039219	CG13630	CG13630	-0.68
FBgn0028969	CG14813	deltaCOP	-1.46
FBgn0020369	CG1489	Rpt6	-1.12
FBgn0023175	CG1519	Prosalpha7	-1.66
FBgn0028686	CG16916	Rpt3	-1.11
FBgn0260439	CG17291	Pp2A-29B	-0.69
FBgn0032596	CG17331	Prosbeta4	-0.84
FBgn0020653	CG2151	Trxr-1	-0.90
FBgn0024923	CG2331	TER94	-0.68
FBgn0040339	CG3034	MED22	-1.09
FBgn0026781	CG30382	Prosalpha1	-0.90
FBgn0086558	CG32744	Ubi-p5E	-1.96
FBgn0013998	CG33101	Nsf2	-2.24
FBgn0033052	CG33131	SCAP	-1.00
FBgn0023174	CG3329	Prosbeta2	-1.80
FBgn0015234	CG34407	HLH106	-2.59
FBgn0085436	CG34407	Not1	-1.52
FBgn0027571	CG3523	CG3523	-1.83
FBgn0010382	CG3938	CycE	-1.02
FBgn0002284	CG4097	Prosbeta6	-0.86
FBgn0028693	CG4157	Rpn12	-0.83
FBgn0035001	CG4527	Slik	-1.00
FBgn0011763	CG4654	Dp	-0.62
FBgn0010278	CG4817	Ssrp	-2.16
FBgn0041188	CG5166	Atx2	-0.63
FBgn0032444	CG5525	CG5525	-0.62
FBgn0008635	CG6223	betaCop	-2.79
FBgn0032428	CG6405	CG6405	-0.74
FBgn0250791	CG6625	Snap	-3.68
FBgn0026611	CG6671	AGO1	-0.81
FBgn0022942	CG7035	Cbp80	-1.23
FBgn0044323	CG7392	Cka	-1.08
FBgn0015805	CG7471	Rpd3	-0.64
FBgn0028538	CG7578	Sec71	-0.61
FBgn0026373	CG7885	Rpl133	-0.83
FBgn0025725	CG7961	alphaCop	-3.62
FBgn0033897	CG8233	Rcd1	-0.69
FBgn0010348	CG8385	Arf79F	-2.40
FBgn0022764	CG8815	Sin3A	-1.19
FBgn0032061	CG9314	CG9314	-0.80
FBgn0016984	CG9985	sctl	-0.69
FBgn0011785	CG31132	BRWD3	-1.62

Table 2.1 Validated genes and their activation score

The table presents the 51 validated genes with their FlyBase gene number (FBgn#), their protein-coding gene number (CG#), and their activation score of the secondary screen (see material and methods). Known activators of Moesin are highlighted in green, dSTRIPAK members are highlighted in orange, and the activators with a GO term proteasome or ubiquitination process are in grey.

2.3.2 dSTRIPAK phosphatase activity regulates Moesin phosphorylation

STRIPAK is an evolutionarily conserved multi-protein complex that functionally links the phosphatase activity of PP2A to different Ste20-like kinases [195, 197, 200, 201, 203, 237]. Both enzymatic functions are scaffolded by Striatin proteins (Figure 2.1A). Striatins also function as the STRIPAK-specific PP2A regulatory subunits (B^{''}) and control PP2A_{STRIPAK} subcellular localization and substrate specificity [197-199]. Cka, the only Drosophila Striatin, interacts with Strip and is considered as a constituent of PP2A_{STRIPAK} [212], although its function is not totally understood. Finally, proteins of the Striatin family interact either directly or indirectly through adaptor proteins with Ste20-like kinases from different germinal center kinase (GCK) subfamilies [236-238].

The components of dSTRIPAK that were identified as Moesin activators are all members of PP2A_{STRIPAK} (Figure 2.1A). We did not identify any of the adaptor proteins or the three kinases known to associate with dSTRIPAK. We performed the primary round of the genome-wide screen using a single dsRNA per gene, opening the possibility of false negatives. We therefore decided to test the implication of the other dSTRIPAK members in Moesin regulation by using additional non-overlapping dsRNAs. Since Moesin displays a ~ 3-fold increase of phosphorylation at mitotic entry [29, 86], we also investigated if members of dSTRIPAK regulate Moesin specifically in interphase and/or mitosis. After dsRNA knockdown, we co-labelled p-Moesin and p-Histone H3, a marker of mitotic cells, and quantified the levels of p-Moesin in interphase and mitosis. This experiment revealed that the depletion of Mob4, Slmap and FGOP2, three different dSTRIPAK adaptor proteins, slightly decrease p-Moesin levels (Figure 2.2A).

Since kinases play important roles in STRIPAK functions, we investigated the role of the three known dSTRIPAK-associated kinases on Moesin phosphorylation. Even if we cannot rule-out that the additional dsRNAs targeting GckIII, Hpo and Msn did not efficiently knock-down these kinases, none of these dsRNAs affected p-Moesin levels (Figure 2.3A). In accordance with our primary screen, we also found that single knockdown of Cka, Strip, and PP2A-29B with two independent dsRNAs triggers a significant decrease of p-Moesin both in interphase and mitosis (Figure 2.3A). In addition to these three PP2A_{STRIPAK} members, we found that dsRNA depletion of Mts, the

catalytic subunit of PP2A_{STRIPAK}, decreased the levels of p-Moesin. We did not originally identify Mts as a Moesin activator in the primary screen but we found that the dsRNA of the RNAi library targeting Mts did not fully deplete the protein (Figure 2.2B-C, dsRNA Mts-1). Interestingly, we also found that Cka depletion reduces Strip protein levels, without affecting its mRNA levels (Figure 2.2D-F). This suggests that through their interaction Cka stabilizes Strip.

The identification of each member of PP2A_{STRIPAK} as a Moesin activator suggests that dSTRIPAK phosphatase activity regulates Moesin. To confirm this, we used okadaic acid (OA), a phosphatase inhibitor that specifically inhibits PP2A at low concentrations (< 1uM) while inhibiting both PP2A and PP1 at higher concentrations [239, 240]. Upon OA treatment at low concentration to solely inhibit PP2A, we observed a significant reduction of p-Moesin by Western blot (Figure 2.3B-C). Since the catalytic (Mts) and structural (PP2A-29B) subunits of PP2A are shared by the different PP2A holoenzymes [241], we tested the four other PP2A regulatory B subunits using validated dsRNAs [205]. We found that well-rounded (Wrd), B" and widerborst (Wdb) dsRNA depletion did not affect Moesin phosphorylation (Figure 2.2G-H). We also found that while Cka dsRNA depletion reduced p-Moesin levels by ~75%, Twins (Tws) dsRNA depletion reduced p-Moesin levels by almost 50% (Figure 2.2G-H). The function of PP2A-Tws on Moesin phosphorylation could be a secondary effect of its major role in mitosis [205, 242]. We thus chose to further study the function of PP2A_{STRIPAK} specifically by depleting Cka or its interacting partner Strip [200, 201]. We confirmed that dsRNA depletion of Cka or Strip reduced p-Moesin significantly without affecting overall Moesin levels (Figure 2.3D-F). Taken together, our results reveal that dSTRIPAK phosphatase activity is needed for Moesin activation at a post-translational level.

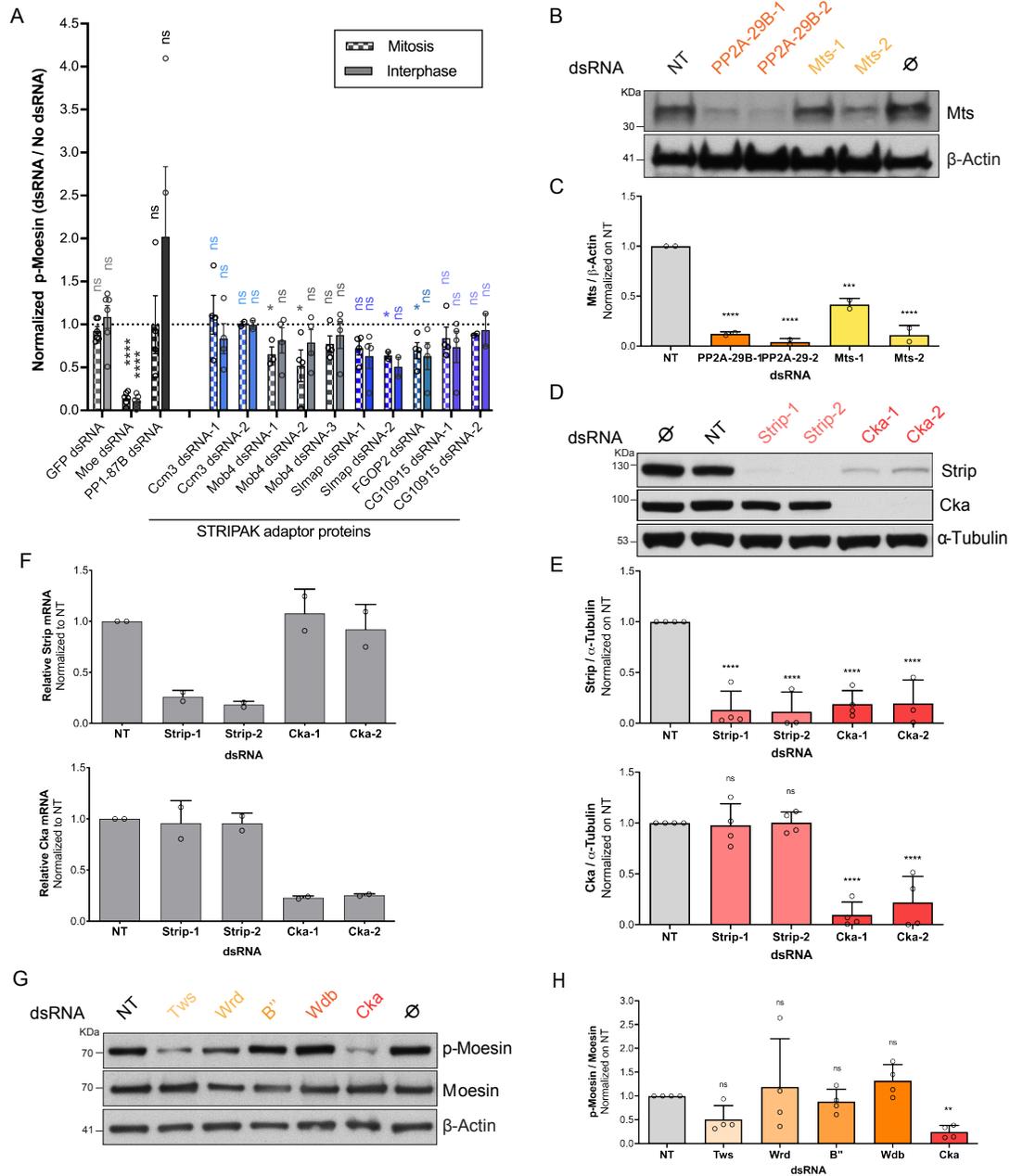


Figure 2.2 Depletion of Mob4, Simap and FGOP2, three dSTRIPAK adaptor proteins, slightly decrease p-moesin levels

(A) Automated quantification of the immunofluorescence intensity of p-Moesin in S2 cells treated as indicated and normalized to non-treated condition. Data are represented as normalized means \pm SEM of 2 to 4 independent experiments (circles). Two-tailed unpaired *t*-tests were calculated against the non-treated condition with p-values: ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$. **(B, D)** Western Blot of S2 cells, treated as indicated, with antibodies against Strip, Cka, Mts and β -Actin or α -Tubulin. Knockdown of PP2A-29B destabilizes Mts, as previously described in mammalian cells [243]. Knockdown of Cka destabilizes Strip. **(C, E)** Relative Strip, Cka, or Mts levels (normalized as indicated) were quantified in 2 to 4 independent experiments (circles). Data are represented as means \pm SD normalized on non-target (NT) dsRNA, one-way ANOVA with p-values: ns $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. **(F)** Relative Strip or Cka mRNA levels (normalized to Act5c and

Rpl32) were quantified by qRT-PCR in total RNA extracts of S2 cells treated with indicated dsRNA. **(G)** Western blot of S2 cells treated as indicated with antibodies against T559-phosphorylated p-Moesin, Moesin and β -Actin. **(H)** Relative p-Moesin levels (normalized to Moesin) were quantified in four independent experiments (circles). Data are represented as means \pm SD normalized on non-target (NT) dsRNA, one-way ANOVA with p-values: ns $p > 0.05$; ** $p < 0.01$.

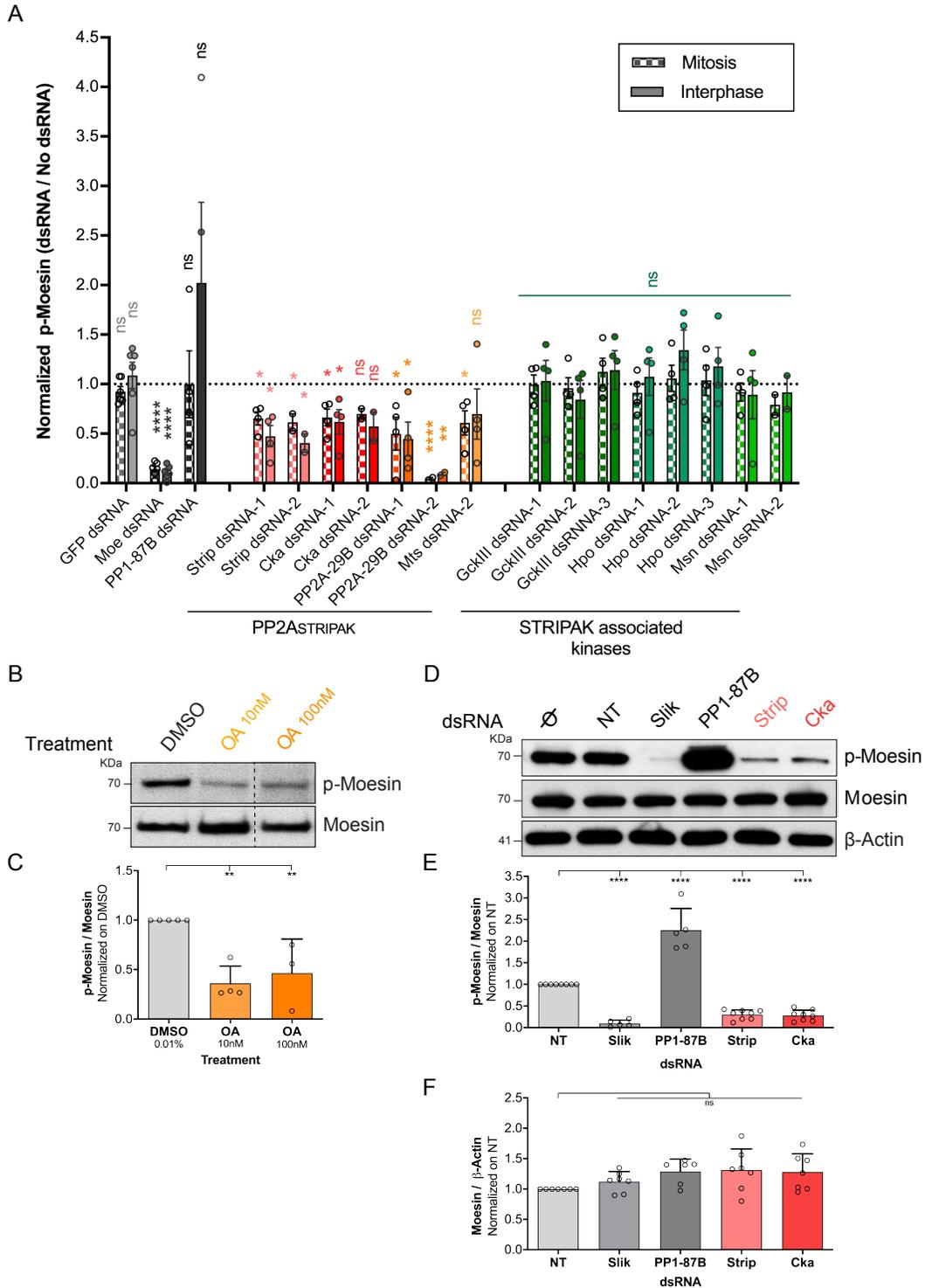


Figure 2.3 **dSTRIPAK phosphatase activity regulates Moesin phosphorylation**

(A) p-Moesin immunofluorescence intensity in S2 cells treated as indicated and normalized to the non-treated condition. Data are represented as normalized means \pm SEM of 2 to 4 independent experiments (circles), two-tailed unpaired *t*-tests were calculated against the non-treated condition. (B, D) Western blot of S2 cells treated as indicated. (C, E, F) Relative p-Moesin levels and relative Moesin levels normalized as indicated in 3 to 8 independent experiments (circles). Data are represented as normalized means \pm SD, one-way ANOVA with *p*-value: ns *p*>0.05; **p*<0.05; ***p*<0.01; *****p*<0.0001.

2.3.3 **PP2A_{STRIPAK} interacts with Slik and regulates its phosphorylation state**

Most of the known functions of STRIPAK involve a functional crosstalk between PP2A_{STRIPAK} and kinases that belong to the GCK-family [200, 202, 220]. However, we did not identify any of the known STRIPAK associated kinases as Moesin regulators (Figure 2.3A). Instead we found that Slik, which is part of the GCK-V subfamily, is a new kinase associated with the dSTRIPAK complex. We expressed tagged versions of Slik together with Cka or Strip and performed reciprocal co-immunoprecipitation experiments and we found that Stag-tagged Cka or Strip associated with GFP-tagged Slik, while they do not associate with GFP (Figure 2.4A-B).

We next wondered if Slik itself could be a target of PP2A_{STRIPAK}. We noticed that when proteins from S2 cells were separated on a low-percentage SDS-PAGE gel in the presence of phosphatase inhibitors, Slik appeared as two doublet bands. These bands may correspond to different Slik splicing variants. Indeed, mRNAs encoding for three Slik short isoforms (147.5, 152.1 and 155.1 kDa; hereafter named Slik-short) and mRNAs encoding for two long isoforms (184.6 and 192.1 kDa; thereafter named Slik-long) were previously identified (Figure 2.5A, <http://flybase.org/reports/FBgn0035001>). Consistent with this hypothesis, both doublet bands disappeared upon knockdown of all Slik isoforms, and only the upper doublet disappeared when using a dsRNA targeting Slik-long specifically (Figure 2.5B-C). Upon λ -phosphatase treatment, we found that both Slik-long and -short doublets disappear to migrate both as unique bands with increased mobility, demonstrating that Slik is phosphorylated (Figure 2.4C-D). Thus, we can detect Slik phosphorylation by apparent mobility shift. Importantly, we found that PP2A_{STRIPAK} regulates Slik phosphorylation, as inhibition of PP2A enzymatic activity using OA, or knock-down of individual members of PP2A_{STRIPAK}, promoted a greater mobility shift of Slik-long and -short when compared to control conditions (Figure 2.4E-

G). These mobility shifts were abolished upon λ -phosphatase treatment, further demonstrating that the retarded bands correspond to phosphorylated forms of Slik (Figure 2.5D-E).

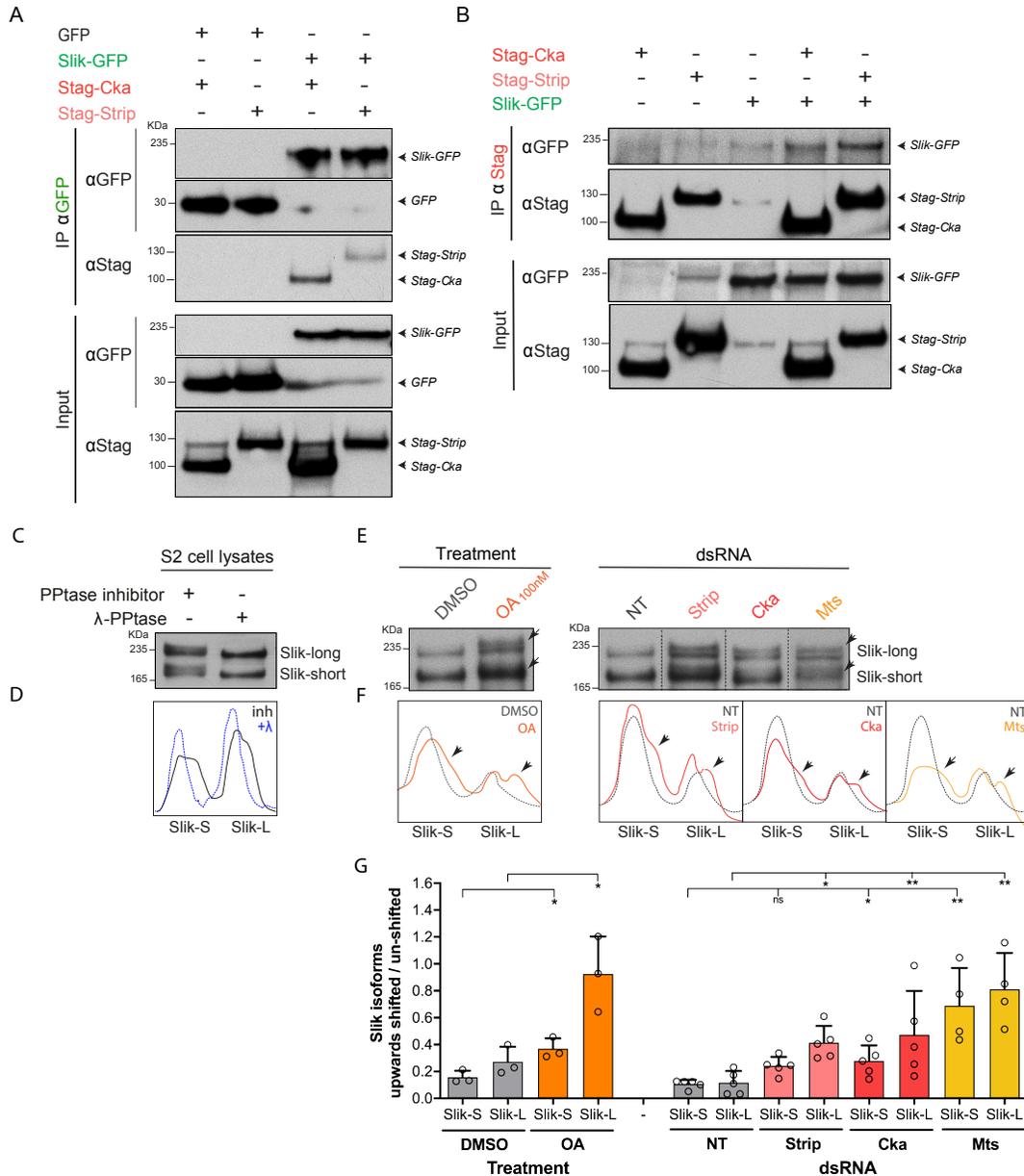


Figure 2.4 **PP2A^{STRIPAK} interacts with Slik and regulates its phosphorylation state**

(A, B) Cell lysates of S2 cells transiently expressing the indicated cDNA were immunoprecipitated with anti-GFP (A) or anti-Stag (B) antibodies and analyzed by Western Blot. (C,E) Western blot of S2 cells treated as indicated. (D, F) Line scans of C and E. Arrows indicate Slik-long (Slik-L) or Slik-short (Slik-S). (G) Proportion of phosphorylated Slik (upwards shifted/unshifted). Data are represented as means \pm SD of 3 to 5 independent experiments (circles). Unpaired *t*-test for drug treatments and one-way ANOVA for dsRNA conditions with *p*-values: ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

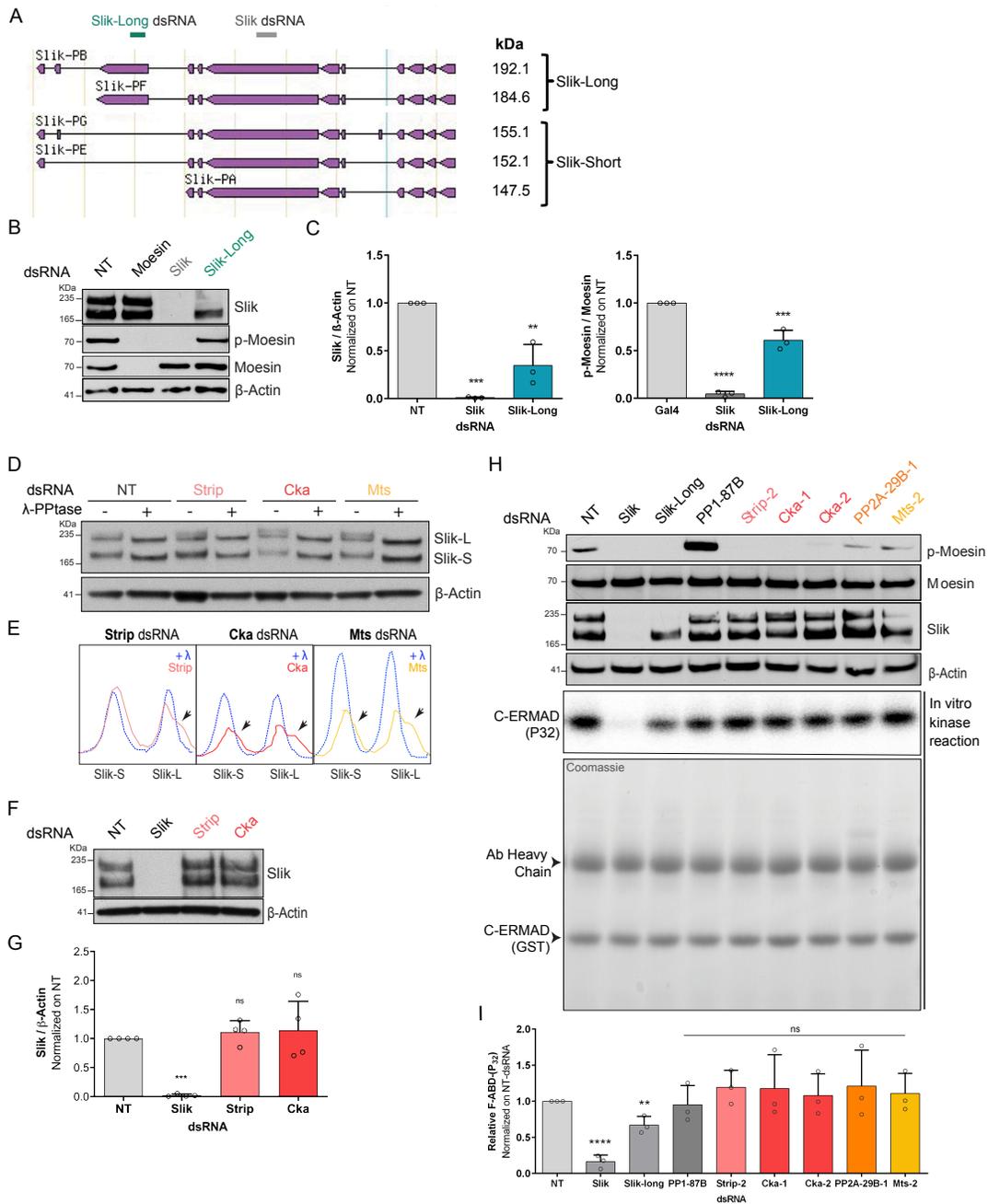


Figure 2.5 Slik isoforms are over-phosphorylated in absence of PP2A_{STRIPAK} without affecting its kinase activity

(A) Schematic representation of Slik mRNA splicing variants (adapted from <http://flybase.org/reports/FBgn0035001>) and their expected molecular weight (kDa). The longer isoforms (Slik-long) code for an additional C-terminal non-conserved domain, compared to the shorter isoforms (Slik-short). dsRNA designed against all Slik isoforms or specific to Slik-long are indicated. **(B, F)** Western blot of S2 cells treated as indicated were analyzed by Western blotting with antibodies against Slik, p-Moesin, Moesin or β -Actin. The upper bands correspond to Slik-long and lower bands to Slik-short isoforms. **(C, G)** Relative Slik or relative p-Moesin levels (normalized as indicated) were quantified in 3 to 4 independent experiments (circles). Data are represented as

means \pm SD normalized on non-target (NT) dsRNA, one-way ANOVA with p-values: ns $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. **(D)** S2 cells treated as indicated were lysed either in absence (-) or presence (+) of λ -phosphatase (λ -PPtase). Protein extracts were then analyzed by Western blotting using antibodies against Slik or β -Actin. **(E)** Representation of the line scans of Western blots on Slik signals (bottom to top). The shifted Slik-long (Slik-L) or Slik-short (Slik-S) signals are indicated with arrows. **(H)** Western blot of S2 cells, treated as indicated, with antibodies against p-Moesin, Moesin, Slik or β -Actin (upper rows). Immunoprecipitated Slik from the treated cell lysates was incubated with purified Moesin C-ERMAD-GST in a kinase reaction with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. The resulting samples were subjected to SDS-PAGE, and the dried Coomassie-stained gel was autoradiographed (middle and bottom rows). **(I)** Autoradiographed signals of Moesin C-ERMAD(P_{32})-GST were quantified in 3 independent experiments (circles). Data are represented as means \pm SD normalized on non-treated (NT) dsRNA, one-way ANOVA with p-values: ns $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

2.3.4 PP2A_{STRIPAK} regulates Slik localization at the cell cortex

We then asked if PP2A_{STRIPAK} could regulate Slik function. We found that PP2A_{STRIPAK} does not regulate the stability nor the catalytic activity of Slik. First, Strip or Cka dsRNA depletion did not affect the stability of either Slik-long or Slik-short isoforms (Figure 2.5F-G). Next, we immunoprecipitated endogenous Slik and measured its kinase activity *in vitro* on its natural substrate, the C-terminal part of Moesin [244]. We found that the depletion of Strip, Cka, PP2A-29B or Mts did not affect the kinase activity of Slik (Figure 2.5H-I).

STRIPAK can regulate the function of Ste20-like kinases by controlling their localization [202, 206, 245]. We thus tested if PP2A_{STRIPAK} regulates Slik subcellular localization. We previously reported that Slik associates with the cortex of S2 cells and epithelial cells in wing discs [29, 84, 86]. We measured a ~30% loss of Slik at the cortex upon Strip or Cka depletion when compared to control cells (Figure 2.6A-B and Figure 2.7A). To test if PP2A_{STRIPAK} controls Slik cortical association by regulating its phosphorylation state, we treated cells with OA to increase Slik phosphorylation levels (Figure 2.4E). We observed that Slik association with the cortex was decreased upon OA treatment (Figure 2.6C-D and Figure 2.7B). We then used Staurosporine, a broad kinase inhibitor, to block Slik phosphorylation. We observed that upon Staurosporine treatment, Slik localization at the cortex increased significantly (Figure 2.6C-D and Figure 2.7B). Altogether these results demonstrate that PP2A_{STRIPAK} controls Slik association with the cell cortex, potentially by regulating its phosphorylation.

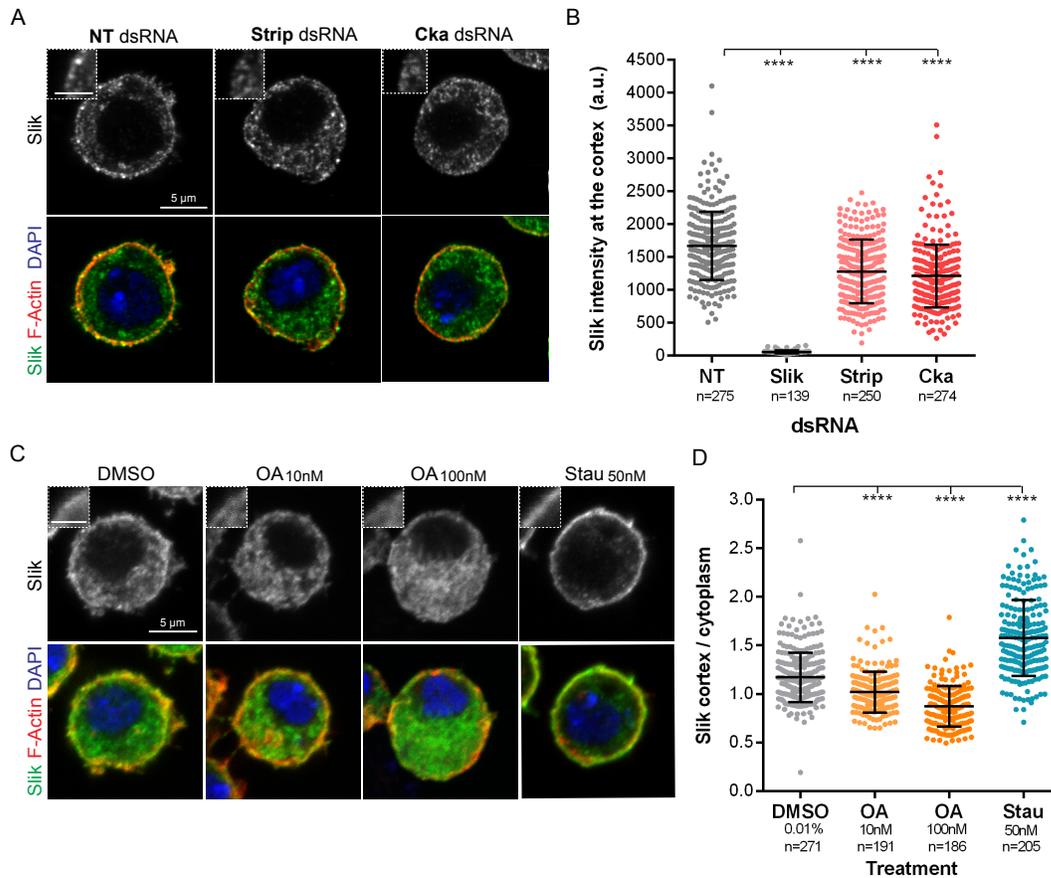


Figure 2.6 **PP2A^{STRIPAK} regulates Slik localization at the cell cortex**

(A, C) Projection of 3 confocal planes of S2 cells upon the indicated treatment, and stained for Slik (green), F-Actin (red), and DNA (blue). Enlarged area of the cells are shown. **(B, D)** Slik intensity at the cortex (B) or the ratio of Slik intensity (cortex/cytoplasm) (D) in a minimum of 60 cells/condition, in 3 independent experiments (see also Figure 2.7A-B). Data are represented as means \pm SD (each dot represents the value for a single cell), one-way ANOVA with p-value: **** $p < 0.0001$. Scale bars, 5 μ m and 2 μ m for enlarged area.

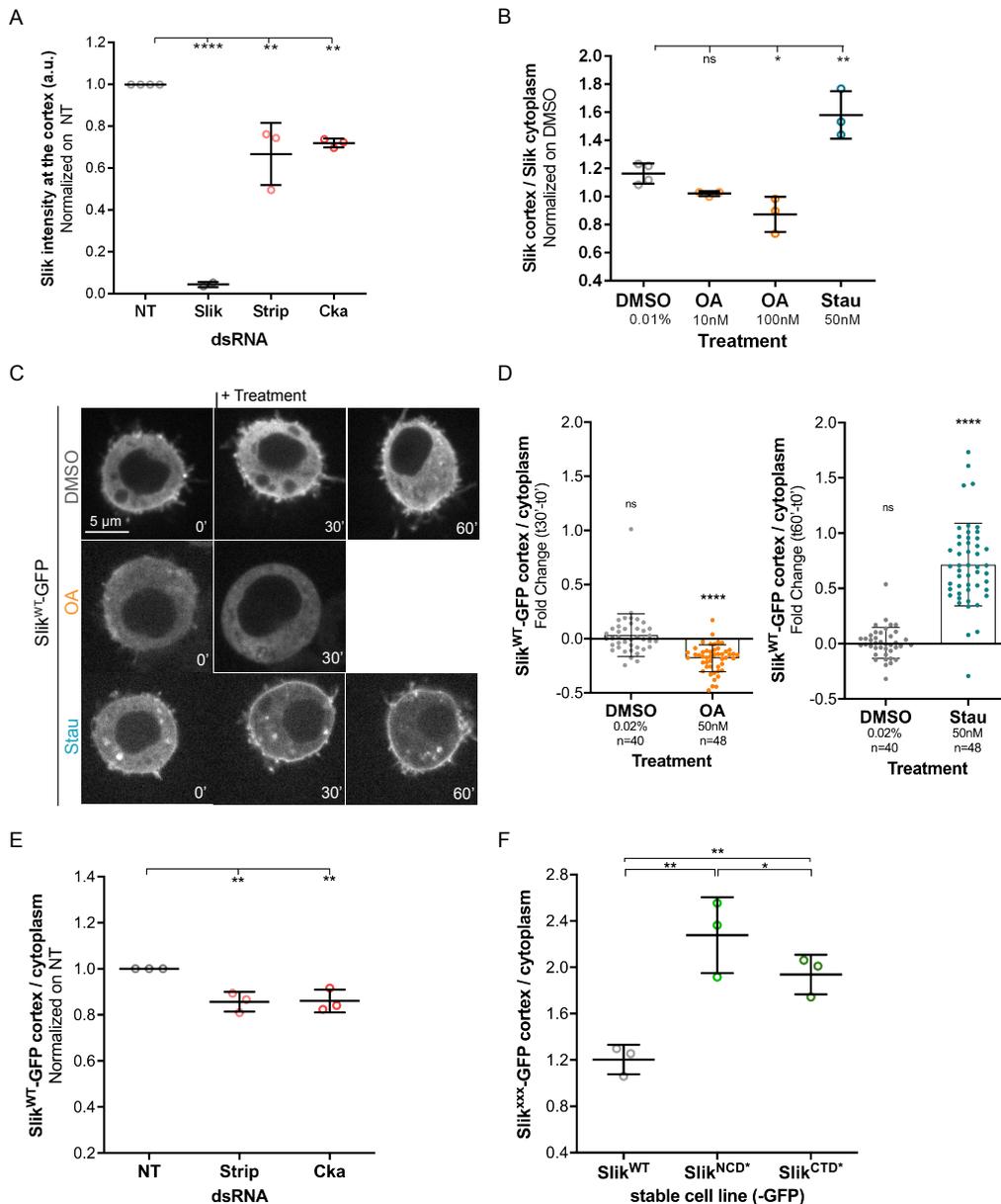


Figure 2.7 Slik localization is affected by PP2A_{STRIPAK} inhibition or kinase inhibition

(A) Slik intensity at the cortex was quantified in a minimum of 60 cells/condition (see Figure 2.6B), in three independent experiments. Data are represented as the mean values \pm SD of the pooled replicates (open circles) normalized to the non-target (NT) dsRNA, one-way ANOVA with p-values: ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. **(B)** The ratio of Slik intensity (cortex/cytoplasm) was quantified in a minimum of 60 cells/condition (see Figure 2.6D), in three independent experiments. Data are represented as the mean values \pm SD of the pooled replicates (open circles) normalized to DMSO treatment, one-way ANOVA with p-values: ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. **(C)** Time lapse of Slik distribution in live S2 cell stably expressing Slik^{WT}-GFP (white) upon indicated treatments after the first time frame. **(D)** The ratio of Slik^{WT}-GFP intensity (cortex/cytoplasm) was quantified in a minimum of 12 cells/condition, in three independent experiments. Fold changes of the ratio of Slik-GFP before and after the treatments (30' for OA; 60' for Staurosporine) were quantified (each dot represents the value for a single cell). Data are represented as means \pm SD of the pooled experiment, paired *t*-test with p-values: ns $p > 0.05$; **** $p < 0.0001$. **(E)** The ratio of Slik^{WT}-

GFP (cortex/cytoplasm) was quantified in 40 cells/condition (see Figure 2.8B), in 3 independent experiments. Data are represented as means \pm SD of the pooled replicates (circles), unpaired *t*-test with p-values: **p*<0.05; ***p*<0.01 (F) The ratio of the indicated Slik-GFP constructs (cortex/cytoplasm) was quantified in 30 cells/condition (see Figure 2.8E), in 3 independent experiments. Data are represented as means \pm SD of the pooled replicates (circles), one-way ANOVA with p-values: **p*<0.05; ***p*<0.01.

2.3.5 PP2A_{STRIPAK} regulates Slik localization by phosphorylation to control Moesin activation

We reasoned that if PP2A_{STRIPAK} dephosphorylates Slik to promote its association with the cortex, a phospho-deficient mutant of Slik should be enriched at the cortex. Also, the association with the cortex of this phospho-deficient mutant should not be reduced upon PP2A_{STRIPAK} depletion. To dynamically follow the subcellular localization of relevant Slik mutants, we first tested if a GFP version of Slik (Slik-GFP) behaves as the endogenous kinase. As we previously reported, Slik-GFP localizes at the cell cortex (Figure 2.8A) [86]. We then observed live cells and assessed if drugs inhibiting Ser/Thr kinases or phosphatases affect Slik-GFP cortical association as we observed for the endogenous kinase. We found that OA treatment reduces association of Slik-GFP with the cortex whereas Staurosporine treatment increased this association (Figure 2.7C-D). As observed for endogenous Slik, we also found that dsRNA depletion of Cka or Strip decreased the association of Slik-GFP with the cortex (Figure 2.8A-B and Figure 2.7E).

We previously identified 15 Ser/Thr that are phosphorylated on Slik [85] and by curating available databases [246-248], we identified 6 additional Ser/Thr potentially phosphorylated (Figure 2.8C). We construct two different non-phosphorylatable Slik partial mutants by replacing the 17 potentially phosphorylated Ser/Thr of the NCD by non-phosphorylatable Ala within Slik-GFP (Slik^{NCD*}-GFP) or the 4 Ser/Thr of the CTD (Slik^{CTD*}-GFP). We found that both Slik^{NCD*}-GFP and Slik^{CTD*}-GFP were significantly enriched at the cortex when compared to Slik-GFP (Figure 2.8D-E and Figure 2.7F). In contrast to Slik-GFP (Figure 2.8A-B), we found that Strip or Cka dsRNA depletion does not decrease the association of Slik^{NCD*}-GFP and Slik^{CTD*}-GFP with the cortex (Figure 2.8F). Finally, we showed that both Slik phospho-deficient mutants rescue or partially rescue Moesin phosphorylation levels caused by PP2A_{STRIPAK} depletion (Figure 2.8G-H). While Strip or Cka dsRNA depletion reduced Moesin phosphorylation in cells that stably

express Slik-GFP, the depletion of these PP2A_{STRIPAK} members only slightly affected phosphorylation of Moesin in cells stably expressing similar amounts of Slik^{NCD*}-GFP or Slik^{CTD*}-GFP. These results indicate that PP2A_{STRIPAK} dephosphorylates Slik to favor its association with the cortex in order to activate Moesin. In addition, they suggest that by bringing global negative charges to Slik, phosphorylation on Ser/Thr prevents the association of the kinase with the plasma membrane.

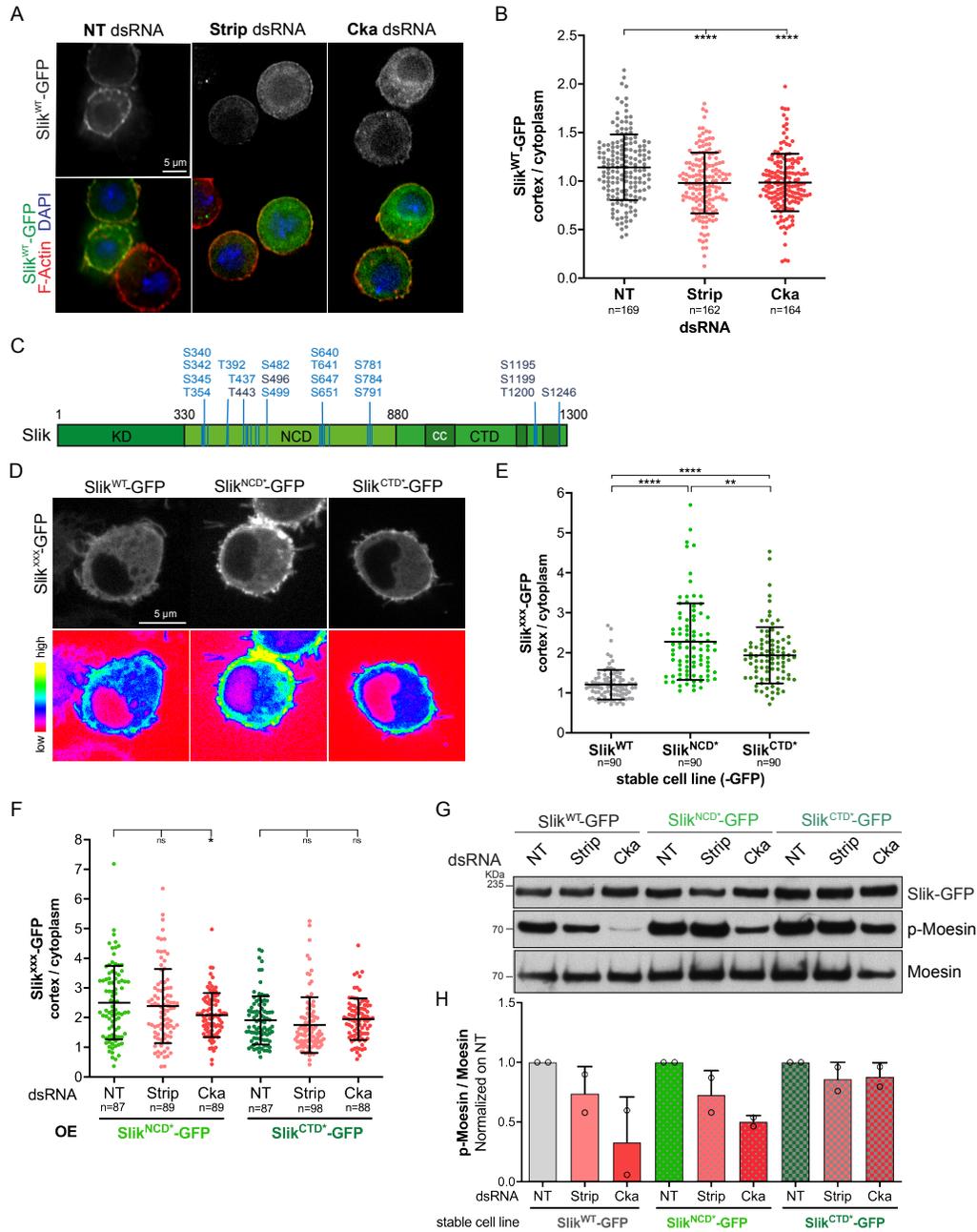


Figure 2.8 **PP2A_{STRIPAK} regulates Slik localization by phosphorylation to control Moesin activation**

(A) S2 cells stably expressing Slik^{WT}-GFP (white top row, or green bottom row) upon the indicated treatment, stained for F-Actin (red), and DNA (blue). **(B)** The ratio of Slik^{WT}-GFP intensity (cortex/cytoplasm) was quantified in a minimum of 40 cells/experiment, in 3 independent experiments (see Figure 2.7E). Data are represented as means \pm SD (each dot represents the value for a single cell), one-way ANOVA. **(C)** Illustration of Slik (short isoform of 1300 amino acids) and its kinase domain (KD), non-conserved domain (NCD), and C-terminal domain (CTD) containing coiled-coil motifs (cc). Previously identified phosphosites (light blue) [85], and additional phosphosites (dark blue). **(D)** Cells expressing the indicated Slik-GFP constructs (white top row). The signal of the indicated Slik-GFP construct was pseudocolored in a rainbow heatmap to underline variations in its localization (bottom row). **(E,F)** The ratio of Slik-GFP intensity (cortex/cytoplasm) was quantified in S2 cells stably expressing the indicated constructs. 30 (E) or 40 (F) cells/condition, in 3 (E) or 2 (F) independent experiments (see Figure 2.7F). Data are represented as means \pm SD (each dot represents the value for a single cell), two-tailed unpaired *t*-test (E) or one-way ANOVA (F). **(G)** Western blot of S2 cells stably expressing the indicated Slik-GFP constructs and treated as indicated. **(H)** Relative p-Moesin levels (normalized to Moesin) were quantified in 2 independent experiments (circles). Data are represented as means \pm SD normalized on non-target (NT) dsRNA. p-value: ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. Scale bars, 5 μ m.

2.3.6 Strip and Cka control Slik cortical association in mitosis and mitotic morphogenesis

Since dSTRIPAK controls Moesin phosphorylation both in interphase and in mitosis (Figure 2.3A), we next wondered if PP2A_{STRIPAK} could regulate association of Slik with the cortex of mitotic cells. We followed Slik-GFP localization in live cells undergoing mitosis. We discovered that Slik becomes enriched at the cortex of control cells at the mitotic onset (Figure 2.9A-B). We then wondered if Slik cortical recruitment at mitotic entry could be affected by mutations of the potentially phosphorylated Ser/Thr we characterized above. We found that although Slik^{NCD*}-GFP or Slik^{CTD*}-GFP are both already enriched at the plasma membrane in interphase when compared to Slik-GFP, they are still significantly recruited to the cortex of cells entering mitosis (Figure 2.9A-B). This suggests that other phosphorylation sites can control Slik cortical recruitment at mitotic entry. Alternatively, another underlying mechanism could control Slik recruitment to the plasma membrane of mitotic cells.

We then followed the consequences on Slik localization by inhibiting Ser/Thr phosphatases or kinases in cells undergoing mitosis. We found that, as observed in interphase, Slik is lost from the cortex upon OA treatment and enriched upon Staurosporine treatment in metaphase (Figure 2.9C-D). Remarkably, we also discovered

that impairing PP2A_{STRIPAK} function through Strip or Cka dsRNA depletion, partially abrogates Slik mitotic cortical recruitment (Figure 2.9E-F). This indicates that throughout the cell cycle, PP2A_{STRIPAK} regulates a balance of the phosphorylation status of Slik to control the localization of the kinase at the cortex.

Having shown that PP2A_{STRIPAK} regulates Slik localization and Moesin activation both in interphase and mitosis, we tested its function in mitosis. We and others previously reported that Slik and Moesin are necessary to sustain mitotic cortical stability [29, 30, 32, 86]. As we previously reported, Slik dsRNA depletion promoted cortical instability throughout each stage of mitosis, with the formation of abnormal blebs (Figure 2.10A-C). In addition, Moesin is not recruited to the cortex in metaphase as a consequence of its lack of phosphorylation and activation. We observed similar, albeit milder, phenotypes upon Strip or Cka depletion (Figure 2.10A-C). Thus, as for Moesin and Slik, PP2A_{STRIPAK} regulates cortical stability during mitosis.

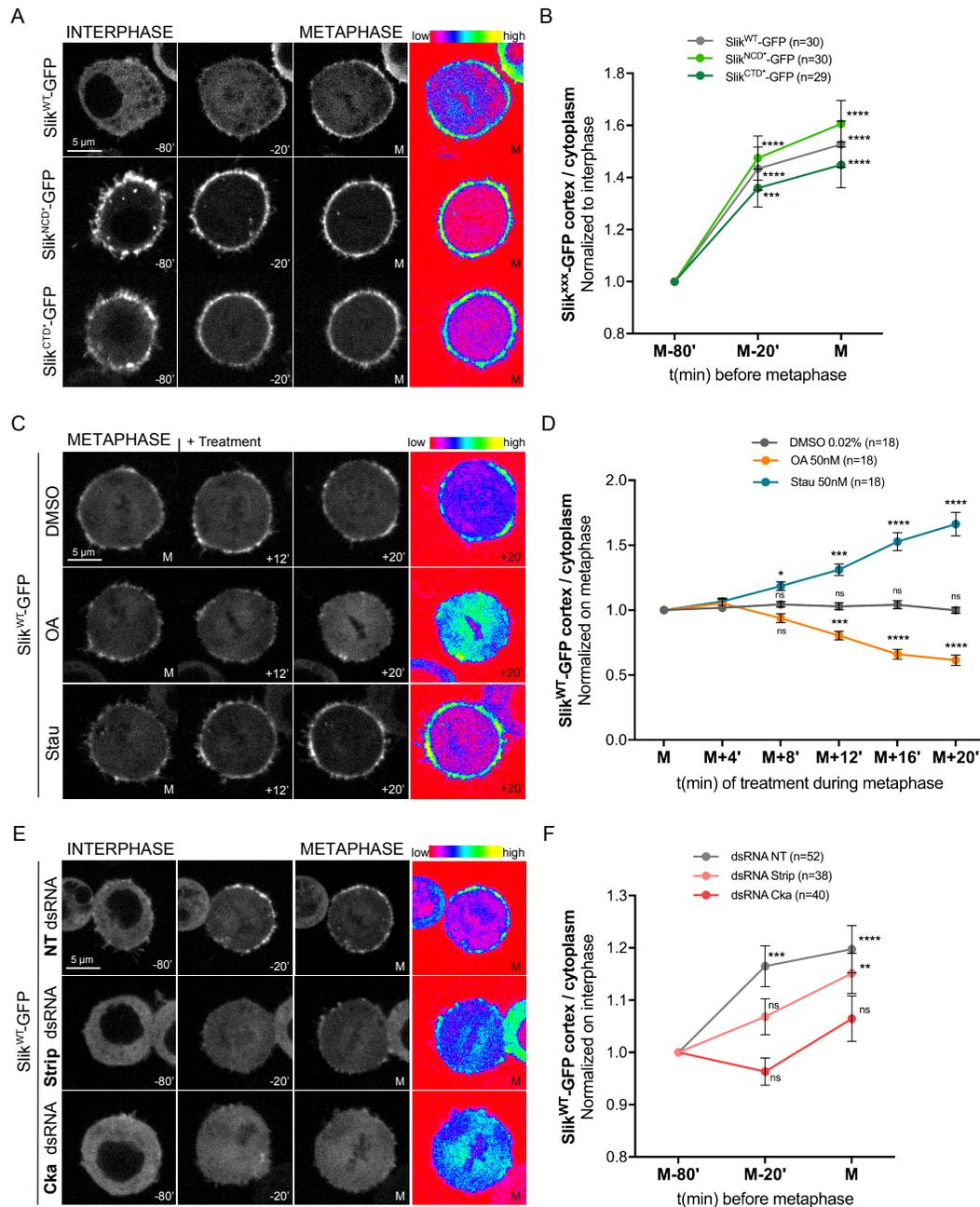


Figure 2.9 PP2A^{STRIPAK} regulates Slik cortical association in mitosis

(A, E) Time lapse of Slik distribution in live S2 cell stably expressing control or mutated Slik-GFP (white) and undergoing mitosis. Slik-GFP signals were pseudocolored in a rainbow heatmap to underline variations in its distribution in metaphase (right row). **(C)** Time lapse of Slik distribution in live S2 cell stably expressing Slik^{WT}-GFP (white) upon the indicated treatments after the first metaphase time frame. Slik^{WT}-GFP signal was pseudocolored in a rainbow heatmap to underline variations in its distribution after 20 min of treatment (right row). **(B, D, F)** The ratios of the indicated Slik-GFP constructs (cortex/cytoplasm) were quantified and normalized to the first time frame in a minimum of 6 cells/condition, in 3 independent experiments. Data are represented as normalized means \pm SEM of the pooled experiments, one-way ANOVA were calculated against the first time frame with p-value: ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Scale bars, 5 μ m.

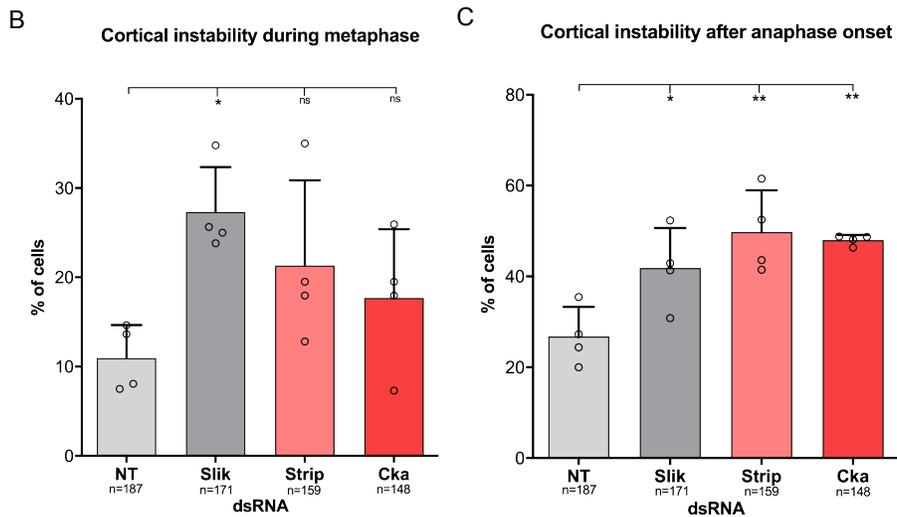
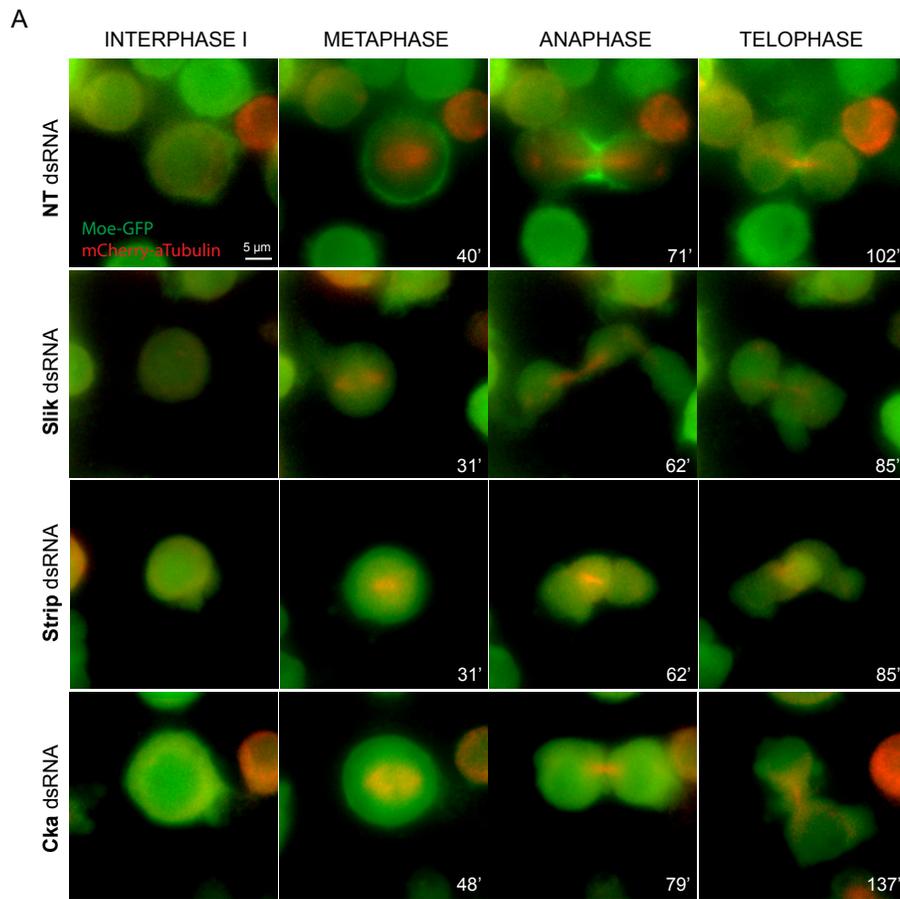


Figure 2.10 Strip and Cka control mitotic morphogenesis in cultured S2 cells

(A) Time lapse of cells stably co-expressing Moesin-GFP (green) and α -Tubulin-mCherry (red) treated as indicated and undergoing mitosis **(B, C)** Percentage of cells with cortical instability in metaphase (B) or after metaphase onset (C) were quantified from live-cell recordings of four independent experiments (circles). Data are represented as means \pm SD of the pooled experiments, one-way ANOVA with p-values: ns p>0.05; *p<0.05; **p<0.01. Scale bar, 5 μ m.

2.3.7 Strip and Cka control epithelial tissue integrity in *Drosophila epithelia*

Moesin plays an essential role in maintaining the integrity of epithelial tissues like the wing imaginal disc [88]. *moesin* mutant cells frequently activate expression of Matrix metalloprotease 1 (Mmp1), a marker of epithelial-mesenchymal transition (EMT), sort basally out of the epithelium, and undergo apoptosis [233], leading to a broader disorganization of the disc epithelium [88]. As in S2 cells, Slik is the main kinase that phosphorylates and activates Moesin in the wing imaginal disc, and *slik* mutants show similar epithelial integrity defects as *moesin* mutants [84]. We therefore tested whether epithelial integrity and Moesin phosphorylation were affected by depletion of Strip and Cka in wing discs.

Evidence suggests that dSTRIPAK associates with Hippo and negatively regulates its activity in discs, promoting tissue growth. Accordingly, dsRNA-mediated depletion of Cka caused tissue undergrowth [201]. We used *ptc*-GAL4, which drives transgene expression in a central stripe of cells in the wing imaginal disc (labelled by GFP expression; Figure 2.11A), to express dsRNAs targeting Strip or Cka. Strong depletion (e.g. when including a Dicer2 transgene to enhance RNAi production) of Strip or Cka was lethal. With a more moderate depletion we observed a similar phenotype upon expression of Strip or Cka dsRNAs, with a marked reduction in the GFP-positive *ptc* domain that was most evident in cells of the prospective wing blade (or wing pouch) region of the disc (arrowheads in Figure 2.11B-C). Strip or Cka depletion was better tolerated in the more proximal wing hinge region (arrows in Figure 2.11B-C). Rather than reduced growth per se, we noticed a strong induction of apoptosis in Strip or Cka depleted cells as evidenced by activated Caspase-3 and pyknotic nuclei on the basal side of the *ptc* domain, mainly below the wing pouch region (Figure 2.11A-C).

Apoptosis could be a principal response to dSTRIPAK depletion or a secondary consequence of a loss of epithelial integrity as cells are extruded from the tissue. To distinguish between the two, we co-expressed the baculoviral P35 protein to inhibit apoptosis. On its own, P35 expression had little effect (Figure 2.11D). P35-expressing Strip or Cka depleted cells showed improved survival. However, the rescued cells frequently activated expression of Mmp1 and sorted to the basal side of the epithelium

as seen in orthogonal projections (Figure 2.11E-F). This phenotype was similar to, though less pronounced than, that observed in P35-expressing Slik depleted cells (Figure 2.11G). These results suggest that apoptosis of Strip or Cka depleted cells is a consequence of their extrusion from the disc epithelium and are consistent with a role of dSTRIPAK in promoting epithelial tissue integrity as Slik and Moesin do.

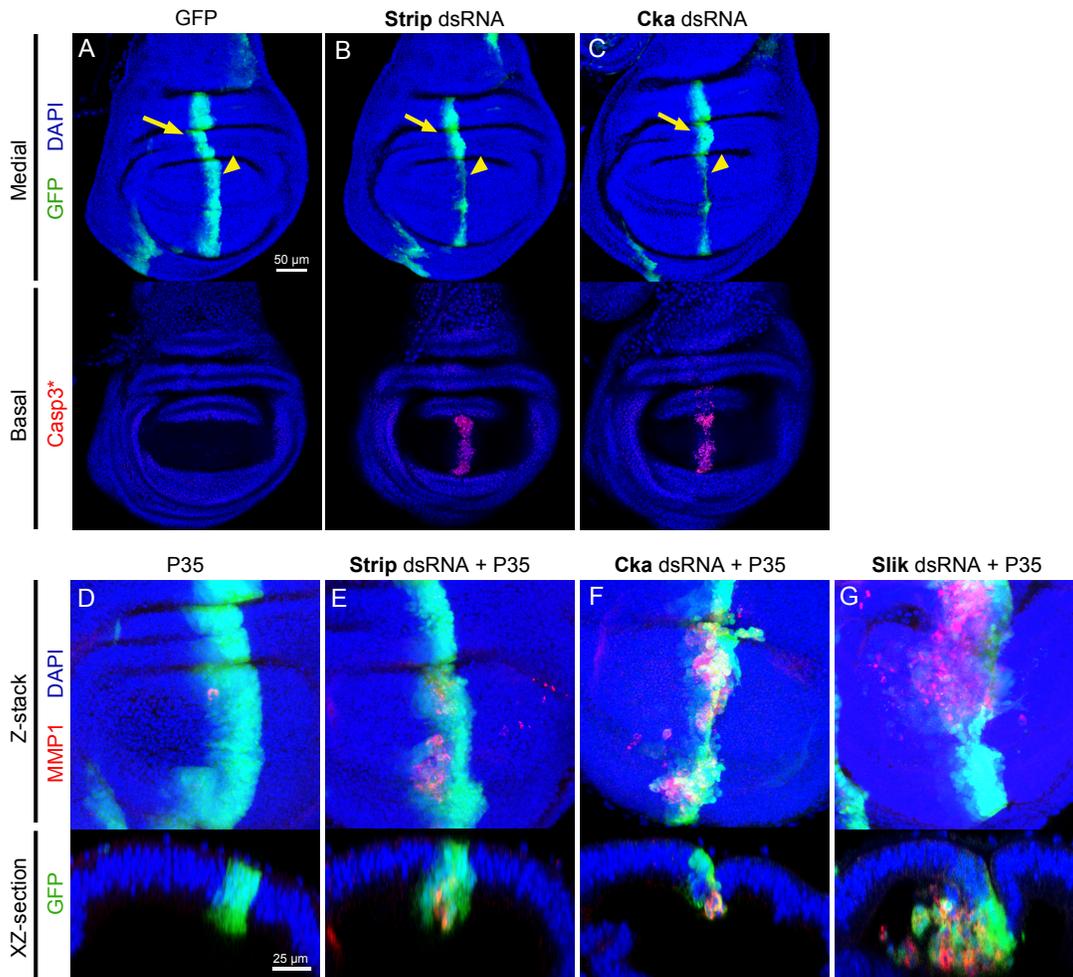


Figure 2.11 Strip and Cka control epithelial tissue integrity in *Drosophila epithelia*

(A-C) Confocal projections through medial (top) or basal (bottom) regions of wing discs expressing GFP (green) in a stripe of cells under control of the *ptc*-GAL4 driver, either alone (A) or together with dsRNA targeting Strip (B) or Cka (C). Discs were stained with DAPI (blue) to visualize nuclei and with anti-cleaved Caspase 3 antibody (red) to visualize apoptotic cells. Arrowheads indicate the transgene expression domain within the wing pouch. Arrows indicate the transgene expression domain within the hinge region **(D-G)** Confocal projections of wing discs (top row) expressing GFP (green) and P35, either alone (D) or together with dsRNA targeting Strip (E), Cka (F), or Slik (G). Discs were stained with DAPI (blue) to visualize nuclei and with anti-MMP1 antibody (red). XZ-sections of the same discs (bottom row) generated by orthogonal projection.

2.3.8 Strip and Cka control Slik localization and function in the wing disc epithelium

To test if the epithelial integrity defect triggered by Strip or Cka depletion could be linked to Slik, we used Moesin phosphorylation as a specific readout of Slik activity. Because they remain viable and integrated in the epithelium, we focused on cells in the wing hinge region. Moderate depletion of Strip or Cka reduced the level of p-Moesin in this region (arrows, Figure 2.12A-C). To quantify this, we measured p-Moesin fluorescence intensity in GFP-positive cells in the *ptc* domain versus adjacent wild-type cells in the hinge region, where several apical-basal cross-sections of the epithelium can be seen at the folds (Figure 2.12A'-C'). In wild-type discs, p-Moesin levels are uniform throughout the folds of the wing hinge region, with a small (3%) but statistically significant up-regulation in cells in the *ptc* domain (Figure 2.12A' and D). In contrast, depleting Strip (Figure 2.12B' and E) or Cka (Figure 2.12C' and F) caused a significant decrease in p-Moesin levels (by 9 and 17%, respectively). We observed a similar reduction of p-Moesin in Cka-depleted cells in the wing pouch region (Figure 2.13A). Total Moesin levels in the *ptc* domain of the hinge region were similar to those in adjacent cells (Figure 2.13B-D, quantified in H-J), indicating that it was specifically phosphorylation that was affected. The levels and distribution of *Drosophila* E-Cadherin (Shotgun, or Shg) were also similar in all three backgrounds (Figure 2.13E-G, quantified in K-M). This suggests that the changes in p-Moesin levels were not due to a global alteration of epithelial polarity.

We next examined the effect of Strip or Cka depletion on Slik localization in cells of the wing hinge region. In wild-type discs, Slik localizes uniformly within and outside of the *ptc* domain, with increased protein accumulation evident at both the apical and basal sides of the epithelial cells (Figure 2.12G, quantified in J-K). In Strip or Cka-depleted cells, the intensity of Slik staining was reduced (Figure 2.12H-I). However, this effect was not uniform. Compared to neighboring wild-type cells, Slik levels in the apical half of STRIPAK-depleted cells were unchanged (Figure 2.12L and N). However, the levels in the basal half of depleted cells were significantly lower (Figure 2.12M and O). We

conclude that dSTRIPAK controls the subcellular localization of Slik and consequently its ability to phosphorylate Moesin in imaginal disc epithelial cells, as in S2 cells.

To confirm that the effects on Moesin phosphorylation were due to altered Slik function, we tested the effect of Strip or Cka depletion in Slik-overexpressing cells. Expression of Slik in the *ptc* domain strongly increased Moesin phosphorylation (Figure 2.14A). This was largely suppressed by Strip or Cka depletion (Figure 2.14B-C, quantified in D). Thus, as in S2 cells, the ability of Slik to phosphorylate Moesin is dependent on STRIPAK.

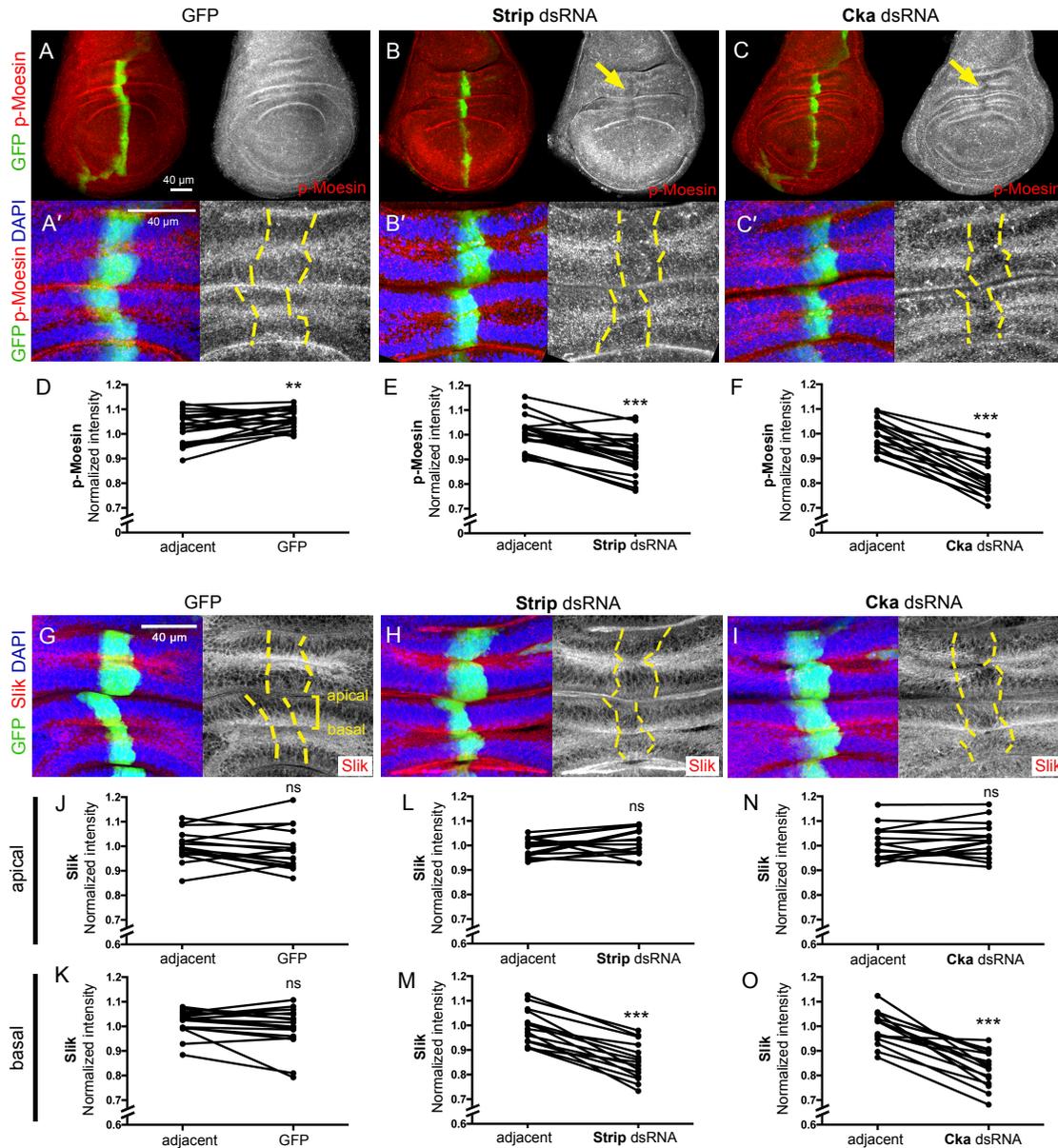


Figure 2.12 Strip and Cka control Slik localization and function in the wing disc epithelium

(A-C) Confocal projections through medial regions of wing discs expressing GFP (green) in a stripe of cells under control of the *ptc*-GAL4 driver, either alone (A) or together with dsRNA targeting Strip (B) or Cka . DNA (blue) and p-Moesin (red). Arrows indicate down-regulation of p-Moesin levels in dSTRIPAK-depleted cells in the wing hinge region. Images in A'-C' show higher magnification projections of the hinge region. Yellow dotted lines indicate limits of the GFP-transgene expression domains. **(D-F)** Quantification of normalized p-Moesin fluorescence intensity in hinge cells expressing GFP alone (D) or together with dsRNA targeting Strip (E) or Cka (F), compared to their respective adjacent wild-type (GFP-) cells. Fluorescence was measured at multiple folds in 5 wing discs for each genotype. Two-tailed paired sample *t*-test. **(G-I)** Confocal projections through the hinge region of wing discs expressing GFP (green) alone (G) or together with dsRNA targeting Strip (H) or Cka (I). Discs were stained with DAPI (blue) to visualize nuclei and antibody against Slik (red). Yellow dotted lines indicate limits of the GFP-transgene expression domains. **(J-O)** Quantification of normalized Slik fluorescence intensity in

hinge cells as above. Measurements were taken in the apical (J, L, and N) or basal (K, M, and O) halves of the cells at multiple folds in 4 wing discs for each genotype. Two-tailed paired *t*-test. *p*-value: ns $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

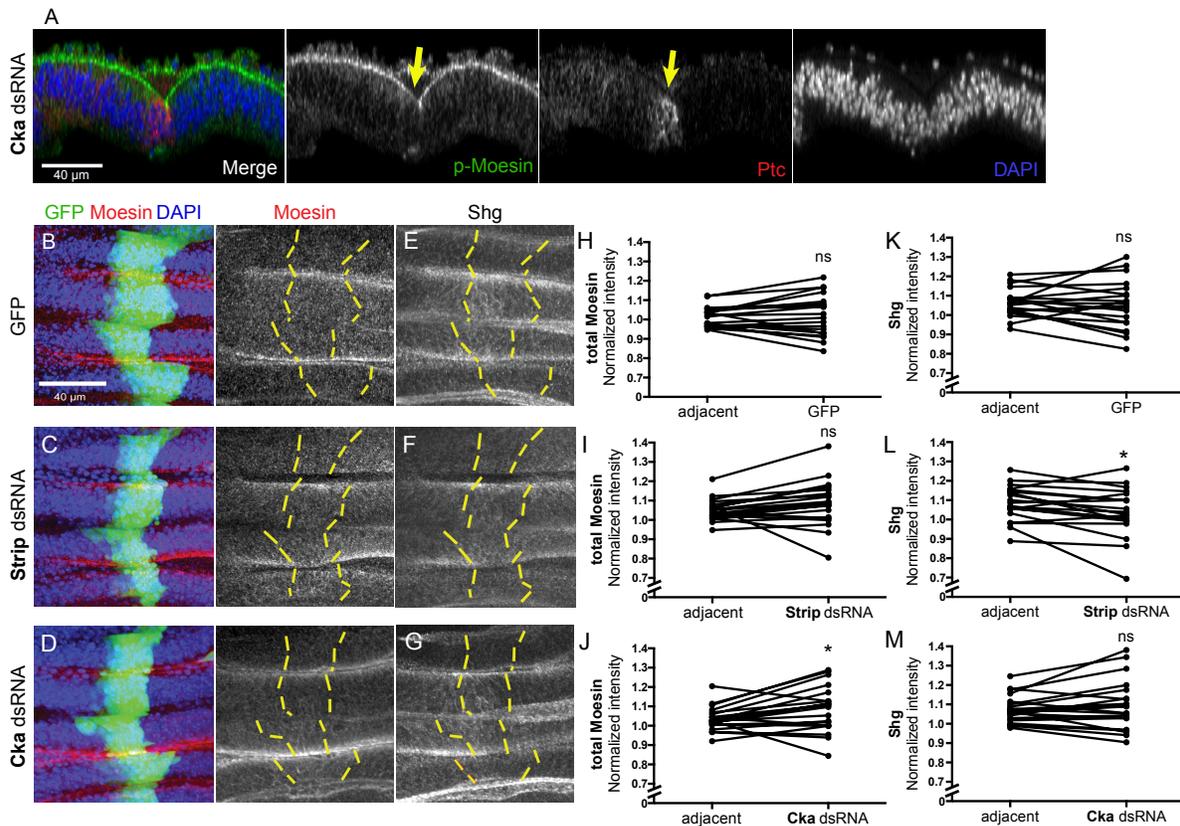


Figure 2.13 Strip or Cka depletion has little effect on total Moesin and E-Cadherin (Shotgun) levels and distribution

(A) XZ section along the anterior-posterior axis of a wing disc expressing P35 together with dsRNA targeting *Cka* in a central stripe of cells under the control of *ptc*-GAL4. The disc was stained with DAPI (blue) to visualize nuclei and with anti-p-Moesin (green) and anti-Ptc (red) antibodies. The image was generated by orthogonal projection. Apical p-Moesin levels are decreased specifically in RNAi-expressing cells in the *ptc* domain. (B-G) Confocal projections through medial portions of the hinge region of wing discs expressing GFP (green) in a stripe of cells under control of *ptc*-GAL4, either alone (B and E) or together with dsRNA targeting *Strip* (C and F) or *Cka* (D and G). Discs were stained with DAPI (blue) to visualize nuclei and with antibodies against Moesin (red) and Shg (shown separately in (E-G)). Yellow dotted lines indicate limits of the GFP-transgene expression domains. (H-M) Quantification of normalized total Moesin (H-J) and Shg (K-M) fluorescence intensity in hinge cells expressing GFP alone (H and K) or together with dsRNA targeting *Strip* (I and L) or *Cka* (J and M), compared to their respective adjacent wild-type (GFP-) cells. Fluorescence was measured at multiple folds in 5 wing discs for each genotype. Two-tailed paired sample *t*-test with *p*-value: ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$. RNAi-expression had little effect on Moesin and Shg levels and distribution, with only a small increase (4%) in Moesin levels in *Cka*-depleted cells and a small decrease (4%) in Shg levels in *Strip*-depleted cells. Genotypes: Panel A: *w;UAS-P35;ptcGAL4/UAS-cka.dsRNA* at 18°C; Panels B and E: *w;ptcGAL4,UAS-GFP/+* at 25°C; Panels C and F: *w;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-strip.dsRNA* at 25°C; Panels D and G: *w;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-cka.dsRNA* at 25°C.

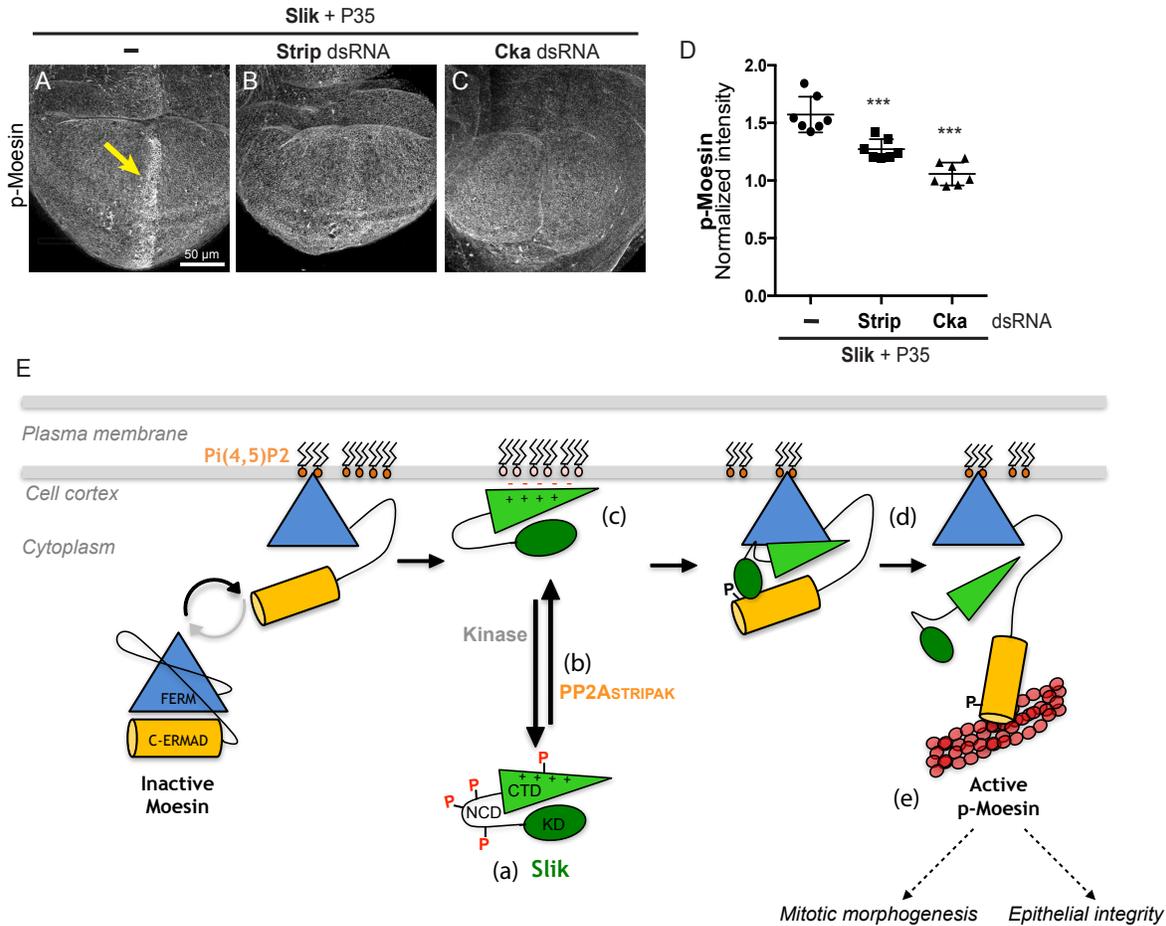


Figure 2.14 The ability of Slik to phosphorylate Moesin in discs depends on PP2A^{STRIPAK}

(A-C) Wing discs overexpressing Slik alone (A) or together with dsRNA targeting Strip (B) or Cka (C) in a stripe of cells under control of the *ptc*-GAL4 driver. Discs were stained with antibody against p-Moesin. Images are maximum projections of 56-66 confocal sections spanning the entire thickness of the disc. Arrow indicates up-regulation of p-Moesin levels in Slik-overexpressing cells. **(D)** Quantification of p-Moesin fluorescence intensity in cells in the *ptc* stripe normalized to wild-type posterior compartment cells in discs of the genotypes in (A-C). Measurements were made in 7 wing discs for each genotype. Two-tailed unpaired *t*-test with *p*-value: ****p*<0.0001. **(E)** Model for the regulation of Slik localization at the cell cortex (adapted from [107]). Cycle of phosphorylation/dephosphorylation of Slik serves as an electrostatic switch that controls Slik cortical association. (a) Phosphorylated Slik is localized in the cytoplasm due to electrostatic repulsion with the negatively charged plasma membrane. (b) dSTRIPAK phosphatase activity (PP2A^{STRIPAK}) dephosphorylates Slik and promotes its association with the cortex. (c) The poly-basic CTD is responsible for Slik localization at the cortex through electrostatic interaction. (d) Once at the cell cortex, Slik can phosphorylate the Pi(4,5)P₂-primed Moesin on its T559. (e) Activated Moesin is essential for proper mitotic morphogenesis and epithelial integrity.

2.4 Discussion

We discovered that dSTRIPAK dephosphorylates Slik to favor its association with the cortex. This regulation of Slik cortical association occurs both in interphase and metaphase. Importantly, loss of Slik cortical association correlates with a decreased activation of Moesin, the substrate of Slik throughout the cell cycle. Finally, we showed that dSTRIPAK controls Moesin-related biological functions such as mitotic morphogenesis and epithelial integrity during development.

dSTRIPAK is a multi-molecular complex that functionally bridges PP2A phosphatase activity with kinases of the Ste20-like family [197]. PP2A_{STRIPAK} was shown to inhibit the catalytic activity of its associated kinases [200-202, 220]. For instance, PP2A_{STRIPAK} dephosphorylates key regulatory residues of the activation loop of Hippo and Mst3/4 [200, 201]. Here, we found a new functional interaction between PP2A_{STRIPAK} and a Ste20-like kinase. PP2A_{STRIPAK} regulates Slik phosphorylation to control its association with the cortex and thereby regulates its activity towards Moesin. PP2A_{STRIPAK} could indirectly regulate an upstream regulator of Slik or directly dephosphorylate this Ste20-like kinase. We favor the latter hypothesis since we found that Slik associates with Cka and Strip, two major components of PP2A_{STRIPAK}.

It is unlikely that PP2A_{STRIPAK} dephosphorylates the regulatory residues of the activation loop of Slik since we did not measure any change of its kinase activity upon depletion of key components of PP2A_{STRIPAK}. We then focused on 21 other potential phosphosites and we discovered that PP2A_{STRIPAK} favors association of Slik with the cortex by regulating some of these phosphosites. Replacing these potentially phosphorylated residues by non-phosphorylatable Alanine either within the non-conserved domain or within the C-terminal domain of Slik is sufficient to promote the cortical enrichment of these two phospho-deficient mutants and to prevent their regulation by PP2A_{STRIPAK}. Importantly, both these mutants rescue or partially rescue the decrease in Moesin phosphorylation observed after PP2A_{STRIPAK} depletion. While these experiments demonstrate that global phosphorylation governs the association of Slik with the cortex, the sites regulated by PP2A_{STRIPAK} remain to be precisely identified.

We previously found that the C-terminal domain of Slik is necessary and sufficient for its association with the cell cortex [85]. Interestingly, this domain is polybasic (with a theoretical isoelectric point of ~9.6 compared to Slik ~6.1). As previously demonstrated for other signaling proteins [249, 250], these positive charges could promote the association of Slik to the negatively charged inner leaflet of the plasma membrane [6, 251]. We propose that the global negative charge brought by phosphorylation promotes the dissociation of Slik with the cell cortex by electrostatic repulsion with the negatively charged plasma membrane. In this model a cycle of phosphorylation/dephosphorylation of Slik serves as an electrostatic switch that controls Slik cortical association. We previously reported that Slik can be phosphorylated by other not yet identified kinases [85]. Consistent with this, we found that OA treatment promotes phosphorylation of a Slik kinase dead mutant even in the absence of endogenous Slik (unpublished results). We therefore favor the hypothesis that one or more other kinases regulate the association of Slik with the cortex. Our current efforts aim to identify which kinase(s) could promote the dissociation of Slik from the plasma membrane (Figure 2.14E).

PP2A phosphatase activity plays important roles during mitosis. Independently of STRIPAK, PP2A regulates mitotic exit by dephosphorylating Cdk1 substrates when associated with the B55 regulatory subunit (*Drosophila* Tws). When associated with the B56 regulatory subunit (*Drosophila* Wdb), PP2A controls spindle organization by counteracting several kinases such as Aurora-B or Plk1 [252]. However, only a few studies reported a role of PP2A_{STRIPAK} during mitosis. In mammalian cells, PP2A_{STRIPAK} regulates abscission by controlling Mink1 activity [220] and depletion of STRIP or Striatin promotes cytokinesis failures [253]. Here, we discovered that PP2A_{STRIPAK} controls mitotic morphogenesis. Mitotic cell morphogenesis requires that Moesin is activated at mitosis onset [254]. We found that PP2A_{STRIPAK} controls enrichment of Slik at the cortex of metaphase cells and subsequent Moesin activation.

Moesin and Slik play an important role in promoting epithelial integrity *in vivo*, although the details of their regulation in this context are also poorly understood. In mitotic epithelial cells, p-Moesin accumulates at the basolateral membrane and is needed for planar spindle orientation. Moesin-depleted cells frequently undergo mitoses

perpendicular to the plane of the epithelium, with the daughter cells undergoing EMT and delaminating, and ultimately being eliminated by apoptosis [233]. This appears to be a major cause of the loss of epithelial tissue integrity in *moesin* mutants [88, 233]. Several of our observations implicate dSTRIPAK in promoting Moesin activation and epithelial tissue integrity. We found that dSTRIPAK-depleted cells undergo EMT, delaminate, and are eliminated by apoptosis, particularly those located in the wing pouch. In dSTRIPAK-depleted cells in the wing hinge region that maintained their epithelial phenotype, we observed reduced levels of p-Moesin, a readout for Slik activity. This was not just correlative; the ability of overexpressed Slik to phosphorylate Moesin depended upon dSTRIPAK. Finally, dSTRIPAK-depleted cells showed a redistribution of Slik protein, with a reduction of protein levels particularly prominent in the basal half of the cells. Together, these results support the finding that dSTRIPAK is a general regulator of Slik localization to promote the morphogenetic functions of Moesin. We note that the phenotypic consequences of interfering with dSTRIPAK were more severe than those observed upon depletion of Slik, with strong dSTRIPAK depletion causing early lethality. This suggests that dSTRIPAK regulates other targets, consistent with its known role in downregulating the growth-inhibitory function of Hippo [201, 202]. Hippo signaling is particularly important for growth of the wing blade [255], which may explain why depletion of dSTRIPAK components had a stronger effect in the wing pouch versus hinge regions.

In conclusion, we identified that $PP2A_{STRIPAK}$ regulates the localization of Slik by phosphorylation to control Moesin activation. Our work places STRIPAK as a critical upstream regulator of Moesin function for mitotic morphogenesis and epithelial integrity.

2.5 Materials and Methods

2.5.1 Primary and secondary screens

Primary and secondary screens were performed in 96 well plates (BD Biosciences). 20×10^3 S2 cells per well were plated in 200 μ L and treated with 2 μ g of double-stranded RNA (dsRNA, Open Biosystems Drosophila Library 2.0). After 5 days of incubation at 27°C, cells were fixed in 10% TCA and incubated overnight with an antibody against p-ERM (1:1000, Cell Signaling). Cells were then incubated with a goat Alexa Fluor 488-conjugated secondary anti-rabbit antibody (1:400; Invitrogen A11070). Texas Red-X Phalloidin (1:600; Invitrogen T7471) and DAPI were used to stain cytoplasm and nuclei, respectively. Cells were mounted with mowiol (Bioshop). Images were acquired at 20x using an Operetta high content analysis system (PerkinElmer) and analysed using the Harmony high-content analysis software (PerkinElmer). Cells were detected by analyzing nucleus (DAPI) and cytoplasm (Phalloidin). Mean intensity of p-Moesin levels per cells (\bar{x}_i) was then measured. A score ($Score_i$) was calculated for

$$\text{each conditions } (i). \text{ } Score_i = \frac{X_i}{Median_{Platej}(X_i)}$$

X_i corresponds to the % of cells whose mean intensity of p-Moesin levels is superior to a threshold (k). k was determined by studying the distribution of cell populations upon treatment with negative (GFP) and positive control (Moesin) dsRNAs in order to match the following condition: $\%of\ cells\ in\ Well_{CTRLneg}\ with\ \bar{x}_i > k \approx 80\%$

2.5.2 dsRNA production and primers

dsRNA were produced by reverse transcription using T7 RiboMax express large scale RNA production system (P1320; Promega). dsRNA targeting Moesin, PP1-87B, Slik, and Slik5'UTR were previously reported [29, 85, 86]. dsRNA against Tws, Wdb, Wrd, and PP2A-B" were kindly provided by V.Archambault [205]. Other dsRNA were amplified from genomic DNA or cDNA (procedures, section 2.6.1).

2.5.3 Confirmation mini-screens

dsRNA treated cells were incubated with an antibody against p-ERM (1:1000, Cell Signaling) and an antibody against p-HistoneH3 (1:1000, Cell Signaling clone 6G3). Cells were then incubated with a goat Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody anti-rabbit (1:400; Invitrogen A11070) and a goat Texas Red-conjugated secondary antibody anti-mouse (1:200; Invitrogen T862). Cells were detected by analyzing nucleus (DAPI), and interphase cells (p-histoneH3 negative) were distinguished from mitotic cells (p-Histone H3 positive). Mean intensity of p-Moesin levels per cells was then measured in each cell population as described for the screens.

2.5.4 cDNA constructs

Moesin-GFP and Slik^{WT}-GFP were previously described in [29, 86]. Stag-Cka and Stag-Strip were kindly provided by M. Therrien [212]. Slik^{NCD*} and Slik^{CTD*} were obtained using cDNA synthesized by Genescript (procedures, section 2.6.2). The two mutated sequences were then cloned into pMet-Slik-GFP and replaced the wild-type sequences.

2.5.5 S2 cell culture, dsRNA treatment, transfection, or drug treatments

Drosophila S2 cells were grown at 27°C in Schneider's Drosophila medium (21720001; GIBCO) complemented with 10% FBS (12483020; Invitrogen), and 5% penicillin-streptomycin antibiotics (15070063; GIBCO). For knockdown experiments, 1.5×10^6 cells were treated with 15µg of dsRNA during 5 days. For over-expression, cells were transfected with the indicated cDNA using Fugene HD (E2311; Promega) and analyzed 36 to 72 h post-transfection. For immunofluorescence or Western blot analysis, cells were treated for 60 min with 10nM Okadaic Acid (OA; OKA004; BioShop) or 30 min with 100nM OA; or for 60 min with 50nM Staurosporine (Stau; A8192; APExBIO). For live-cell analysis, stable cell lines were treated with 50nM OA or 50nM Stau.

2.5.6 S2 stable cell lines and time-lapse microscopy

The stable cell line expressing Moesin-GFP in combination with α-Tubulin-mCherry has been previously described [86]. Stable cell lines expressing Slik^{WT/NCD*}/CTD*-GFP (under pMt promotor) were generated upon Hygromycin (Thermofisher)

selection. SlikWT/NCD*/CTD*-GFP expression was induced with copper sulfate (CuSO₄, 0.7mM) and cells were analyzed 36 h post-induction. For time-lapse microscopy, 50x10³ cells were plated in 96-well glass-bottom plates (82050-792; Sensoplate microplate Greiner Bio-One) and filmed either overnight (dsRNA treatments), or 1 hour (drug treatments) in an environmental chamber at 27°C in Schneider Medium. Cells expressing Moesin-GFP were imaged using a DeltaVision inverted Olympus microscope with a Plan Apo 60x/1.42 oil lens (equipped with a CoolSNAP HQ2 camera) and controlled by softWoRx software. Cells expressing Slik-GFP were imaged using a confocal Spinning Disk Carl Zeiss microscope with a Plan Achromat 63x/1.4 oil DIC lens (equipped with Zeiss AxioCam 506 mono camera) and controlled by ZEN 2 blue software (Carl Zeiss). Representative images were prepared for publication using SoftWorx software, ImageJ software (NIH), and Photoshop (Adobe).

2.5.7 Immunostaining imaging and image analysis of S2 cells

S2 cells were plated on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde (Alfa Aesar) for 30 min. Cells were permeabilized and blocked with TBS containing 0.1% TritonX-100 and 1% BSA (TBS-Trit-BSA) and incubated overnight with antibody against Slik (1:2000) [85]. Cells were then incubated with a goat Alexa Fluor 488-conjugated secondary anti-guinea pig antibody (1:100, Invitrogen A11073). Texas Red-X Phalloidin (1:100; Invitrogen T7471) were used to stain F-Actin. Coverslips were mounted in Vectashield medium with DAPI (Vector Laboratories). Images were acquired using a Nikon inverted Eclipse Ti microscope with a 63x/0.45 oil DIC lens (equipped with ELWD camera) and controlled by Metamorph 6.1 software (Universal Imaging). Representative images were prepared for publication using ImageJ software (NIH) and Photoshop (Adobe). Mean fluorescence intensities of Slik or SlikWT/NCD*/CTD*-GFP were measured at the cortex and in the cytoplasm using ImageJ software (NIH). Background was measured and subtracted. The ratios correspond to the mean intensity at the cortex over the mean intensity in the cytoplasm. The normalized data were then plotted using GraphPad Prism (Prism Software). The values for each single cell are represented as dots; independent experiments are shown as circles.

2.5.8 Cell lysis, SDS-PAGE and Western blot analysis

2x10⁶ cells were centrifuged and pellets were suspended in Laemmli buffer supplemented with anti-phosphatases (Sigma Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1mM Na₃VO₄, and 5mM β-Glycerophosphate) and anti-proteases (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF). Antibodies against T559-phosphorylated-Moesin (p-Moesin; 1:1000), Moesin (1:25 000) [256], Strip (1:400, kindly provided by T.Chihara, Tokyo) [224], Cka (1:200, kindly provided by T.S.Hays, USA) [225], β-Actin (1:5000, Sigma clone 4) or α-Tubulin (1:1000, Sigma clone DM1A). For Western blot quantification, the immunoreactive bands were quantified by densitometry analysis using ImageJ (NIH). Backgrounds were subtracted. Normalization was performed as described in the figure legends.

For Lambda-phosphatase assays, cell pellets were suspended in Triton lysis buffer (1mM EDTA, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.2, 10% glycerol, 0.2% TritonX-100, 1mM PMSF, Aprotinine, and Leupeptine) complemented with either phosphatase inhibitors (Sigma Phosphatase Inhibitor Cocktail, and 1mM Na₃VO₄), or λ-phosphatase (P0753S; New England Biolabs). The reaction was incubated at 30°C for 60 min, and stopped in Laemmli buffer at 95°C. For Slik mobility shift assay, cell lysates were resolved using a precast 3-8% gradient SDS-PAGE (EA0375BOX; Invitrogen). The membranes were blocked with TBS-0.1% Tween containing 5% Milk (Carnation) and then incubated with rabbit antibody against Slik (1:1000). Line scans were done by densitometry analysis using ImageJ (NIH) of Slik immunoreactive bands. The proportion of shifted Slik bands was evaluated by the ratio of the area under the lines scan curves (upwards shifted/un-shifted) of Slik in different conditions. Data of independent experiments (shown as circles) were plotted using GraphPad Prism (Prism Software).

2.5.9 Co-Immunoprecipitation assays

8x10⁶ cells were lysed 72 h post-transfection in 400μl Triton lysis buffer (1mM EDTA, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.2, 10% glycerol, and 0.2% TritonX-100) supplemented with anti-phosphatases (Sigma Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1mM Na₃VO₄, 5mM β-Glycerophosphate, 1mM PMSF) and anti-protease cocktail (DA36046;

Roche). GFP-Trap beads (Chromotek) or anti-Stag (Genescript, cat#A00625) along with Protein A agarose beads (GE, cat#17-0780-01) was added to cell lysates and gently rocked at 4 °C for 2h or 4h, respectively. The immunoprecipitates were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against GFP (1:2500, Invitrogen), Stag (1:1000, Genescript), or Flag (WB 1:4000, Sigma clone M2).

2.5.10 *In vitro* kinase assay

5x10⁶ cells were lysed in 400µl TLB lysis buffer (40mM HEPES, 1mM EDTA, 120mM NaCl, 10mM NaPPi, 10% glycerol, 1% TritonX-100, and 0.1% SDS) supplemented with anti-phosphatases (Sigma Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1mM Na₃VO₄, 5mM β-Glycerophosphate, 1mM PMSF) and anti-protease cocktail (DA36046; Roche). Cell lysates were immunoprecipitated with antibody against Slik during 4 h, and then incubated with Protein A sepharose beads during 2 h. The beads from immunoprecipitations were subjected to an *in vitro* kinase assay as previously described [244].

2.5.11 RNA extraction for quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from *Drosophila* S2 cells using the DNAaway RNA Mini-Preps Kit (BS88133; Bio Basic Canada). Total RNA was reverse transcribed with a cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). PCRs were performed on an ABI Real Time 7900HT cycler and analyzed with SDS 2.2 software, using following probes for our genes of interest and two endogenous control genes (Act5c and Rpl32) with a high efficiency (>95%): Strip Forward 5' agccaattacgcggtct 3', and Reverse 5' cgcgcatgtggatattagag 3'; Cka Forward 5' aaggatatgctcaccgagga 3', and Reverse 5' gccatcagattcggttattcacc 3'; Act5c Forward 5' accgagcgcggttactct 3', and Reverse 5' cttgatgtcacggacgatttc 3'; Rpl32 Forward 5' cggatcgatgctaagctgt 3' , and Reverse 5' gcgctgttcgatccgta 3'. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems). mRNA levels of target genes were normalized to the averaged levels of both control genes.

2.5.12 Drosophila stocks and culture

ptc-GAL4 (*ptc*^{559.1}), *UAS-GFP*, and *UAS-P35* strains were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Centre. *EP-Slik* (*slik*²⁰³⁴⁸) is an EPg element insertion upstream of the *slik* gene that drives its GAL4-dependent expression. Transgenic dsRNA strains targeting *cka* (ID #106971), *strip* (ID #106184), and *slik* (ID #43783) were obtained from the Vienna Drosophila Resource Centre (VDRC). Crosses were carried out at 18°C, 21°C, 25°C, or 27°C, as indicated. The genotypes were as follows: Figures 2.11A, 2.12A, and 2.12G: *w;ptcGAL4,UAS-GFP/+* at 25°C ; Figures 2.11B, 2.12B, and 2.12H: *w;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-strip.dsRNA* at 25°C ; Figures 2.11C, 2.12C, and 2.12I: *w;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-cka.dsRNA* at 25°C ; Figure 2.11D: *w,UAS-P35;ptcGAL4,UAS-GFP/+* at 25°C; Figure 2.11E: *w,UAS-P35;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-strip.dsRNA* at 25°C ; Figure 2.11F: *w,UAS-P35;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-cka.dsRNA* at 18°C ; Figure 2.11G: *w,UAS-P35;ptcGAL4,UAS-GFP/UAS-slik.dsRNA* at 27°C ; Figure 2.14A: *w,UAS-P35;ptcGAL4,EP-Slik/+* at 21°C ; Figure 2.14B: *w,UAS-P35;ptcGAL4,EP-Slik/UAS-strip.dsRNA* at 21°C; Figure 2.14C: *w,UAS-P35;ptcGAL4,EP-Slik/UAS-cka.dsRNA* at 18°C.

2.5.13 Immunostaining imaging and image analysis of imaginal discs

Wandering third instar larvae were dissected and anterior halves with attached wing discs were collected in PBS on ice. Discs were fixed in PBS containing 0.2% Tween-20 (PBT) and 4% formaldehyde for 20 min. After several washes with PBT, samples were blocked in PBT with 0.1% BSA (BBT), followed by incubation overnight at 4°C with primary antibodies against Slik (1:1000); p-Moesin (1:100); GFP (1:100; OriGene Technologies TP401); cleaved Caspase 3 (1:150; Cell Signaling 9661); MMP1 (1:100; 1:1 mix of Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), #3A6B4 and #5H7B11); Ptc (1:1000; DSHB, #Apa-1); Shg (1:200; DSHB, #DCAD2); Moesin (1:4000; a gift from Daniel Kiehart). Samples were incubated with Fluor-conjugated secondary antibodies (Invitrogen and Jackson ImmunoResearch Laboratories). Discs were mounted on slides in mounting medium (10% PBS, 90% glycerol, 0.2% n-propyl gallate), cover-slipped, and imaged at RT using a Zeiss LSM700 confocal microscope with a Plan Apochemat 20x/0.75 lens (Figure 2.11A-C and 2.12A-C) or a Plan Neofluor 40x/1.30 oil

lens, and controlled by Zen 2 software (Carl Zeiss). Representative images were prepared for publication using ImageJ software (NIH) and Photoshop (Adobe).

We quantified Slik or p-Moesin levels using ImageJ software (NIH). Mean fluorescence intensities were measured within the GFP-positive cells and a comparable area of adjacent GFP-negative cells within single layers of the epithelium. The measurement at a nearby third GFP-negative region was used as a normalization control. For Slik measurements, fluorescence intensity was measured separately in the apical and basal halves of the epithelium, using the midpoint of the nuclear layer as the dividing line. The normalized data were plotted using GraphPad Prism (Prism Software).

2.5.14 Statistical analysis

Results are expressed as average \pm SD or \pm SEM as indicated in the figure legends. Statistical significance between various conditions was assessed by determining p-values (95% confidence interval) using GraphPad Prism (Prism Software). Different tests were performed as indicated in the figure legends: (un)paired Student's *t* test (two experimental groups) and unpaired one-way ANOVA (multiple comparison test). Parametric tests were used because the distributions across samples were assumed to be normal, but this was not formally tested.

2.6 Procedures

2.6.1 dsRNA primer sequences

dsRNA	T7 + Primers S	T7 + Primers AS
PP2A-STRIPAK		
Strip-1	taatacgactcactatagggTGGTAGTGGTGAGT TGATTTCTTG	taatacgactcactatagggATAACAACCTCCTTTG AGCAGGAC
Strip-2	taatacgactcactatagggGAAACGGGGAGG AAGAACT	taatacgactcactatagggCAGACTCTCGTGGTC ACCAAT
Cka-1	taatacgactcactatagggAGACAGACAGACC CACATCTCC	taatacgactcactatagggATGTTGTGTTCTCTTT TCCCTTTC
Cka-2	taatacgactcactatagggAGCGTAGGACCAG TGAACAAA	taatacgactcactatagggCAGGCTGTTGACAG GACAC
PP2A-29B-1	taatacgactcactatagggCAGAGTTTGCCATG TACTTGATTC	taatacgactcactatagggGGAATCAAATCGGAC TTCAGATAC
PP2A-29B-2	taatacgactcactatagggCACCAAGGTGAAG GACTTCTG	taatacgactcactatagggTCGTTAACGCAATCC AGGTT
Mts-2	taatacgactcactatagggGCCAAGGAGATTCT CTCCAA	taatacgactcactatagggGTCCACGTAGTCGCC CAT
STRIPAK associated kinases		
GCKIII-1	taatacgactcactatagggGTAAGATAATTTCT GTGGCGATT	taatacgactcactatagggCTGCTTGCTAACCAT CTGATACTG
GCKIII-2	taatacgactcactatagggAGACAAGAAGTGG AAGGTCTCCAAG	taatacgactcactatagggAGATGCTCCTCGTGG CTGTGGTTG
GCKIII-3	taatacgactcactatagggGTATTCGATACTGC TGCGATACAG	taatacgactcactatagggAAGAAAGCTGCCATA GTACTTCGT
Msn-1	taatacgactcactatagggAGAGTCGCAGGAA ATGAAAGTTGG	taatacgactcactatagggAGACCAATGTGACAC CGTCGCGTC
Msn-2	taatacgactcactatagggGGCGTGATTATCAG CAGCAA	taatacgactcactatagggGAAGCCAAAGGTCAG GAAAC
Hpo-1	taatacgactcactatagggATGCTTTCGTGCTG GAAGAT	taatacgactcactatagggATCACGAAATGGAGC TGGAG
Hpo-2	taatacgactcactatagggCGCAGATGCAGATA GACCAA	taatacgactcactatagggAGGGCAGCTATGGAT CAGTC
Hpo-3	taatacgactcactatagggCTCATCCACACCTT GCTCT	taatacgactcactatagggCTGTGTGGCAGACAT ATGGT
STRIPAK adaptor proteins		
Ccm3-1	taatacgactcactatagggGTAATTTTGCCCTG CAATCG	taatacgactcactatagggAGCGACGCGACGTT G
Ccm3-2	taatacgactcactatagggTGCACTTTTTCTAAT ACGGCAA	taatacgactcactatagggCACATCGTCCGTCTC CATAA
Mob4-1	taatacgactcactatagggGGGGTCTGCCCTT GTTACTT	taatacgactcactatagggGAGAATCTGATCGTG CCCAT
Mob4-2	taatacgactcactatagggTGCTAGGGAAGTAC TTGTTG	taatacgactcactatagggTCTGTGCTGGCCCCG
Mob4-3	taatacgactcactatagggCGGTTCTACGCAA TATGGT	taatacgactcactatagggTGTTTTGGAGGATAAA CGCC
CG10915-1	taatacgactcactatagggGTAAGATAATTTCT GTGGCGATT	taatacgactcactatagggCTGCTTGCTAACCAT CTGATACTG
CG10915-2	taatacgactcactatagggAGCTGCATCAGTTG AGACGG	taatacgactcactatagggAAGTTGTCAGTTCCG GATGG
FGOP2-2	taatacgactcactatagggCAAATGAAGCTGTT ACGCTAG	taatacgactcactatagggGCGATTCACCATGTC CGCGTT

Slmap-1	taatacgactcactatagggAGACAAAATATCAT CGTCAGAA	taatacgactcactatagggTAAAGCTTCTTGAGG ACAAAAC
Slmap-2	taatacgactcactatagggGTGTGCGCCCTCTTT CTACCC	taatacgactcactatagggCTCGTTTTCGCAGTGC ATTCT

2.6.2 cDNA sequences of Slik mutants

Mutated Slik region	Gene Name	Sequence for Synthesis	Length (Bases)
Slik (1-2503)	Slik NCD*	CCAGTGTGGTGGAAATTCGCTAGCCAACATGTGCTTTATCACCAACCTGAA GAAGGTCTTCCACCTCGGCCGGGGTGAGGCCAAGAAGAAGCGCCTGTA CAACAACATCAAGATGGACACGGATCCGGCGGAGTTCTGGGAAATGGTC GGCGAACTGGGCGACGGAGCCTTTGGCAAGGTTTACAAGGCTCAGCAC AAGGAGCAGAAGCGATTTGCTGCCGCAAAAATGTGTCAGCTGGAGGAC GAGGAGAACCTTAGCGATCACATGGTCGAGATCGACATTCTGTCCGAGA TCAAGCACCCAAATATAGTGGAGCTGTATGAGGCCTTTTCCATCGATGAT AAGCTGTGGATGCTCATCGAGTACTGCCAGCGAGGGGCCCTGGATAGC ATTATGGTGGAGCTGGAAAAGCCGCTGACTGAGCCGCAGATTGCCATG TTTGCAAGCACATGACCGAGGGTCTCACCTTCTGCATCGCAACAAAGT CATCCATCGTGATTTGAAGGCAGGAAACGTGCTTCTCACAATGGAAGGT GGCGTCAAGTTGGCCGACTTTGGCGTTTCGGCCAAAACAAGCACACC ATGCAAAAGCACGACACCTTCATTGGCACTCCCTACTGGATGGCCCCGG AGCTGGTGTCTTTCGAAAACTTCCGGGACAACCCGTACGATCACAAAGT GGACATCTGGTCACTGGGCATCACGCTCATTGAGCTGGCCAGATGGA GCCGCCAACAGCGAGATGTCGCCCATGCGAGTGCTCTTGAATAACAA AAGAGCGAGCCGCCAAGCTGGAGCAGCCTTCTCGATGGAGCAAGGA GTTTAACGACTTCTGAAGAAGTCTTAGTCAAAGATCCGCAGGTGAGG CCCACGACGGATGTGCTGATGCAGCACGCTTTCATCAACAGAAATCTGG ATGCCAAGCCTATCAAGGATCTGCTGCTTGAGTACAAGGCCGAGGTCTGT GGAAGAGGTGGTGGATGATGAGACCGAGGAACCCCGCAACTCGGCCT CCAGCTCGACCTGGACGATGACGCCGCTGCCCTGCAGGCCCAAGACAT TGACAAACTTCCAGGTGCCCTACATCCATTTTGGGGATGCCAAAGAG CAGTCCCAACCAAGTAGCAGTTTACCAATCGCAGCAGCGGCAACTGCAG CAGCAGCAGCTACAACCACAATAAGCAACCCGCCCGGACAGACCAA ACCACACAAAGGATGACAATGCTGAAGCGGCAGCCCAGCAGCCGCCTC ATACCAAAGTGCCTGCTCCAGCGCCGCGTCTGCCAACAACAAACGCCAC CACCGCAAGTTCAGCAGCCACCTGCCCCACCAGCCCAACCCACAGCGG CTGTGCTGCAAAAGAAAACCCGAAGATGTGGCAGCTGTTGCAGAAACATC TGAGAAAACCGAATCCGACAAGAAGCACTTTGTCAAAAAGGGTAAGGCC CCGCCCCCGCCGGCCCCATTGGGTCTTGCAAATGCCAAGCCGGCTGCC AGCGACTCCCAGACGGCCCCCAAAAACTGGCCACTCCCAGACCCACT TCTCCAGTCACCACGGCTATTGAGGTGGCCATTGGCCAAGAAGCGATGG AGCCCAACCCGACGCCGCGCATCGCCACAGCCTCCTCCATTGTGTCTGT GCAATCGGTGGCCTCTCCAGCTCTTCGGGCAGTGTTCAAATGCTGTT CTCAGCTCGAGCACTTCCCTTAT	1724

<p>Slik (1681-2503)</p>	<p>Slik NCD*</p>	<p>TGCTGTTCTCAGCTCGAGCACTTCCCTTATTACCATCAACAGCGATCCAC CCACACCGCATCATCACCAACCGCTGCCACCTCAACCGCAGCACTTGAT TTTGCCAAACAGCTTGGAGTCGGTGAGTCAGATAACAGTCGTGACCAGC ACCCATCCGCCGGTAATCATCGACAACCTCGGTGATGCCACCGCAAAACG AGGTGATCATCGTATCCAATGATATGAACAAGAGCACTCACCTGCATGAA TCTGCCGCCGACGATGATTTTCCAGCCCTGGACGACGCCTTGGGTGAT GCCACCACGCCGCCCCACAAGCAATCCTCAATGATATTGGCTGTTAATGA GCCAGCAGGTGTGGTTCCTGCTCCTCCGTCCGCAACCGCAAAACGTCTTC CACTGTTACGCACGCAAACTGGATGAAAGTGAGGTGTTAATCGTCAGT CCGTCTACGCGGATGATGACTCGGCCTATAATACGGCTAGCGGCAGTC ATAGCCACGATCACAGTGACCATCTGATGGACACGAGCCACGTCTCCGT GGTCACCGTGGGCGATGAGGGAGTTAAGGTGAAGGACAGCAGCAATGA GCTGGTCAAGCGTCAGCCAATGGAGTTGGCATTGTGCCGGAAGACGT AAACATAATTGTAACCGATTCAAACAGGAGAAGCGGGCCCCGGACGCC TCGCTGAGCGAGAATGGCGCCGTGCGCGGACGGCGTGGTATTGAGGT GCTGGTTGGCGGCAGCGGAGGATCCGACGTGGACAGCATTGGCACAAA CACTAGTCAGGAAAGCCGGCACGAAACGGATCACAACAACAAGCAGCA GTATCCAGCGGCCGCGCTGATGCC</p>	<p>852</p>
<p>Slik (2504-3740)</p>	<p>Slik CTD*</p>	<p>GCAGCAGTATCCAGCGGCCGCGCTGATGCCTCCACCACCTCCCTCGTT GACGAATAACCACAATCACGAGACCATTGATGAGGAAGAGGAGGTGGTG ATCCGACCCAAGGCTAGGGTTCGGCCGTAGTTAAGTCTGCAATGCTC AAGGTCTTACCAAGGAAGAGATTGAGCTGCGCAATCTGCGCAAGAAAC ACGCAAGCGCACCCGCAAATTCGAGATCGATGGCGTGCAATGACCAC CACCACAAGCCGAGTGATCTACGGGGACGATGAGAACGGACGAATCTAC GATGATCACGACTTCCGTAAGCAGGAGCTACGTGAATTAAGCTGCTGC AGAAGCAGGAGAAGAAACAGCAGACGGAACCTGCACTTAAAGGAGCAGC AGGCCAAGGAACAGCAGGATCGTCGCTTTGAGCAGGAGCGCTCCTCGC TGGAAAAGACCTACGAAGCTGACATGGATATGCTAGCGCGACAGCACAA GCAGCTGGTGGAAAAGACAGAGCAGACGCAGGAGAACGAGCTGCGCT CCTCATCTAAACGCATTGCTCCGAGCAGGAGCAAGAGTTGAAGATCTT CCGAGAGAATCTCAAGCAGGAGATCCGACTGCTCAAGCAGGAAGTTGA CCTGTTTCCCAAGGACAAGCGCAAGGATGAGTTCAAGCAGCGGGCGCTC AGCCATGGAAGTAGACCACGAAGAGAAGGAACGCGCCTTCTGGATTCT TTAAAGGAGAGGCATGAGCTTCTACTAAGGCGATTAAGCGAGAAGCATC GGGACCACCTGGCCACCATCAACCGCAACTTCTTGCAGCAGAAACAGA ACGCCATGAGGACGCGGGAGGCACTTCTCTGGGAACTAGAGGAGAAGC AACTTCACGAACGACATCAGTTGTCCAAGCGGCATGTAAAGGAACTATG CTTCATGCAGCGACATCAGATGATAATCCGGCACGAGAAGGAGCTGGAC CAGGTGAAGCGTATGTTGCAGCGTAAGGAGGAGGACATGGTCAAGAAA CAGACGATGGAAAAGCGGGCGCTGCCAAAGCGCATCCGTGCGGAACG CAAGGCGCGAGATCTTATGTTCCGTGAAGCCCTTGAATTGCCGCCAAC CTAGATCCTGAAATCGAACCGGATCGCTTGAAGAAGTTCCAGGAGCAAG AGAAAAAGCGTTATATGCAGGAGGAGCGACGCTTCAAGTCAAGCATCA AAAGCAATTGGAAGAGCTACGCGCTACACGCGAAGCCGCATAAAAGAG CTGGAGCAACTTC</p>	<p>1274</p>

2.7 Notes

2.7.1 Acknowledgments

We thank C. Charbonneau for its assistance at the IRIC Bio-imagery Facility, M. Therrien and M. Sahmi for plasmids and technical support, V. Archambault and M. Larouche for dsRNA primers.

2.7.2 Fundings

This work has been supported by CIHR (MOP-142374 to P.P Roux, MOP-106246 to D. Hipfner, MOP-133683 to S. Carreno and PJT-162109 to D. Hipfner and S. Carreno) and NSERC Discovery Grant (RGPIN-2017-04736 to P.P. Roux, RGPIN-2017-05819 to D. Hipfner and RGPIN-2017-05170 to S. Carreno). C. De Jamblinne held a scholarship from Wallonie-Bruxelles International, and a doctoral scholarship from IRIC and from Montreal University's Molecular Biology Program. N. Srisandarajah held a FRQS doctoral training award. K. Leguay held doctoral scholarship from IRIC and from Montreal University's Molecular Biology Program. The authors declare no competing financial interests.

2.7.3 Author contributions

S.C. and D.H. managed the project.

S.C., D.H., and C.D.J. conceptualized and designed the experiments.

C.D.J., M.D., N.S., M.J., K.L., B.R. and P.P.R performed the experiments.

S.C., D.H., P.P.R, S.L., C.D.J., B.R. and B.D. analyzed the data.

S.C., D.H., and C.D.J. prepared the figures for the manuscript.

S.C., D.H., and C.D.J. wrote the manuscript with input from all coauthors.

3. Questions en suspens dans le projet de recherche

Dans ce projet de recherche nous avons découvert que dSTRIPAK active la dMoésine en contrôlant la localisation corticale de la kinase Slik. Nous avons également révélé que dSTRIPAK régule les fonctions morphogénétiques associées à l'activation de la dMoésine par Slik, notamment la morphogenèse mitotique et l'intégrité épithéliale. Comme dans tout projet de recherche, d'autres questions importantes restent en suspens: Comment exactement Slik est associée au complexe dSTRIPAK? Est-ce que PP2A_{STRIPAK} déphosphoryle Slik directement et sur quels résidus? Quelle(s) kinase(s) est(sont) impliquée(s) dans cette voie de signalisation? Est-ce dSTRIPAK régule bien les fonctions morphogénétiques par le biais de cette voie de signalisation? Dans cette section, je discute ces interrogations, j'analyse les limites de notre recherche, et je propose des perspectives expérimentales pour y répondre.

3.1 Caractériser l'interaction entre Slik et le complexe dSTRIPAK

Alors que l'association des membres de GCK-II, GCK-III et GCK-IV avait été caractérisée au sein de STRIPAK dans différents organismes [197], nous avons identifié pour la première fois l'association d'une kinase GCK-V dans le complexe. En effet, par des expériences de co-immunoprécipitation nous avons révélé une interaction réciproque entre Slik-GFP et Stag-Strip ou Stag-Cka dans les cellules S2 de drosophile (Figure 2.4). Confirmer l'assemblage du complexe dSTRIPAK/Slik avec les protéines endogènes est toutefois nécessaire pour éviter les artefacts liés à la surexpression et/ou à l'ajout d'étiquettes en N- ou C-terminal. Nous avons ainsi identifié Strip et PP2A-29B dans une analyse protéomique préliminaire de SlikCTD (résultat non publié). Toutefois, l'interactome de Cka purifié à partir de cellules embryonnaires Kc167 de drosophile, a révélé la présence des kinases GckIII, Msn et Hpo, mais pas de Slik [201]. Cela suggère que l'interaction dSTRIPAK/Slik est soit spécifique aux cellules S2, soit plus faible que les autres kinases associées. Afin d'examiner cette dernière possibilité, j'avais comparé l'interaction entre Slik et Msn avec dSTRIPAK dans des cellules S2 (Figure 2.15A). Bien que ce résultat de co-immunoprécipitation soit préliminaire, il suggère que moins de molécules Slik-GFP interagissent avec Strip et Cka, comparativement à GFP-Msn. De

plus, des analyses protéomiques suggèrent que différents sous-complexes de STRIPAK co-existent au sein d'une même cellule [195, 201].

Récemment il a été démontré que des kinases GCKs interagissent directement avec la Striatine et STRIP par le biais de leur domaine kinase [209]. Sachant que les domaines kinases sont bien conservés parmi les membres GCK, Slik lie potentiellement Cka et Strip par le biais de ce domaine. De manière intéressante, j'ai obtenu des résultats préliminaires indiquant que le domaine C-terminal de Slik n'est pas requis pour son association aux membres de dSTRIPAK (Figure 2.15B). Par ailleurs, les kinases sont également recrutées au sein du complexe STRIPAK par le biais de protéines adaptatrices [201, 202, 209]. Puisque la suppression individuelle de Mob4, Fgop2 et SImap diminue le niveau de phosphorylation de la dMoésine mesuré par immunofluorescence (Figure 2.3), je propose qu'ils participent au recrutement de Slik au sein du complexe phosphatase.

Enfin, des kinases GCKs sont associées au complexe de manière phospho-dépendante. Effectivement, aussi bien un traitement à la λ -phosphatase, que le mutant catalytiquement inactif de la kinase, ou le mutant phospho-déficient de régions non-catalytiques abolissaient le recrutement de MST2 et MST4, ou Hpo, au sein du complexe (d)STRIPAK [202, 209]. Si l'assemblage dSTRIPAK/Slik est également dépendant de la phosphorylation de Slik, nous nous attendons à ce que les mutants phospho-déficients de Slik^{NCD/CTD} soient moins associés à dSTRIPAK que Slik sauvage. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les mutants Slik^{NCD/CTD} sont enrichis au cortex cellulaire, alors que Cka et Strip sont majoritairement cytoplasmiques (Figure 4.5). En conclusion, j'émetts l'hypothèse que Slik est recrutée de manière transitoire et phospho-dépendante au complexe dSTRIPAK par le biais des protéines d'échafaudage Cka et Strip, ainsi qu'avec la participation de protéines adaptatrices.

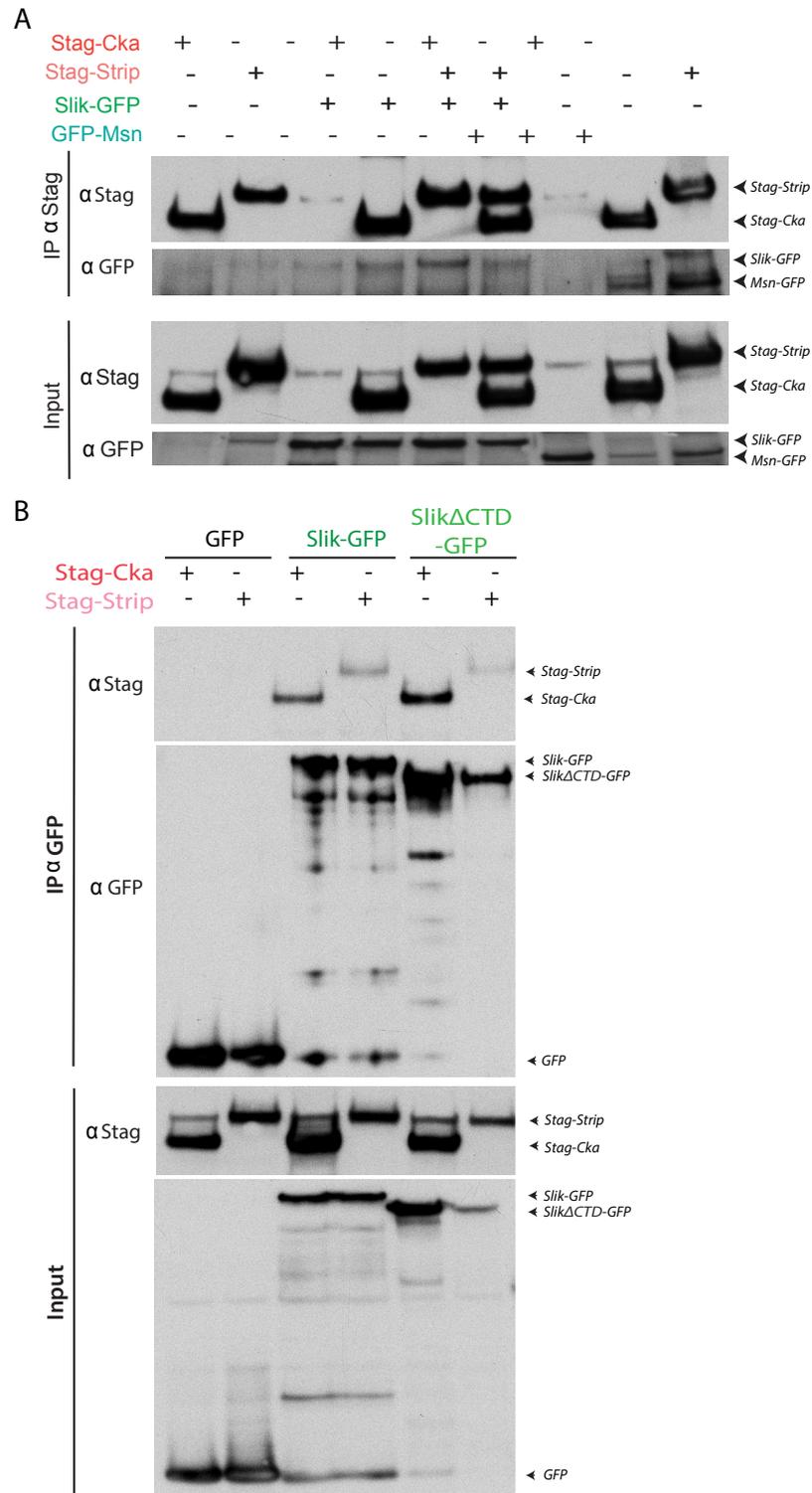


Figure 2.15 Le CTD n'est pas nécessaire pour l'association de Slik à dSTRIPAK

Les lysats cellulaires de cellules S2 exprimant de manière transitoire les ADNc indiqués ont été immunoprécipités avec des anticorps anti-Stag ou anti-GFP et analysés par immunobuvardage (pour les procédures expérimentales voir chapitre2, section 2.5.9).

3.2 Comment dSTRIPAK induit la déphosphorylation de Slik?

Les études sur STRIPAK ont révélé que ce complexe phosphatase orchestre la déphosphorylation des kinases associées [200, 202, 209]. Cette déphosphorylation a lieu sur les sites activateurs et sur les domaines non-catalytiques de kinases GCK-III et GCK-II [202, 209]. Notre recherche a décelé que la fonction phosphatase de dSTRIPAK promeut également la déphosphorylation de Slik. En effet, l'inhibition chimique de PP2A ou la suppression des composants de PP2A_{STRIPAK} causent un retard de migration sur gel de Slik, dépendant de sa phosphorylation (Figures 2.4 et 2.5). Toutefois et contrairement aux autres kinases associées, dSTRIPAK n'affecte pas l'activité kinase de Slik *in vitro*, suggérant que ses sites activateurs ne soient pas ciblés par le complexe. Par contre, puisque les mutants non-phosphorylables des domaines NCD ou CTD de Slik (Slik^{NCD/CTD}) ne sont pas régulés par dSTRIPAK (Figure 2.8), nous suggérons que PP2A_{STRIPAK} déphosphoryle les domaines non-catalytiques de Slik. Toutefois, nous n'avons pas défini les sites spécifiques, ni si cela se passe de manière directe ou indirecte.

Afin de vérifier si PP2A_{STRIPAK} déphosphorylait MST3, Gordon *et al.* avaient identifié des mutations dans le domaine *coiled-coil* de la Striatine centrale qui abolissaient son interaction avec PP2A (Striatine^{ΔPP2A}) [200]. Contrairement à la Striatine sauvage, la surexpression de la Striatine^{ΔPP2A} induisait un retard de migration sur gel de MST3. Ce résultat indique que l'hyperphosphorylation de MST3 est dépendante de PP2A_{STRIPAK}. Une expérience similaire avec Cka sauvage et Cka^{ΔPP2A} nous permettra premièrement de vérifier que PP2A_{STRIPAK} cause bien l'hyperphosphorylation de Slik. Ensuite, un essai phosphatase *in vitro*, nous indiquera si Slik est le substrat direct de PP2A_{STRIPAK} (purifié par son association avec Cka). Comme contrôle dans cette expérience, il sera nécessaire d'identifier les résidus sur Slik régulés spécifiquement par dSTRIPAK afin de les muter en Alanine non-phosphorylable. Des analyses phospho-protéomiques nous permettront d'examiner les sites de phosphorylation modifiés en absence de dSTRIPAK.

3.3 Quelle(s) kinase(s) contrecarre(nt) l'activité de dSTRIPAK sur Slik?

Identifier la(les) kinase(s) qui contrecarre(nt) la déphosphorylation de Slik par dSTRIPAK reste une question irrésolue pour le moment (Figure 2.14). Dans le cas des kinases GCK-II (MST2 ou Hpo chez la drosophile), il s'agit d'autophosphorylation sur leurs domaines intermédiaires [202]. Le laboratoire du Dr David Hipfner a précédemment démontré que la kinase Slik s'autophosphoryle, mais est également transphosphorylée par d'autres kinases [85].

Pour tester si l'autophosphorylation de Slik régule sa localisation, j'ai observé le mutant catalytiquement inactif Slik^{K66R} dans des cellules dépourvues de Slik endogène (Figure 2.16A-C). Dans le cas où Slik est responsable de son autophosphorylation sur ses domaines non-catalytiques, Slik^{K66R}-GFP serait enrichie au cortex cellulaire. J'ai au contraire mesuré une légère diminution de la localisation de Slik au cortex cellulaire. De plus, j'ai également examiné le retard de migration sur gel de la forme sauvage ou catalytiquement inactive de Slik en réponse au traitement à l'acide okadaïque (Figure 2.16D). Malgré l'absence de Slik endogène, les deux formes de Slik présentaient un retard de migration sur gel similaire. Tel que proposé précédemment [85], cela indique que d'autres kinases phosphorylent Slik.

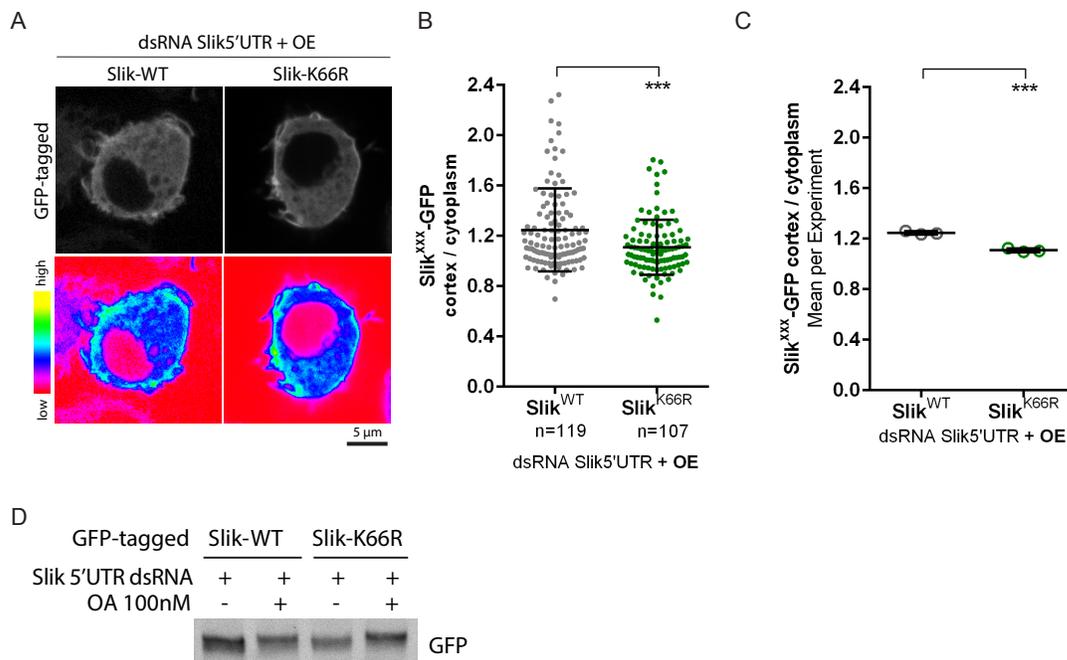


Figure 2.16 L'activité kinase de Slik ne contrôle pas sa localisation corticale

Des cellules S2 dépourvues de Slik endogène et exprimant la forme sauvage (Slik-WT) ou catalytiquement inactive (Slik-K66R) de Slik ont été **(A)** observés par microscopie et **(B-C)** dont la localisation corticale a été mesurée; **(D)** ont été traitées avec de l'acide okadaïque (OA, 100nM 30') et dont les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage (pour les procédures expérimentales voir Chapitre 2, section 2.5.8).

Nous cherchons donc une Ser/Thr kinase qui phosphoryle Slik pour induire sa translocation du cortex cellulaire vers le cytoplasme. Nous nous attendons à ce que la perte de fonction de cette kinase inhibe l'hyperphosphorylation de Slik suite à l'inhibition de PP2A_{STRIPAK}, cause l'enrichissement de Slik au cortex, et augmente ainsi l'activation de la dMoésine. Au cours de mon doctorat, nous avons ainsi envisagé plusieurs possibilités:

- (i) Premièrement, dans le crible génomique (Figure 2.1) nous avons identifié six kinases (Cdk9, Cdk12, Hep, Wnk, Wts, AMPKalpha) comme potentiels inhibiteurs de la dMoésine. Par immunobuvardage, j'ai d'abord confirmé que leur suppression individuelle cause bien une augmentation de la phosphorylation de la dMoésine. Toutefois, en leur absence, Slik présentait toujours un retard de migration sur gel suite au traitement à l'acide okadaïque (résultat non publié). Afin de tirer une conclusion, il sera nécessaire de vérifier ce résultat dans les cellules dépourvues spécifiquement de PP2A_{STRIPAK}. De plus, examiner la localisation de Slik suite à la suppression de ces kinases, nous renseignera aussi sur leur implication dans la voie de signalisation.
- (ii) Deuxièmement, nous avons envisagé les autres kinases associées à dSTRIPAK. Toutefois, nous n'avons trouvé aucune des ces kinases impliquées dans la signalisation de la dMoésine (Figure 2.3). Conformément à ces résultats, dans les cellules de mammifères, la suppression de la GCK-III, MST4 n'induit pas de changements de phosphorylation de l'Ézrine [47, 217]. Par contre, dans les oocytes de drosophile, la suppression de la GCK-IV, Msn cause une diminution de phosphorylation de dMoésine [244]. Dans ce tissu, il a toutefois été montré que Slik n'affecte pas l'activité de la dMoésine.
- (iii) Finalement, l'équipe du Dr Luc Sabourin a révélé que la Ser/Thr kinase CK2 phosphoryle directement deux résidus S347/348 sur le domaine NCD de Slik [104].

La mutation de ces résidus en Alanine non-phosphorylable empêche la régulation de l'activité kinase de Slik par Src. De manière intéressante, la localisation de Slik au cortex cellulaire est nécessaire pour ce contrôle par Src [104]. De plus, CK2 et Slik colocalisent en périphérie cellulaire [104]. Donc CK2 est un candidat intéressant qui phosphorylerait potentiellement Slik au cortex cellulaire pour contrecarrer l'activité de dSTRIPAK.

3.4 Vérifier que dSTRIPAK contrôle la morphogénèse mitotique et épithéliale par le biais de la dMoésine

À ce jour, une seule fonction mitotique est associée à l'activité phosphatase de STRIPAK. En effet, PP2A_{STRIPAK} s'est avéré réguler l'abscission en contrôlant l'activité de Mink1 dans les cellules de mammifères [220]. Ainsi, le temps d'abscission était allongé et le taux de binucléation était augmenté dans la population de cellules dépourvues de STRN4 ou Mink1 [220]. Par ailleurs, deux autres protéines adaptatrices de STRIPAK sont associées à des fonctions mitotiques. Premièrement, la suppression de Mob4 cause des fuseaux mitotiques tripolaires dans les cellules S2 [257]. Deuxièmement, la perte de fonction de SLMAP entraîne une augmentation significative du nombre de centrioles dans les cellules de mammifères [253]. Frost *et al.* ont spéculé dans cet étude que les interactions avec STRIPAK soient limitées à des phases spécifiques du cycle cellulaire. Dans notre étude, nous avons découvert que les cellules S2 dépourvues de Strip et Cka présentaient un défaut de recrutement de Slik à l'entrée de la division (Figures 2.9), une réduction du niveau de phosphorylation de la dMoésine en mitose (Figure 2.3) ainsi qu'une perte de son association membranaire en métaphase (Figure 2.10). Enfin et de manière corrélative aux phénotypes de perte de fonction de la dMoésine [29], nous avons observé que la suppression de Strip ou Cka induit des événements d'instabilité corticale pendant la division cellulaire de cellules S2 (Figure 2.10). Toutefois, une expérience de sauvetage est nécessaire pour tester si la voie de signalisation Slik/dMoésine est responsable de la morphogénèse mitotique altérée en absence de dSTRIPAK. Puisque l'expression du mutant phosphomimétique dMoésine-T559D promeut une stabilité corticale trop élevée [86], son utilisation n'est pas recommandée pour étudier la morphogénèse cellulaire. Il faudra effectuer une

expérience de sauvetage avec la forme de Slik mutée spécifiquement aux sites contrôlés par dSTRIPAK.

D'autre part, STRIPAK est à ce jour surtout connu comme étant un complexe régulateur de la voie de signalisation Hippo [196, 201, 258, 259]. En effet, STRIPAK inhibe les kinases GCKs (MST1, MST2 ainsi que MAP4K4) activatrices de la voie Hippo [196, 203]. Des stimuli mitogéniques favorisent ainsi le recrutement de ces kinases au sein du complexe pour bloquer la voie Hippo et induire la prolifération [196]. À l'inverse, la protéine d'échafaudage SAV1 (*Protein salvador homolog 1*) de la voie Hippo, inhibe STRIPAK afin d'activer les kinases MST1/2, et par conséquent la voie Hippo [258]. Tel que mentionné dans la discussion de l'article, la suppression de Hpo dans le disque imaginal de l'aile cause une croissance excessive de l'aile de la mouche adulte [201]. La co-suppression de Hpo et Cka restaure ce phénotype de surcroissance. Toutefois, dans cette condition, l'aile adulte présentait une taille réduite par rapport à l'aile sauvage. Ribeiro *et al.* ont ainsi suggéré que Cka affecte d'autres voies de signalisation en plus de Hippo. De manière intéressante, l'aile de mouche mutante pour Slik est également plus petite que l'aile sauvage [83]. Donc dSTRIPAK contrôle potentiellement la morphogénèse du disque de l'aile par le biais de la voie Hippo et l'activité de Slik.

De plus, nous avons observé que les cellules épithéliales du disque de l'aile dépourvues de Strip ou Cka subissent une mort cellulaire excessive. Lorsque l'apoptose est inhibée par l'expression de P35, nous avons découvert que les cellules mutantes triées à la base de l'épithélium subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse (Figure 2.11). Dans les cellules dépourvues de Strip ou Cka restées dans l'épithélium, nous avons observé un défaut de recrutement de Slik et une réduction du niveau de phosphorylation de la dMoésine (Figure 2.12), sans pour autant affecter la polarité cellulaire (Figure 2.13). Ces observations phénocopient les cellules épithéliales mutantes pour Slik [84]. Cependant, n'ayant pas effectué d'expériences de sauvetage, nous ne pouvons pas exclure que d'autres voies de signalisation soient impliquées dans ce processus morphogénétique.

**CHAPITRE 3: dSTRIPAK/Slik contrôle la biogenèse des
cytonèmes et la signalisation à distance chez la
drosophile**

1. Résumé

L'homéostasie qui régit le développement d'un organisme est contrôlée par la communication entre les cellules qui le compose. L'existence de cytonèmes, des filopodes spécialisés qui échangent des morphogènes, a révolutionné la compréhension de l'embryogenèse chez la drosophile. Toutefois, les mécanismes moléculaires spécifiques à leur biogenèse ne sont pas identifiés.

L'équipe du Dr David Hipfner a précédemment découvert que la kinase Ste20 Slik est impliquée dans l'homéostasie tissulaire. En effet, la surexpression de Slik dans l'épithélium du disque imaginal de l'aile induit de la prolifération cellulaire de façon autonome et non-autonome [83]. De manière surprenante, cette fonction est indépendante de son activité kinase, et de la voie canonique des MAPKs. De plus, le domaine C-terminal (CTD) de Slik, responsable de sa localisation apicale dans l'épithélium, est requis pour cette signalisation de croissance [85]. Au Chapitre 2, nous avons découvert que Slik est associée au complexe phosphatase de dSTRIPAK, qui régule sa localisation au cortex cellulaire. Nous avons alors émis l'hypothèse que dSTRIPAK/Slik promeut la signalisation à distance par le biais de cytonèmes.

Bodeen *et al.* ont fourni la preuve que les analyses morphologiques initialement obtenues dans les cellules S2 en culture récapitulaient ceux observés dans les disques de l'aile [68]. Nous avons ainsi utilisé les cellules S2 pour élucider la fonction de dSTRIPAK/Slik sur la morphogenèse des cytonèmes. En parallèle, nous avons utilisé la prolifération non-autonome induite par Slik [83] pour tester la signalisation des cytonèmes. Conformément à la communication à distance *in vivo*, nous avons découvert que la surexpression de la kinase Slik double la longueur des cytonèmes de manière indépendante de son activité kinase. De plus, SlikCTD est requis et suffisant dans cette fonction non-catalytique de Slik. Nous avons ensuite révélé que dSTRIPAK est nécessaire à la formation des cytonèmes *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'à la signalisation de croissance induite par Slik. Donc notre recherche met en évidence que dSTRIPAK/Slik régule la biogenèse des cytonèmes et leur fonction de signalisation. Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent toutefois à être définis.

2. Manuscript

dSTRIPAK/Slik controls cytoneme biogenesis and long-range signaling in Drosophila

Sébastien Carréno^{1,5} **David R Hipfner**^{2,3,4,6} and **Camille De Jamblinne**^{1,4} managed the project, conceptualized and designed the experiments.

Camille De Jamblinne^{1,4}, **Ophélie Delcorte**¹, **Marie Bordet**¹ and **Basile Rambaud**^{1,4} performed experiments on S2 cells, and analyzed the data.

Mehrnoush Dehghani^{2,3} and **Mathieu Joseph**^{2,4} performed experiments on drosophila wing discs, and analyzed the data.

¹ Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Canada.

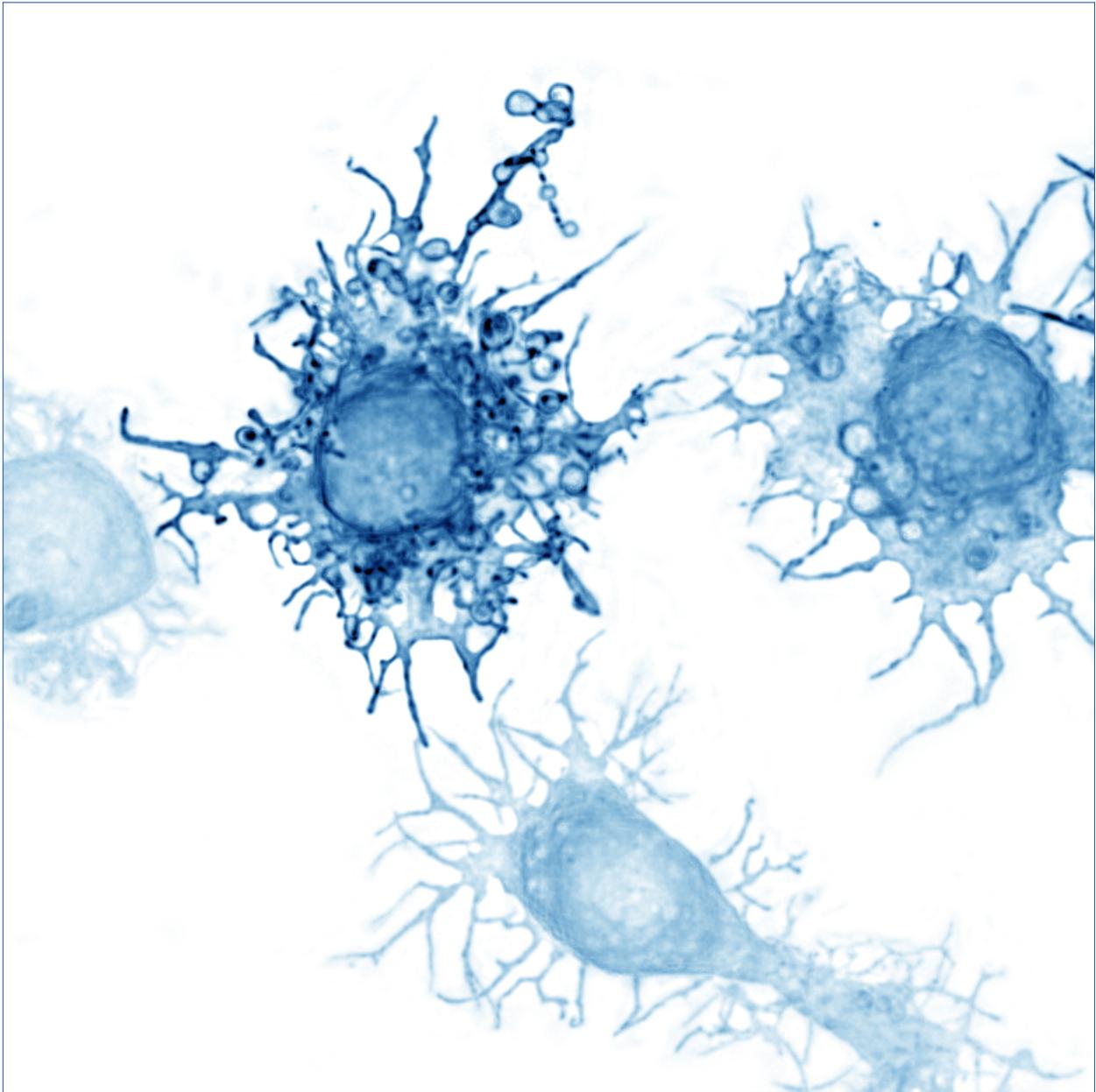
² Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal, Canada.

³ Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Canada.

⁴ Programmes de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Canada.

⁵ Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Canada.

⁶ Département de Médecine, Université de Montréal, Canada.



« Networker »

Long-range communication by specialized filopodia in Drosophila S2 cells

IRIC Science Reflexion, 2018
By Camille de Jamblinne and Nikon Service

2.1 Abstract

Intercellular communication is crucial for adequate response during embryonic development and adult homeostasis. In the developing *Drosophila* imaginal discs, specialized filopodia called cytonemes were found to mediate long distance communication. Despite the important signaling function of cytonemes during embryogenesis and tumorigenesis in *Drosophila*, how they are formed and regulated is not understood. We previously reported that the Sterile-20 kinase Slik induces a non-autonomous tissue growth signaling response in wing imaginal discs. More recently, we discovered that Slik is part of dSTRIPAK complex, whose phosphatase activity regulates Slik localization at the cell cortex. In this study, we identified dSTRIPAK/Slik as a new regulator of cytoneme signaling. We found that Slik localizes on cytonemes of cultured cells and wing discs. Moreover, we showed that its over-expression increases cytoneme length. We also discovered that Slik promotes transport and release of exovesicles along cytonemes. dSTRIPAK is required for cytoneme biogenesis, as well as for Slik-induced long-range signaling *in vivo*. Thus, our results indicate that Slik long-range signaling is mediated through cytonemes in a dSTRIPAK-dependent manner.

Key words: Slik, STRIPAK, cytoneme, morphogenesis, non-catalytic function

2.2 Introduction

Embryonic development relies on a dynamic balance between cell proliferation, differentiation and apoptosis. This balance is accurately regulated by the exchange of signaling molecules between cells. A rupture of this cell homeostasis can lead to uncontrolled cell proliferation, which is at the origin of cancer development. In order to uncover underlying molecular mechanisms controlling cell homeostasis, we previously performed genetic screens to identify genetic alterations that modify tissue growth in *Drosophila* imaginal discs. We identified Slik (Sterile20-like kinase) as a regulator of tissue growth [83]. Slik overexpression increases cell death in wing imaginal discs. When apoptosis was prevented through overexpression of baculovirus P35, Slik overexpression increased cell proliferation and induced tumor-like tissue overgrowth.

Slik is a Ser/Thr Ste20 kinase of the GCK-V subfamily [97]. We recently discovered that Slik is associated with dSTRIPAK (*Drosophila* Striatin Interacting Phosphatase and Kinase). By dephosphorylating Slik, the phosphatase core of dSTRIPAK complex promotes Slik association with the cortex (Chapitre 2). Thereby dSTRIPAK promotes Slik kinase-dependent phosphorylation of Moesin, the only ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) orthologue in *Drosophila*, which crosslinks Actin filaments and microtubules to the plasma membrane [29, 32, 84]. Previously, we also found that Slik induces epithelial tissue growth at a distance independently of its kinase activity [84]. Overexpression of Slik or of its catalytic inactive mutant in the disc proper (DP) epithelium, increased DP cell proliferation but also promoted the growth of cells in the overlying peripodial cell membrane (PM) [83, 85].

Cells use a variety of mechanisms to communicate with each other over short or long distances. In the developing *Drosophila* imaginal discs, a specific type of cell structure that mediates long-distance communication has been identified and characterized: Cells form specialized signalling filopodia called cytonemes to transfer morphogens from expressing to receiving cells [55, 260, 261]. This discovery challenged the classical view of morphogen concentration gradients formed by simple diffusion. Cytonemes are morphologically characterized as actin-based filopodia of ~200 nm width and up to ~700 μ m in length [55, 260]. They are distinguished from tunneling nanotubes

or intercellular bridges by their closed-ends and vesicular transport within and along their cytoplasmic extensions [54, 65, 72, 75, 262, 263]. Moreover, cytonemes forms contact points which are reminiscent of synaptic buttons [70, 264]. In *Drosophila* imaginal discs, both basally and apically projecting cytonemes were detected, transporting different components of the Hedgehog (Hh) or Decapentaplegic (Dpp) morphogen signaling respectively [71, 72, 265]. More recently, using a new fixation method, functional cytonemes were also characterized in cultured *Drosophila* S2 cells [68]. Despite the growing interest for the study of cytonemes in recent years, only a limited number of proteins required for their formation and function have been identified so far [65, 76, 260].

In this study, we hypothesized that Slik non-autonomous tissue growth signaling was mediated by cytonemes. To gain insight into Slik non-catalytic activity and interrogate its cytoneme-based function, we combined imaging studies in *Drosophila* S2 cells and in wing imaginal discs. Here, we report that endogenous Slik is located on cytonemes of cultured cells and imaginal discs. We also found that Slik overexpression increased cytoneme length in a kinase-independent way, which correlates with its tissue growth signaling function observed *in vivo*. In addition, we found that the C-terminal domain (CTD) of Slik, responsible for its cortical localization, is required and sufficient to induce cytoneme elongation. Then, we tested if dSTRIPAK controls Slik kinase-independent functions. We found that dSTRIPAK controls cytoneme biogenesis in part through the regulation of Slik. Indeed, we found that depletion of Strip or Cka, two major proteins of the phosphatase core dSTRIPAK complex, impaired cytoneme formation and occurrence. Moreover, their depletion antagonized Slik-induced cytoneme elongation in S2 cells, as well as Slik-induced tissue growth signaling *in vivo*. These results identify dSTRIPAK/Slik as a major regulator of cytoneme biogenesis and signaling function.

2.3 Results

2.3.1 Endogenous Slik is present on cytonemes in S2 cells

Using a modified electronic microscopy (MEM)-fixation method to preserve subcellular structures, S2 cells were recently shown to present Hh-transporting cytonemes, as epithelial cells do in wing discs [68]. These cells are thereby an efficient and functional system for characterizing cytonemes in cell culture. To verify the presence of cytonemes in cultured S2 cells, we stained actin filaments (F-actin) after MEM-fixation. As previously discovered, we observed thin and non-adherent F-actin rich filopodia reminiscent of cytonemes (Figure 3.1A). We then sought to observe these structures in live cells using two different plasma-membrane GFP markers (MyrPALM-GFP and CAAX-GFP; Figure 3.2A), and a F-actin cell-permeable fluorescent probe (SiR-actin; Figure 3.1B). All these markers decorated similar non-adherent filopodia that appeared very dynamic. We therefore decided to use these fluorescent markers to precisely monitor the behavior of these non-adherent filopodia.

Cytonemes are morphologically characterized as specialized filopodia which are actin-dependent but microtubule-independent structures, averaging 5 μm in length, and approximately 200 nm in thickness [67, 68]. To test whether the observed filopodia met these criteria, we first tested if their biogenesis could be modulated by affecting actin filaments or microtubules. Live S2 cells were treated with Latrunculin A to inhibit actin polymerization or Nocodazole to promote microtubule depolymerization, and visualized with MyrPALM-GFP or SiR-actin (Figure 3.2B). The morphology of the actin-based filopodia was altered in response to Latrunculin A treatment as evidenced by increased length and width, as previously reported [68, 81]. Nocodazole did not affect filopodia morphology (Figure 3.2B). Thus, the filopodia meet the criterion of actin-dependent cytonemes described in S2 cells [68].

We then determined if the observed actin-based protrusions were of appropriate length to be considered as cytonemes. We measured the maximal protrusion length per cell using the maximal intensity projection (MIP) of SiR-actin signal (Figure 3.2C). While we observed that the non-adherent filopodia could measure up to 12 μm we found that

the average maximal filopodial length across the quantified population was 4.5 μm (Figure 3.1C). Since length and width ($\sim 200\text{ nm}$) of the SiR-actin probed extensions were consistent with cytoneme morphology, we considered them as such. Finally, S2 cell cytonemes were described to be greater than 2 μm in length [68]. Taking this criterion in consideration, we found that $\sim 90\%$ of our S2 cell population presented cytonemes (Figure 3.1D).

Considering that Slik overexpression in *Drosophila* wing discs triggered cell proliferation at distance [83, 85], we hypothesized that Slik promoted cell growth through cytonemes. To first test this hypothesis, we determined whether Slik was present on S2 cell cytonemes. By immunofluorescence, we observed endogenous Slik localized at the cell cortex as previously reported (Chapitre 2). In addition we found that Slik was also specifically present along actin-based protrusions reminiscent of cytonemes in cultured S2 cells (Figure 3.1E-F and Figure 3.4A).

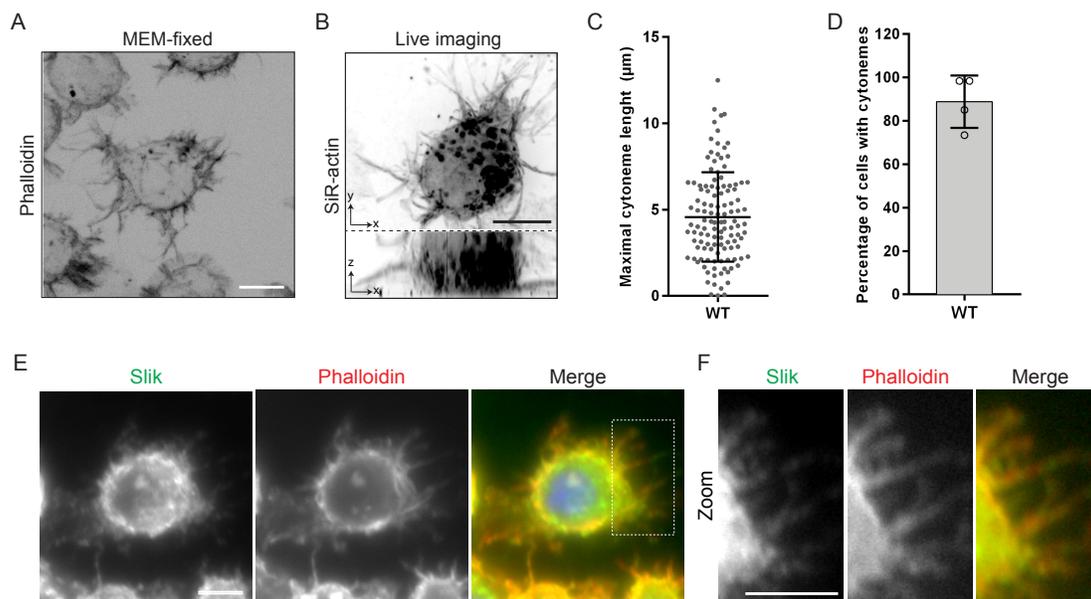


Figure 3.1 Endogenous Slik is present on cytonemes in S2 cells

(A) Maximal intensity projection of confocal sections of MEM-fixed S2 cells stained for F-Actin with Phalloidin. **(B)** Maximal intensity projection of confocal sections of live S2 cells probed for F-actin with SiR-actin. The ZX-projection shows that non-adherent actin-rich protrusions extend from the cell body. **(C)** The maximal cytoneme length per cell was quantified using SiR-actin signal (see Materials and Methods). Data are represented as means \pm SD of the pooled experiments (each dot represents the value for a single cell). **(D)** Percentage of cells presenting maximal protrusions length longer than 2 μm , were considered to have cytonemes. Data are represented as the mean values \pm SD of the pooled replicates (open circles). **(E)** Maximal intensity projection of confocal sections of PFA-fixed cells stained for Slik (green), F-Actin

(Phalloidin, red) and DNA (bleu). Slik is mainly localized at the cell cortex as well as on actin-rich protrusions. **(F)** Enlarged area (rectangle in E) of the cell protrusions is shown. Scale bars, 5 μm .

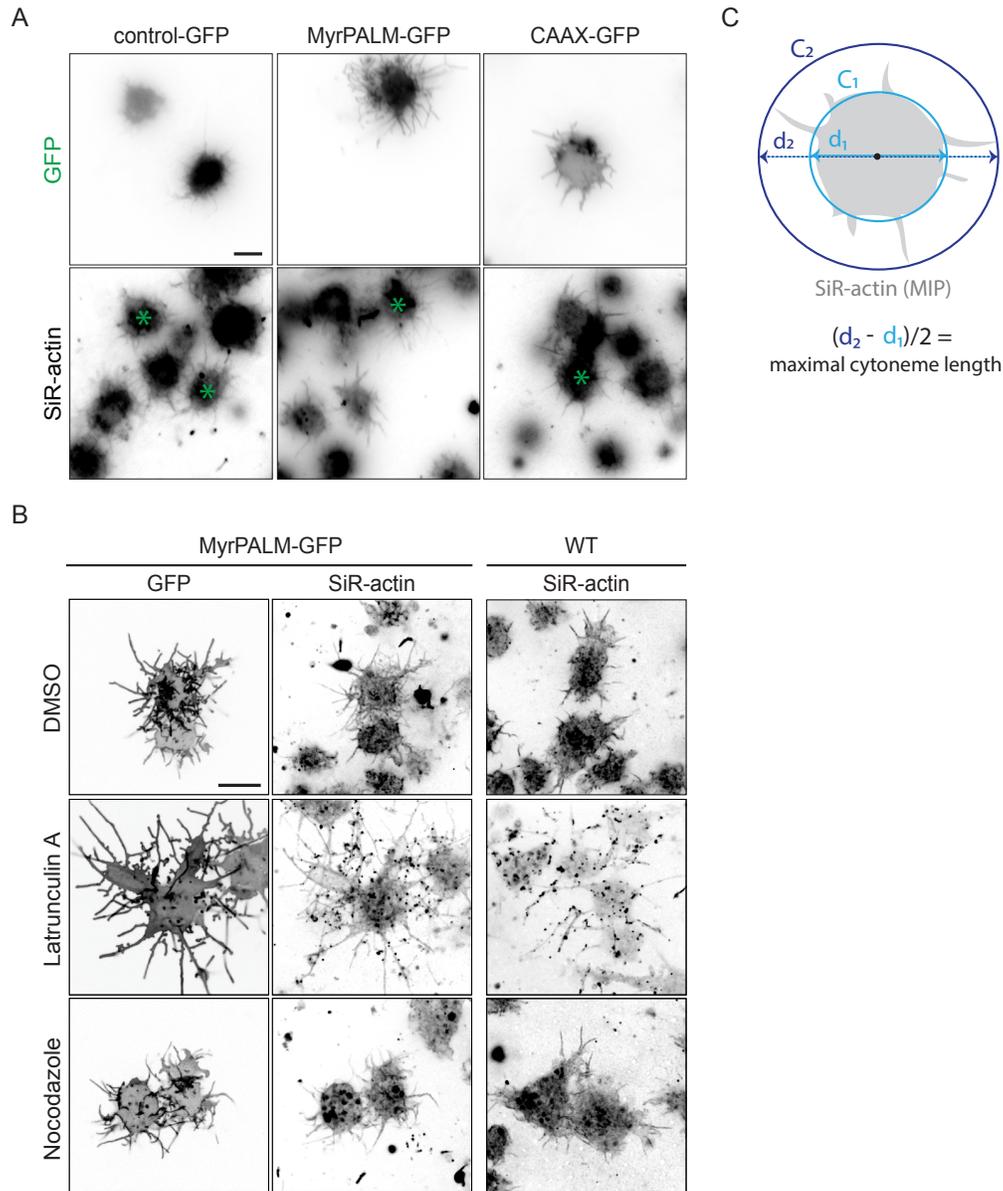


Figure 3.2 Actin-dependent cytonemes are visualized by plasma-membrane markers

(A) Confocal images at the adherence surface of live S2 cells transiently transfected with control-GFP or plasma-membrane GFP markers: MyrPALM-GFP and CAAX-GFP and probed with SiR-actin. Transfected cells are highlighted with a green asterisk. **(B)** Confocal images at the adherence surface of live S2 cells transiently transfected with MyrPALM-GFP or not transfected (WT), and probed with SiR-actin. Cells were treated with DMSO, Latrunculin A, or Nocodazole. **(C)** Schematic representation of cytoneme measurement: using the maximal intensity projection (MIP) of confocal images of live S2 probed with SiR-Actin (See Materials and Methods). Scale bars, 5 μm .

2.3.2 Slik overexpression induces cytoneme elongation in a kinase-independent manner, and through its CTD

Since Slik overexpression in wing disc triggers long-distance signaling in a kinase-independent manner [83, 85], we next assessed whether overexpressing Slik or its kinase-inactive version in S2 cells affected cytoneme morphology. Interestingly, overexpression of GFP-tagged forms of either wild-type Slik (Slik-GFP) or Slik mutated in its ATP-binding site (lysine-66 to arginine, Slik-KR-GFP) induced cytoneme elongation (Figure 3.3A-B). Indeed, measurements indicated that Slik- or Slik-KR-GFP almost doubled the size of cytonemes (with an average maximal cytoneme length of 8.1 μm and 9.2 μm respectively) compared to control cells expressing GFP alone (control-GFP, with an average maximal cytoneme length of 3.6 μm) (Figure 3.3C). The longest cytonemes measured up to 30 μm . Moreover, the percentage of Slik-positive cells with cytonemes longer than 2 μm reached 100% compared to ~90% in control cells (Figure 3.3D). Thus, Slik overexpression increases cytoneme biogenesis in a kinase-independent manner.

We previously discovered that Slik C-terminal domain (SlikCTD) was required for its apical localization and pro-proliferative effect in the wing discs [85]. We first tested if this domain was also required for Slik cortical and cytoneme localization in S2 cells. We found that full-length Slik-/Slik-KR-GFP localizes mainly at the cortex of the cell body and cytonemes (Figure 3.3B and Figure 3.4B). Interestingly, SlikCTD-GFP is restricted to the cell cortex and concentrated in dense extensions emanating from cytonemes (Figure 3.3A-B). On the other hand, Slik lacking its CTD (Slik Δ CTD-GFP) accumulated primarily in the nucleus of S2 cells (Figure 3.3A-B), as reported in epithelial disc cells [85]. Thus, SlikCTD is responsible for Slik kinase localization on cytonemes in *Drosophila*.

To determine whether this domain was also required for cytoneme biogenesis, we measured cytoneme length in cells expressing Slik Δ CTD-GFP. These cells presented shorter cytonemes with an average maximal length of 1.9 μm (Figure 3.3C). In addition, the occurrence of cytonemes on Slik Δ CTD-GFP cells was reduced (~49%) compared to control-GFP cells (Figure 3.3D). Consistently, Slik Δ CTD expression was not able to

induce the non-autonomous growth signaling [85]. We then tested if SlikCTD was sufficient to promote cytoneme elongation. Cells expressing SlikCTD-GFP presented longer cytonemes with an average maximal length of ~8.7 μm and an occurrence up to ~96%, similar to cells expressing full-length Slik (Figure 3.3C-D). However, we previously reported that SlikCTD alone was not sufficient to trigger proliferation in PM cells [85]. Interestingly, we now discovered that SlikCTD expression level is important, since strong overexpression of SlikCTD induced growth signaling (Figure 3.4C, yellow arrows). Thus, SlikCTD is sufficient and required to promote cytoneme formation in S2 cells, and to induce signaling response *in vivo*.

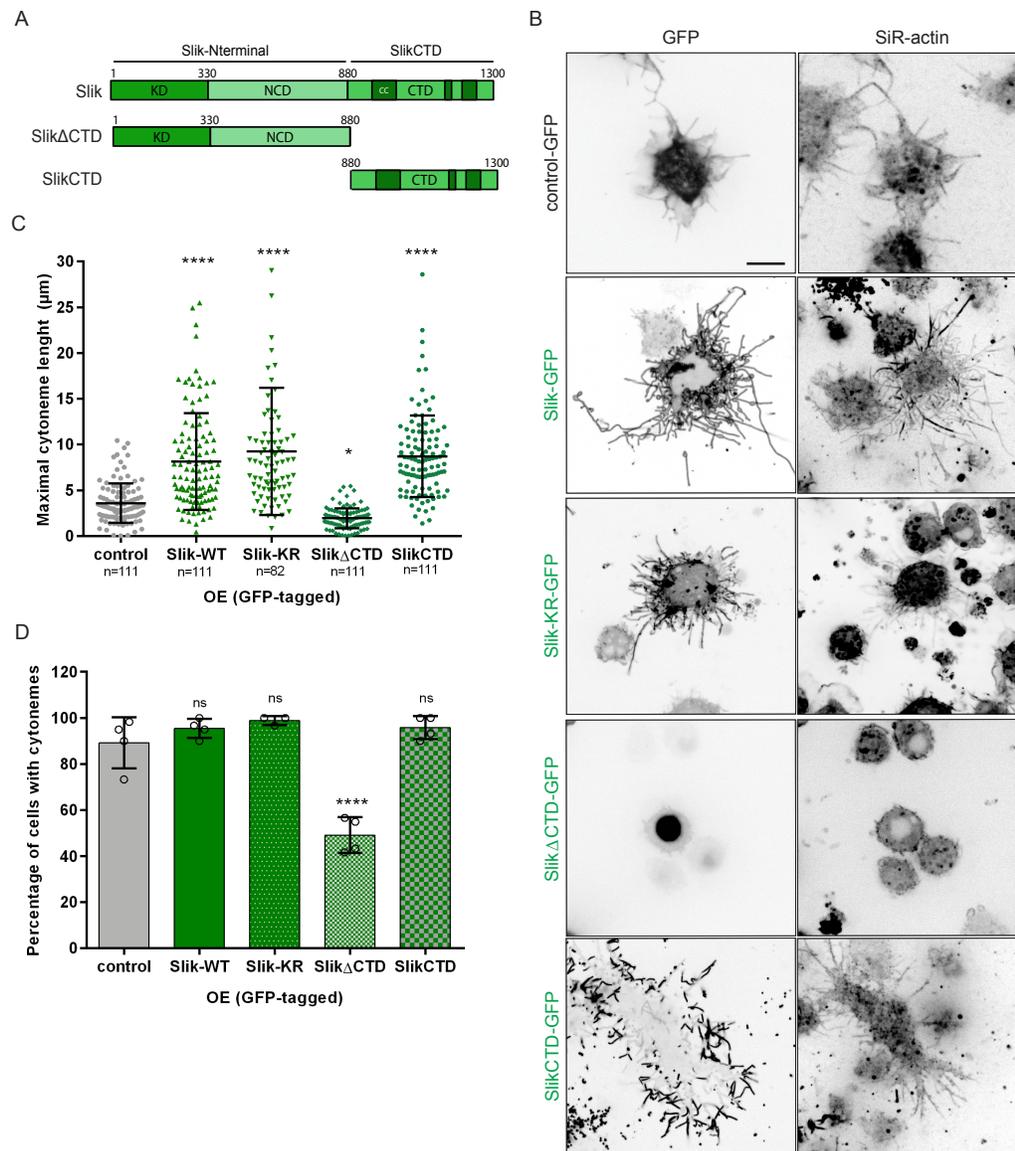


Figure 3.3 Slik overexpression induces cytoneme elongation in a kinase-independent manner and through its CTD

(A) Schematic diagrams of Slik full-length structure and truncated variants. In green, N-terminal kinase domain (KD); light green, non-conserved domain; in dark green, C-terminal domain with predicted coiled-coil regions. **(B)** Confocal images at the adherence surface of live S2 cells transiently transfected with annotated cDNA constructs (left row) and probed with SiR-actin (right row). **(C)** Quantification of maximal cytoneme length measured on SiR-actin signal in the transfected cells. Data are represented as means \pm SD of the pooled experiments (each dot represents the value for a single cell), one-way ANOVA with p-values: * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. **(D)** The percentage of cells with cytonemes longer than 2 μ m was calculated. Data are represented as the mean values \pm SD of the pooled replicates (open circles), one-way ANOVA with p-values: ns $p > 0.05$, **** $p < 0.0001$. Scale bar, 5 μ m.

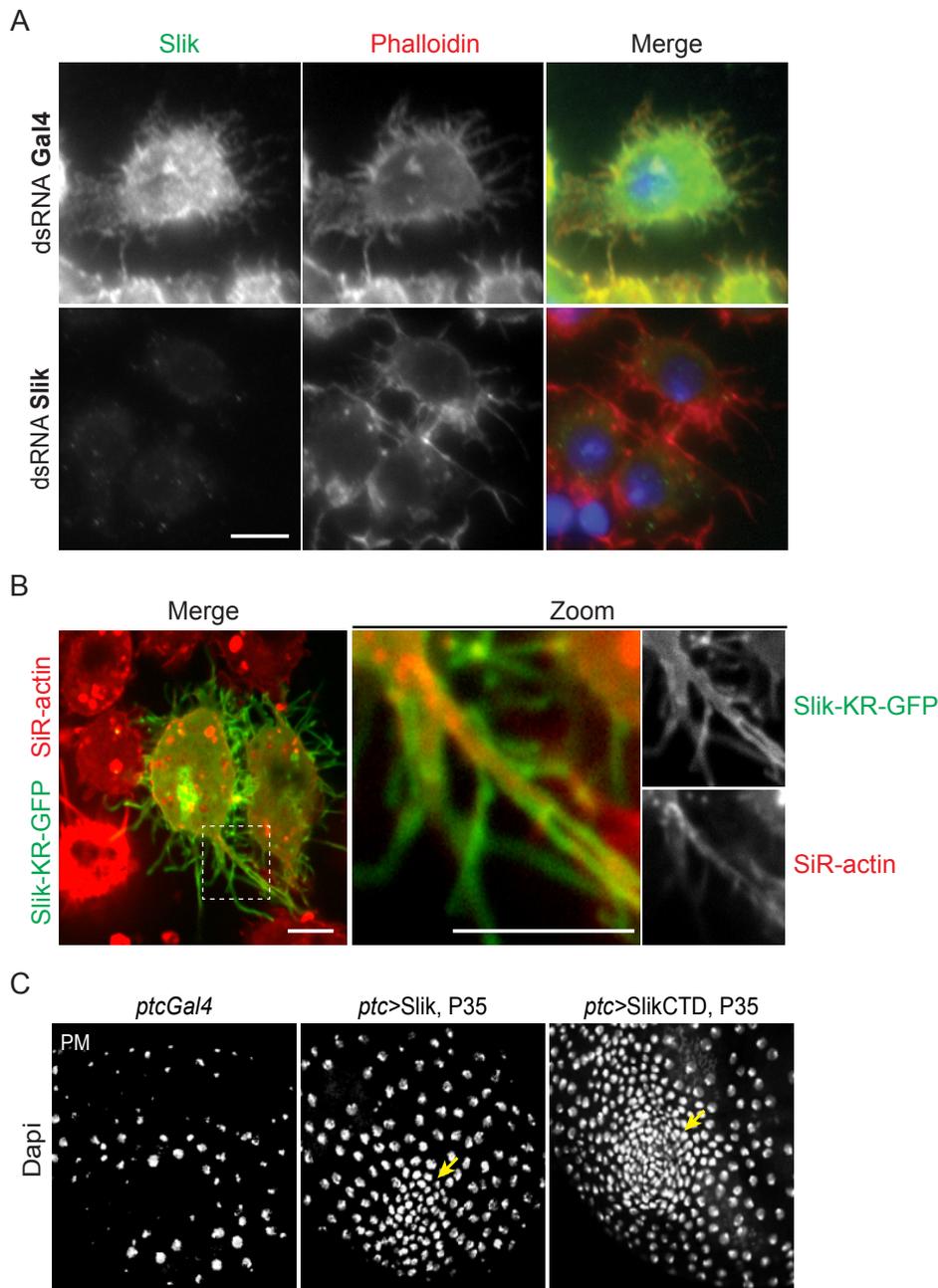


Figure 3.4 Slik localizes at S2 cell cortex and cytonemes, and SlikCTD is sufficient to induce signaling response *in vivo*

(A) Confocal images at the adherence surface of PFA-fixed cells stained for endogenous Slik (green), F-Actin (Phalloidin, red) and DNA (bleu). Slik staining was verified in cells treated with dsRNA targeting Slik. **(B)** Confocal images at the adherence surface of live S2 cells transiently transfected with Slik-GFP (green) and probed with SiR-actin (red). Enlarged magnifications of the dotted scare are shown (middle and right panels). **(C)** Confocal images of DP cells from control wing disc (left panel), expressing Slik and P35 (middle panel), or expressing SlikCTD and P35 (right panel) in a central stripe (through *Ptc*-Gal4 driver). Slik and SlikCTD expression promotes non-autonomous proliferation as visualized by condensed nuclei marked by Dapi. Scale bars, 5 μ m.

2.3.3 Strip and Cka are required for the formation of cytonemes and Slik-induced cytoneme elongation

We recently uncovered that Slik is a kinase associated with dSTRIPAK (Chapitre 2). At the core of the complex, the Striatin orthologue Cka, is the regulatory B^{'''} subunit which scaffolds PP2A catalytic and structural subunits. Cka also tightly interacts with Striatin-interacting protein (Strip), which helps to recruit kinases in the complex [195, 201, 209, 212, 217]. Through its association with various kinases, STRIPAK is involved in a variety of cellular processes (vesicular trafficking, Golgi assembly, cell polarity, cell migration, neural and vascular development) and human pathologies [197, 236, 237]. We recently discovered that dSTRIPAK phosphatase function promotes Slik localization at the cell cortex by inducing its dephosphorylation (Chapitre 2). Thereby, Strip and Cka control Slik kinase-dependent phosphorylation of Moesin.

In order to test whether Strip and Cka also regulate Slik non-catalytic functions, we first examined if they were required for cytoneme formation. We observed that Strip and Cka are necessary for cytoneme biogenesis. Strip and Cka depletion decreased cytoneme maximal length as well as their occurrence by half (2 μm and 1.5 μm respectively) when compared to control cells (5.2 μm) (Figure 3.5A-C and Figure 3.6A-C). We also assessed if Slik or Moesin were required for cytoneme formation. S2 cells depleted for Slik or Moesin always presented cytonemes with a slight increased length (7 μm), compared to control cells (dsRNA Gal4, 5.7 μm) (Figure 3.6A-C). These results indicate that unlike Strip and Cka, Slik and Moesin are not required for cytoneme formation.

We next tested whether dSTRIPAK is necessary for Slik to promote elongation of cytonemes. We discovered that Strip or Cka depletion totally abrogated the increase of cytoneme length promoted by Slik-GFP overexpression (Figure 3.5A-B). Moreover, Strip or Cka depletion decreased by nearly half the percentage of cells presenting cytonemes (Figure 3.5C). In marked contrast, Strip or Cka depletion only slightly affected the cytoneme elongation and did not reduce the occurrence of cytonemes promoted by SlikCTD overexpression (Figure 3.5A-C). Thus, when cytoneme biogenesis is inhibited through Strip or Cka depletion, SlikCTD is sufficient to promote formation of cytonemes.

Interestingly, we previously found that full-length Slik is delocalized from the cell cortex upon inhibition of the PP2A phosphatase activity of STRIPAK (Chapitre 2). However and also consistent with the fact that SlikCTD acts independently of dSTRIPAK, SlikCTD-GFP association with the cortex is unaffected by PP2A inhibition using Okadaic Acid treatment (Figure 3.7A-B). These results indicate that dSTRIPAK is required for Slik full-length localization and function, but not for SlikCTD alone.

Finally, we verified if dSTRIPAK is also required for cytoneme formation *in vivo*. Using GFP-tagged Moesin actin binding domain (GMA-GFP) to mark F-actin, we visualized basal cytonemes in DP cells (under the control of *Ptc*-Gal4 driver) (Figure 3.5D). In wing disc co-expressing dsRNA targeting Cka, we observed that the formation of basal cytonemes is strongly disrupted. Thus, our data confirms that cytoneme biogenesis requires dSTRIPAK. In addition, we validated that S2 cell cytonemes are indeed representative of wing disc cytonemes.

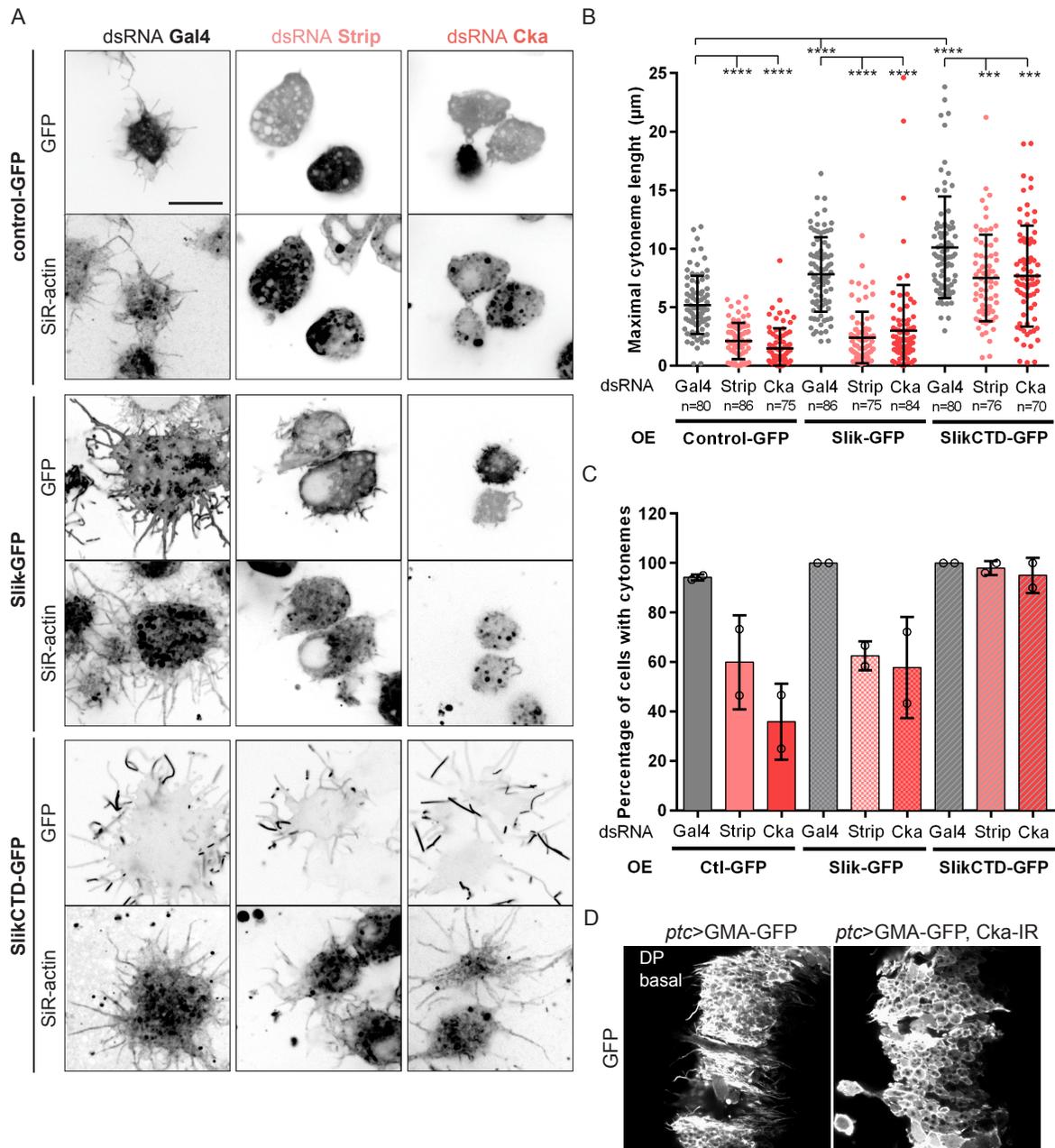


Figure 3.5 Strip and Cka are required for cytoneme biogenesis and Slik-induced cytoneme elongation

(A) Confocal images at the adherence surface of live S2 cells treated with indicated dsRNA and transiently transfected with annotated cDNA constructs (upper row) and probed with SiR-actin (bottom row). **(B)** Quantification of maximal cytoneme length measured on SiR-actin signal in the transfected cells. Data are represented as means \pm SD of the pooled experiments (each dot represents the value for a single cell), one-way ANOVA with p-values: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. **(C)** The percentage of cells with cytonemes longer than 2 μm was calculated. Data are represented as the mean values \pm SD of two pooled replicates (open circles). **(D)** Confocal images of cytonemes emanating from the basal side of disc proper (DP) epithelium and marked by GMA-GFP (Moesin actin binding domain) either alone (left panel) or with dsRNA against Cka (right panel). Scale bar, 5 μm .

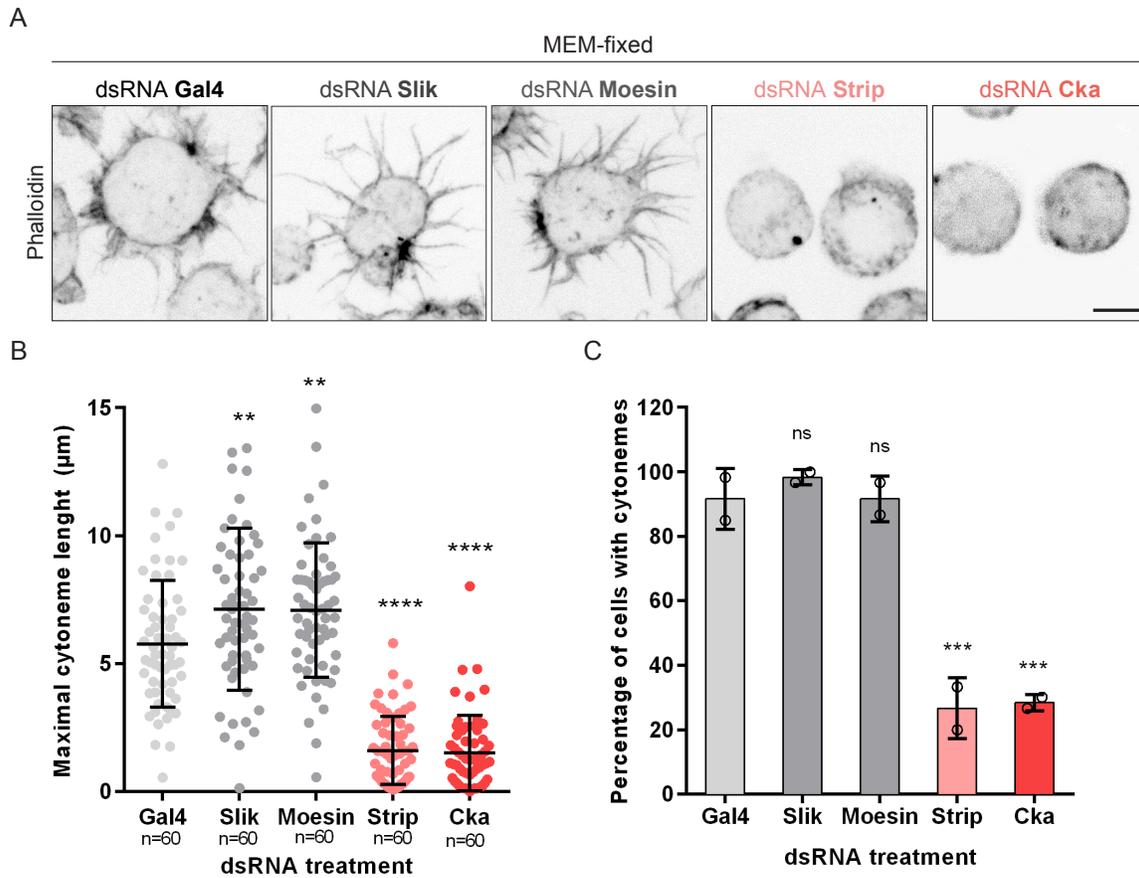


Figure 3.6 Unlike Strip and Cka, Slik and Moesin are not required for cytoneme formation

(A) Confocal images of MEM-fixed S2 cells treated as indicated and stained for F-Actin (Phalloidin). **(B)** Quantification of maximal cytoneme length measured on SiR-actin signal in the dsRNA treated cells. Data are represented as means \pm SD of the pooled experiments (each dot represents the value for a single cell), one-way ANOVA with p-values: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. **(C)** The percentage of cells with cytonemes longer than 2 μm was calculated. Data are represented as the mean values \pm SD of two pooled replicates (open circles), one-way ANOVA with p-values: ns $p > 0.05$, *** $p > 0.001$.

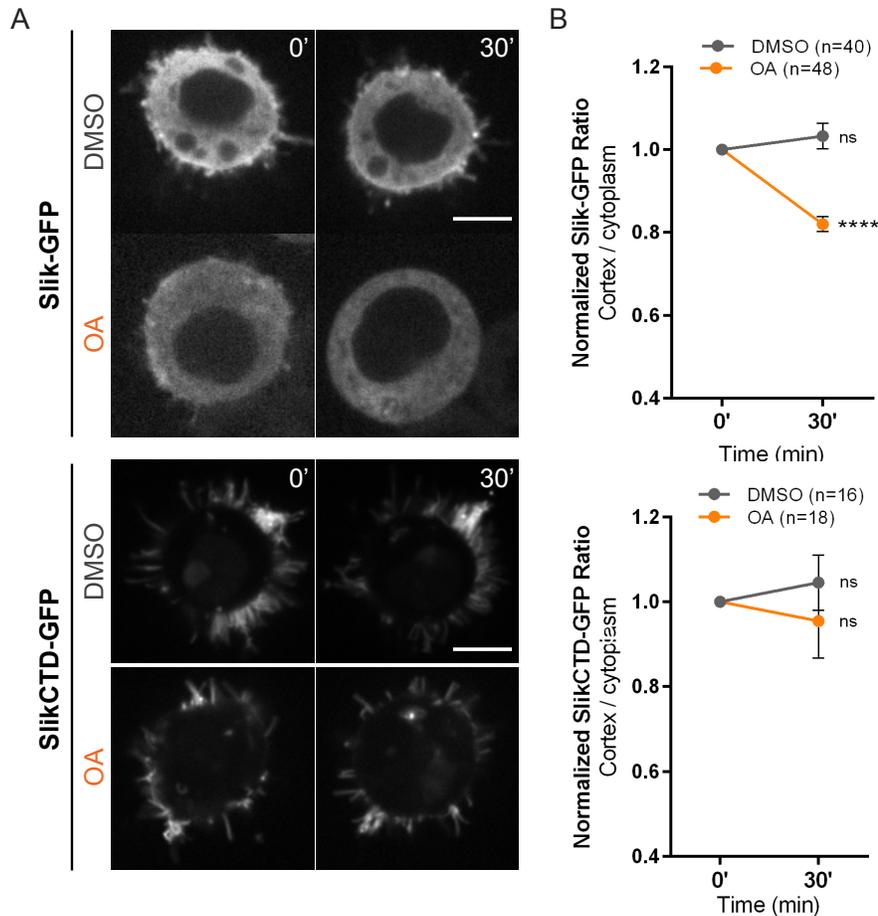


Figure 3.7 SlikCTD cortical localization is not regulated by PP2A

(A) Time lapse of Slik distribution in living S2 cell transiently expressing Slik-GFP or SlikCTD-GFP, and treated with DMSO or 50nM OA during 30 min. **(B)** The ratios of GFP signals (cortex/cytoplasm) were quantified and normalized to the first time frame in a minimum of 8 cells/experiment, in two or three independent experiments. Data are represented as normalized means \pm SEM of the pooled experiments, Mann-Whitney test with p-values: ns $p > 0.05$, **** $p < 0.0001$. Scale bars, 5 μ m.

2.3.4 Strip and Cka are required for Slik-induced signaling response in wing discs

Then, we asked whether Strip and Cka also regulate Slik non-autonomous signaling function *in vivo*. As previously established, we used the *Ptc*-Gal4 driver to express a Slik transgene in a central stripe of cells in the DP layer (Figure 3.8A). In addition, we co-expressed the baculoviral P35 protein to prevent apoptosis induced by Slik overexpression [83] or Strip and Cka knockdown (Chapitre 2). Wing discs overexpressing Slik kinase only in the DP layer under *ptc*-Gal4 control induces

increased proliferation of these cells as well as in the overlying PM cells [83, 85], as reflected by increased nuclear density and Ethynyl-deoxyuridine (EdU) incorporation (Figure 3.8B). Strikingly, when co-expressed with dsRNAs targeting Strip or Cka, the Slik non-autonomous pro-proliferative effect was strongly abrogated (Figure 3.8B). Taken together, our results reveal that overexpressing Slik in the wing disc induces long-range growth signaling in a dSTRIPAK-dependent manner.

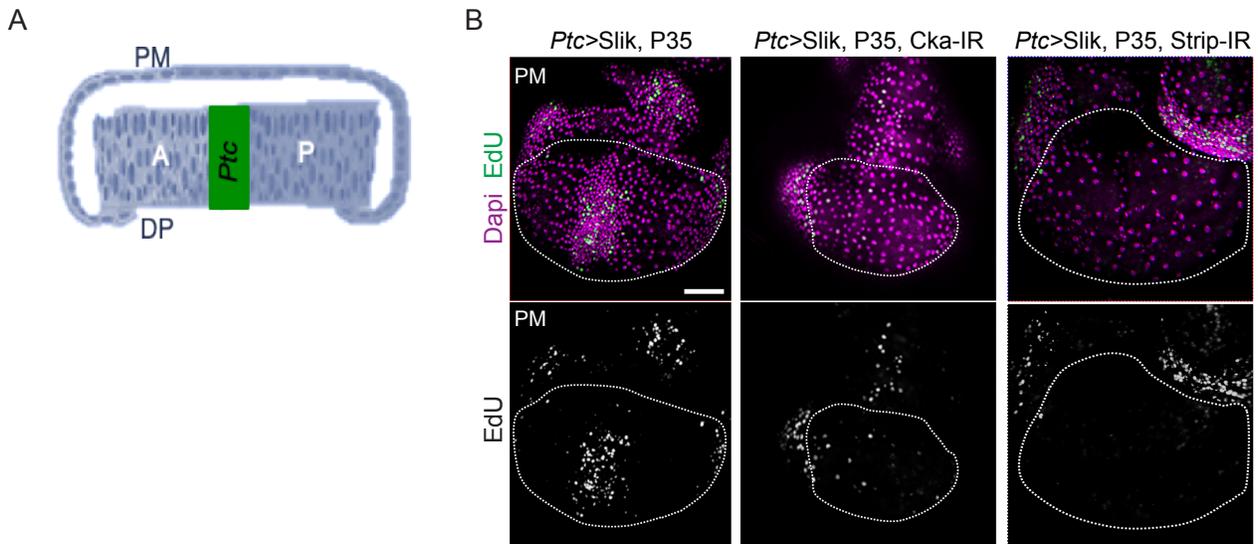


Figure 3.8 Strip and Cka are required for Slik-induced signaling response

(A) Schematic representation of a cross-section of the wing disc showing disc proper (DP) epithelium and the peripodial membrane (PM) separated by a lumen. Adapted from [72]. **(B)** Confocal images of PM cells overlying the DP cells expressing Slik and P35 in a central stripe (through *Ptc*-Gal4 driver, marked with dotted lines), either alone (left row) or with dsRNA against *Cka* (middle row) or *Strip* (right row). Slik expression alone promotes non-autonomous proliferation as visualized by Dapi staining (upper row) and EdU labeling (bottom row). This is blocked by depletion of dSTRIPAK components. Scale bar, 50 μ m.

2.3.5 Slik-positive cytonemes present dynamic vesicular trafficking events and participate to intercellular communication

We finally tested whether Slik localizes on cytonemes in the wing discs. Fixed wing discs showing basal cytonemes marked by LifeAct-Ruby were positive for Slik kinase-dead mutant (Slik-KD-GFP), as well as its CTD alone (SlikCTD-GFP) (Figure 3.9A). Moreover, we also visualized SlikCTD-GFP emanating from apical cytonemes marked with LifeAct-Ruby (Figure 3.9B). Such apical cytonemes of the PM were never reported [71].

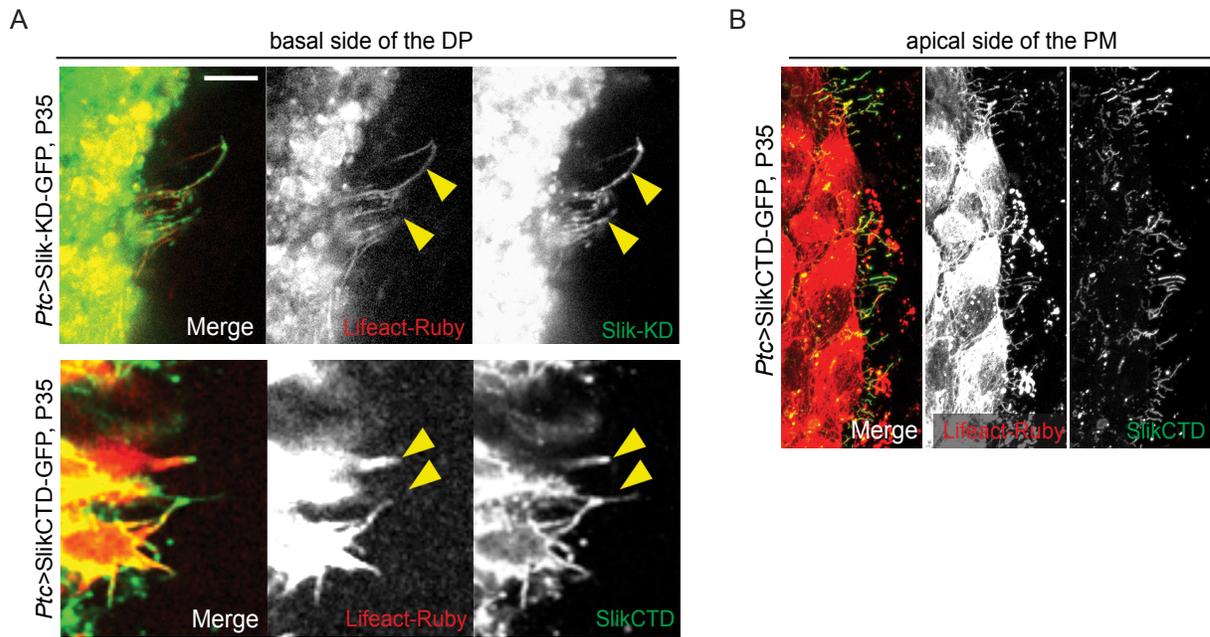


Figure 3.9 Slik or SlikCTD is present on basal and apical cytonemes *in vivo*

(A) Confocal images of basal cytonemes of DP cells in wing discs expressing Lifeact-Ruby (red) and Slik kinase-dead mutant Slik-KD-GFP (upper row) or SlikCTD-GFP (bottom row) (green). Yellow arrows point out Slik localizing on actin-rich cytonemes. **(B)** Confocal images of apical cytonemes of PM cells in wing discs expressing Lifeact-Ruby (red) and SlikCTD-GFP (bottom row) (green). SlikCTD is restricted to apical cytonemes. Scale bar, 4 μm .

Moreover, we observed that wing disc cytonemes presented dense Slik-positive punctua reminiscent of vesicular transport. To further characterize the potential transport along Slik-positive cytonemes, we performed videomicroscopy on S2 cells overexpressing Slik-GFP. We observed highly dynamic trafficking events along Slik-GFP-positive cytonemes in S2 cells (Figure 3.10A). Either the mobile structure was larger than the cytonemes and caused membrane swelling (Movie 2 and blue arrows in Figure 3.10A-B), or smaller Slik-GFP punctua were moving inside the cytonemes (orange arrows in Figure 3.10A and C). Importantly, we also observed that Slik-positive vesicles were sometimes released at the end of the cytonemes (Figure 3.10D). In addition, S2 cells adjacent to Slik-GFP transfected cells often presented cytoplasmic Slik-GFP dots (Figure 3.11A). Interestingly, exovesicles trafficking along cytonemes have recently been reported [72]. As described throughout, this vesicular transport forms membrane swellings along and at the end of the cytonemes [55, 70, 71].

In order to test if Slik-GFP exchanges intercellular material through cytonemes, we co-cultured cells overexpressing Slik-GFP and untransfected cells marked by CellTraceRed. We observed live Slik-positives vesicles traffic along cytonemes emanating from Slik-GFP cells and oriented toward neighboring colored cells (Figure 3.10E). Distinct Slik-positive dots were detected in the cytoplasm of the receiving contacted cell. We next wondered if Slik-GFP promotes this intercellular communication compared to control cells. To test this, we co-cultured cells overexpressing either control-GFP, Slik-GFP or SlikCTD-GFP and untransfected cells marked by CellTraceViolet (Figure 3.11B). We then quantified the number of colored cells having one or more internalized GFP-dots (Figure 3.10F). We found that Slik-GFP and SlikCTD-GFP promote exchange of intercellular material since more GFP-dots are present in the receiving cells (41% and 50% respectively), compared to control GFP emitting cells (2,5%). Because S2 cells are derived from a macrophage-like cell line [38] we can not exclude that this exchange of material results from phagocytosis. However, our data still indicate that Slik-GFP and SlikCTD-GFP expressing cells release much more GFP-positive vesicles than control GFP expressing cells. Taken together, our results highlight functional Slik-positive cytonemes inducing intercellular communication by transporting and releasing extracellular vesicles.

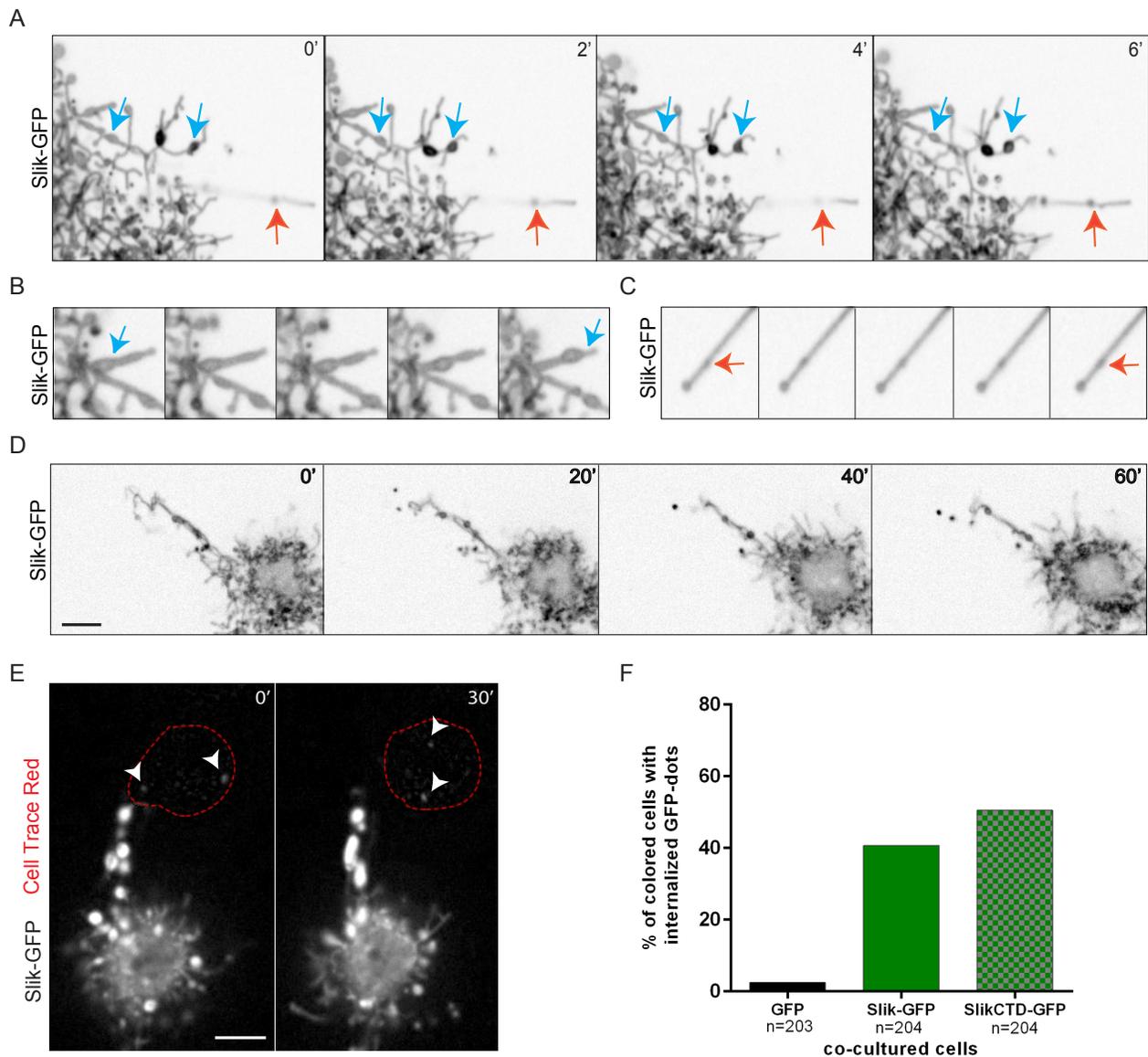


Figure 3.10 Slik-positive cytonemes present vesicular trafficking events implicated in intercellular communication

(A-C) Time lapse of Slik-positive cytonemes in living S2 cell expressing Slik-GFP. **(A, B)** Blue arrows point out Slik-positive trafficking events causing membrane swelling. **(A, C)** Orange arrows point out Slik-positive dense dots trafficking inside the cytonemes. **(D)** Longer time lapse of living S2 cell expressing Slik-GFP and releasing Slik-positive vesicles at the end of cytonemes. **(E)** Time lapse of transiently transfected Slik-GFP S2 cells (green cells) co-cultured with CellTraceRed colored cells (delimited by red dotted lines). White arrows shows cytoplasmic GFP-dots in a colored cell contacted by a Slik-positive cytoneme. **(F)** Cells were transiently transfected with annotated cDNA constructs for 48 hours and then co-cultured (ratio 1/1) during 48h with CellTraceViolet colored cells. Quantification of the percentage of CellTraceViolet colored cells that internalized GFP-dots relative to the total number *n* of counted colored cells in a single experiment. Scale bars, 10 μ m.

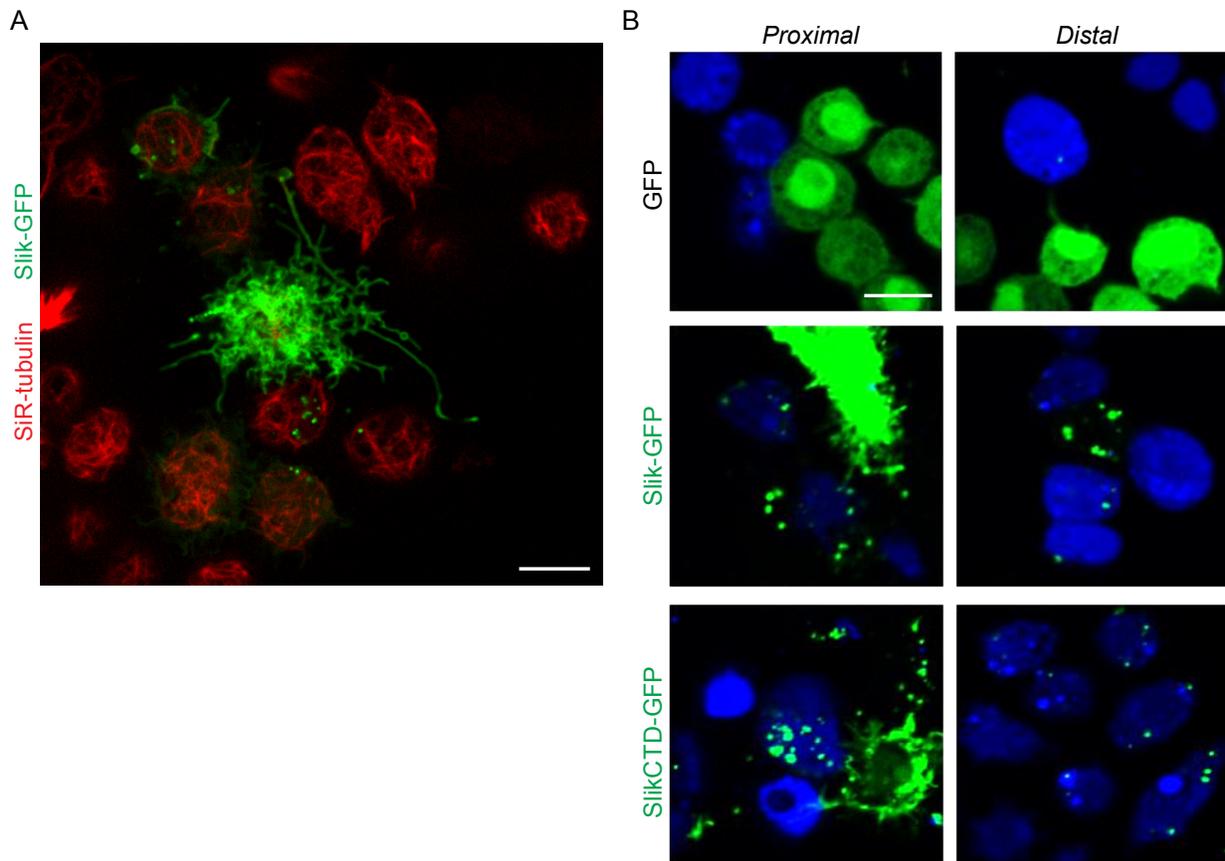


Figure 3.11 Slik promotes intercellular exchange of material with neighboring cells
(A) Maximal intensity projection of confocal sections of live S2 cells transiently transfected with Slik-GFP and probed with SiR-tubulin. Cytoplasmic GFP-dots are visible in neighboring cells contacted by Slik-positive cytonemes. **(B)** Cells were transiently transfected with annotated cDNA constructs (green cells) for 48 hours and then co-cultured (ratio 1/1) during 48h with CellTraceViolet colored cells (blue cells). GFP-dots in non-transfected blue cells were observed at proximity (left row) or distant from transfected cells (right row). Scale bars, 10 μ m.

2.4 Discussion

We recently found that dSTRIPAK/Slik complex regulates Slik kinase localization promoting its kinase-dependent phosphorylation of Moesin (Chapitre 2). Here, we provide evidences that dSTRIPAK/Slik regulates cytoneme biogenesis and long-range signaling. We took advantage of the functional cytonemes characterized in cultured *Drosophila* S2 cells [68] to elucidate Slik and dSTRIPAK function on cytoneme morphogenesis. Furthermore, we used Slik non-autonomous growth-promoting effect in wing discs [83] to test cytoneme signaling function.

2.4.1 Slik cortical localization correlates with cytoneme formation

We first discovered that Slik is present on cytonemes. Indeed, we found that endogenous Slik localizes on actin-based protrusions emanating from most *Drosophila* S2 cells, which share morphological criteria of previously characterized cytonemes [68]. We also found that a GFP tagged form of Slik was localized along cytonemes (either at the plasma membrane, or in vesicles) detected both in S2 cells and in wing discs. Moreover and correlating with Slik *in vivo* growth signaling function, we discovered that overexpressing Slik doubles cytoneme length in a kinase-independent manner.

While testing the implication of its regulatory CTD region, we found that SlikCTD-GFP is restricted to the cell cortex of S2 cells. Consistently, SlikCTD or the comparable domain of mammalian ortologues, Lok and Slk, were shown to specifically localize to the apical membrane of epithelial cells [47, 85]. In addition, we noticed that SlikCTD is expressed in dense extensions emanating from S2 cell cytonemes *in vitro* and apical cytonemes *in vivo*. Moreover, SlikCTD is sufficient to induce cytoneme elongation. Consistently, we show here that higher expression levels of SlikCTD induced growth of the peripodial membrane, while its low-level expression did not display pro-proliferative effects *in vivo* [85]. Interestingly, it was previously shown that low-level expression of LokCTD is typically concentrated on the tip of apical microvilli, whereas high-level induces the formation of long protrusive F-actin containing structures emanating from the cell membranes [47]. Thus, despite CTD expression level displays different effects, this well-conserved localization domain is responsible for non-catalytic functions of its kinase. As previously shown *in vivo* [85], Slik lacking CTD localizes mostly to the

nucleus of S2 cells. Interestingly, Slik kinase domain (KD) and its intermediary non-conserved domain (NCD) contain each a predicted nuclear localization sequence (NLS), which could be responsible for this location. Taken that CTD has been shown to interact with the kinase domain of Slik [105], we speculate that SlikCTD may mask the predicted NLS on Slik-Nterminal region. More importantly, we found that SlikCTD is required for cytoneme formation in S2 cells, consistent with its necessity for Slik proliferative effects in the wing disc cells [85]. Overall, targeting Slik kinase to the cortex correlates with cytoneme formation and signaling function.

2.4.2 dSTRIPAK regulates both Slik catalytic and non-catalytic functions

We previously discovered that Slik cortical localization in S2 cells and in wing discs is regulated by dSTRIPAK phosphatase activity (Chapitre 2). Thereby, the main scaffolding components Strip and Cka, both interacting with Slik, promote its kinase-dependent Moesin activation. Here, we found that the same dSTRIPAK components are necessary for Slik kinase-independent induction of cytoneme elongation and proliferative signaling. Thus dSTRIPAK regulates both Slik catalytic and non-catalytic functions. However, for now, we do not know if dSTRIPAK regulates both functions in a similar molecular way. In our previous study, we found that dSTRIPAK regulates Slik cortical localization through phosphosites located both on its NCD and CTD. This way, full-length Slik mutated either on its identified NCD-phosphosites, or on its CTD-phosphosites restored Moesin phosphorylation upon Strip or Cka knockdown (Chapitre 2). These Slik phospho-deficient mutants will be used to further assess if the same dSTRIPAK-dependent molecular mechanism regulates Slik non-catalytic functions. Unexpectedly, we show here that in contrary to Slik full length, SlikCTD acts independently of dSTRIPAK. These results indicate that Slik-Nterminal region is required for its regulation by the phosphatase complex. We propose that dSTRIPAK regulates phosphosites which are important for Slik conformation. Slik may exhibit upon dSTRIPAK dephosphorylation its CTD to induce non-catalytic functions. In contrast, SlikCTD alone bypasses the need of dSTRIPAK regulation.

2.4.3 dSTRIPAK but not Slik is required for cytoneme biogenesis

How cytoneme biogenesis takes place is still unclear. It was previously proposed that cytonemes consist of membrane tubules and vesicles aligned in a row [81]. Inhibition of the GTPase dynamin or actin depolymerisation abrogate vesicles scission from the plasma membrane. As results, the secretory process extends from the cells as cytonemes [81]. Consistently, we and others [68] found that F-actin disrupting agents as Latrunculin A increase cytoneme length and width in S2 cells. We also found that Slik and Moesin are not required for cytoneme formation. We speculate that Slik and Moesin depletion increased slightly cytoneme length, due to loss of Moesin activity as an F-actin cross-linker at the plasma membrane [29, 31]. In addition, we found that Strip and Cka are required for cytoneme biogenesis *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, Strip and Cka have been associated with early endosomal organization and vesicle transport, both important for neuronal morphogenesis in *Drosophila* [223, 225]. In addition, STRIPAK has been found to promote tube extension through vesicle dynamics in *C. Elegans* [266]. Those data support the idea that dSTRIPAK affects cytoneme biogenesis by impairing membrane flow through vesicles fusion/fission events at the plasma membrane. Finally, we observed dynamic trafficking events reminiscent of vesicular transport along Slik-positive cytonemes [55, 68, 70-72]. Moreover, we observed that Slik participates in intercellular exchange of Slik-positive vesicles through cytonemes. Interestingly, cytonemes most likely signal with target cells by release of ligand-bearing extracellular vesicles (EVs) such as exosomes, rather than direct secretion of ligands [67].

In conclusion, our work provide evidences that dSTRIPAK/Slik promotes cytoneme elongation to transport a proliferative signal contained in vesicles and released to distant cells. Elucidation of the precise molecular mechanism by which Slik and dSTRIPAK alter cytoneme morphogenesis requires further study.

2.5 Materials and Methods

2.5.1 cDNA constructs

pAc-Moesin-GFP and pMet-Slik-GFP were previously described in [86]. pMet-Slik^{K66R}-GFP, pMet-Slik Δ CTD-GFP and pMet-SlikCTD-GFP plasmids were obtained using cDNA kindly provided by D.Hipfner [85] and sub-cloned in pMet-GFP backbone. pAc-MyrPALM-GFP and pAc-CAAX-GFP were kindly provided by M.Therrien (IRIC).

2.5.2 S2 cell culture, transfections and drug treatments

Drosophila S2 cells were grown at 27°C in Schneider's Drosophila medium (21720001; GIBCO) complemented with 10% FBS (12483020; Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (15070063; GIBCO). All plasmid cDNA transfections were performed using the FuGENE Transfection Reagents (Promega) in Opti-MEM (Invitrogen) media and 1 μ g cDNA was used for each 10⁶ cells transfection. Cells were incubated 24 hours for pAc-MyrPALM-GFP or pAc-CAAX-GFP transfection and 36 hours for Slik constructs transfection. The expression of constructs with pMet promoter was induced 24 hours before the experiments with 0.7M CuSO₄. If needed, SiR-actin (1 μ M) or SiR-tubulin (0.25 μ M) were added 1 hour before the experiment to visualize actin cytoskeleton and microtubules, respectively.

For knockdown experiments, all dsRNA were transfected at 15 μ g / 10⁶ of S2 cells by adding the dsRNA directly into the media. dsRNA primers, production and validation by western blotting were previously reported (Chapitre 2). For live imaging, cells were incubated in 6-wells plate in 3 mL of medium with dsRNA for three days. At day three, cells were resuspended and counted to plate 5 x10⁴ cells in 200 μ L of medium in 96-wells glass-bottom plates. Cells were treated again with 2 μ g of dsRNA and transfected with the appropriate constructs. At day 5, just before the experiment, SiR-actin was added at 1 μ M.

Drug treatment was as follows. For actin depolymerisation Latrunculin A was used at 1 μ g/ml for 2 hours; for microtubule depolymerisation nocodazole was used at 10 μ M for 2.5 hours; for PP2A inhibition, Okadaic Acid (OA; OKA004; BioShop) was used at

50nM for 30 min; for kinase inhibition, Staurosporine (Stau; A8192; APExBIO) was used at 50nM for 60 min.

2.5.3 Immunofluorescence: PFA- and MEM-fixations

5×10^5 cells were seeded on glass coverslips in 300 μ l of medium. They were then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Alfa Aesar) diluted in PBS at room temperature for 15 minutes or with MEM-fixation (4% PFA, 0.5% glutaraldehyde, 0.1M Sorenson's phosphate buffer, pH 7.4, [68]) on ice for 7 minutes. Cells were then washed with TBS-Triton 0.1% during 3×10 minutes at RT, permeabilized and blocked with TBS-Triton 0.1% - BSA 1% for 1 hour at RT. Primary and secondary antibodies (Texas Red - 1/100) were applied in fresh blocking solution. Guinea pig anti-Slik [85] is used at 1/2000 and incubated overnight. Cells were washed thrice with blocking solution between primary and secondary antibody, goat Alexa Fluor 488-conjugated secondary anti-guinea pig antibody (Invitrogen A11073 - 1/100). We used Texas Red-X Phalloidin (Invitrogen T7471 - 1/100) to stain F-actin. Stained cells were washed once in blocking solution and once with TBS-IF, and coverslips were dried then mounted in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories).

2.5.4 Image acquisition and data treatment in S2 cells

Images were acquired using a confocal Spinning Disk Carl Zeiss microscope with a Plan Apochromat 63x/1.4 oil DIC lens (equipped with Zeiss AxioCam 506 mono camera) and controlled by ZEN 2 blue software (Carl Zeiss). Time-lapse microscopy and live cell imaging was performed with the same microscope in an incubator to maintain 27°C and controlled humidity. Images were analyzed and quantified with Zen. Representative images were prepared for publication using ImageJ software (NIH) and Photoshop (Adobe).

Maximal protrusion length was measured upon maximal intensity projection of 51 z-stack of 200 nm (10 μ m total), of live cell probed with SiR-actin. A first circle (C1) was drawn around the cell body. A second circle (C2) was drawn to include all protrusions, even the longest ones. Both circles are centered on the middle of the cell body, and the diameters of those circles (d1 and d2) were measured. Maximal cytoneme length was

obtained by the following calculation: $(d_2 - d_1)/2$. Cells with protrusions shorter than 2 μm are considered without protrusions. Measurements were collected using Microsoft Excel. Graphs and statistics were established using GraphPad Prism (Prism Software).

2.5.5 *Drosophila* stocks and culture

ptc-GAL4 (*ptc*^{559.1}), *UAS-GFP*, and *UAS-P35* strains were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Centre. Transgenic dsRNA strains targeting Cka (ID #106971) and Strip (ID #106184) were obtained from the Vienna *Drosophila* Resource Centre (VDRC). Crosses were carried out at 18°C, 25°C, or 27°C, as indicated. The genotypes were as follows: Fig. 4B: *w,UAS-P35/+;ptcGAL4,EP-Slik/+* ; *w,UAS-P35/+;ptcGAL4,EP-Slik/UAS-StripdsRNA* ; and *w,UAS-P35/+;ptcGAL4,EP-Slik/UAS-ckadsRNA* at 25°C ; Fig. 5A: *ptcGAL4/SlikKD-GFP;UAS-Lifeact-Ruby/+* at 18°C.

2.5.6 EdU labelling, immunostaining and image analysis of imaginal discs

For EdU labellings, wandering third instar larvae were dissected in serum free medium (EX-CELL 420, Sigma) and anterior halves bearing wing discs were labelled for 1 h with EdU and processed using the Click-iT Edu Alexa Fluor 555 Imaging Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. After several washes with PBS containing 0.2% Tween-20 (PBT), discs were stained for 10 minutes with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI in PBS and then washed several times in PBT. For fluorescence imaging, wandering third instar larvae were dissected in PBS and anterior halves were collected in PBS on ice. Discs were fixed in PBT with 4% formaldehyde for 20 min and then washed several times in PBT. Discs were mounted on slides in mounting medium (10% PBS, 90% glycerol, 0.2% n-propyl gallate), cover-slipped, and imaged using a Zeiss LSM700 confocal microscope and controlled by Zen 2 software (Carl Zeiss). Representative images were prepared for publication using ImageJ software (NIH) and Photoshop (Adobe).

2.5.7 Statistical analysis

Results are expressed as average \pm SD as indicated in the figure legends. Statistical significance between various conditions was assessed by determining p-

values (95% confidence interval) by unpaired one-way ANOVA (multiple comparison test) using GraphPad Prism (Prism Software). Parametric tests were used because the distributions across samples were assumed to be normal, but this was not formally tested.

2.6 Notes

2.6.1 Acknowledgments

We thank C.Charbonneau for its assistance at the IRIC Bio-imagery Facility.

2.6.2 Fundings

This work has been supported by a CIHR operating grant (#160426) to S.C. and D.H. C.D.J held a scholarship for registration fees from Wallonie-Bruxelles International, as well as a doctoral scholarship from IRIC and from Montreal University's Molecular Biology Program.

2.6.3 Author contributions

S.C. and D.H. and C.D.J. managed the project, conceptualized and designed the experiments.

C.D.J., O.D., M.B., B.R., M.D., and M.J. performed the experiments.

S.C., D.H., C.D.J., O.D., B.R. and M.D. analyzed the data.

C.D.J., S.C., D.H. and O.D. prepared the figures for the manuscript.

C.D.J., S.C., and D.H. wrote the manuscript with input from all coauthors.

3. Questions en suspens dans le projet de recherche

Dans cette étude nous avons découvert que dSTRIPAK/Slik régule la biogenèse des cytonèmes et leur fonction de signalisation. En effet, nos résultats démontrent que l'expression de Slik allonge les cytonèmes et induit la prolifération à distance dans le disque de l'aile dépendamment de dSTRIPAK. Toutefois, plusieurs résultats interpellent et les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas identifiés: Comment Slik allonge les cytonèmes sans être requis pour leur formation? Comment Strip et Cka sont-ils nécessaires à la biogenèse des cytonèmes? Comment la signalisation de croissance à distance est-elle induite par Slik? Dans cette section, je pousse l'interprétation de nos résultats à l'aide de la littérature afin de proposer des modèles de recherche.

3.1 dSTRIPAK/Slik nous renseigne sur la biogenèse des cytonèmes

Comme mentionné dans l'introduction de cette thèse, il est indéniable que les cytonèmes soient des structures dépendantes de l'actine (Chapitre 1, section 1.4.4). Toutefois, des évidences contradictoires attestent qu'il n'est pas encore établi comment. D'une part, des nucléateurs d'actine sont requis à leur formation [65, 69, 70]. D'autre part, induire la dépolymérisation de l'actine filamenteuse allonge les cytonèmes [68, 81]. Nos résultats amènent de nouvelles pistes de réflexion pour expliquer la biogenèse des cytonèmes.

3.1.1 Slik induit l'élongation des cytonèmes sans être requis pour leur biogenèse

Nous avons découvert que la surexpression de Slik, son mutant catalytiquement inactif (Slik^{KR}), ainsi que son domaine C-terminal (SlikCTD), double la longueur des cytonèmes (Figure 3.3). Cependant, la kinase n'est pas requise pour leur formation (Figure 3.6). Plusieurs évidences ont attiré mon attention, et me permettent de proposer une explication à ces résultats.

D'une part, la Formine Diaphanous (Dia) est nécessaire pour la formation des cytonèmes dans les cellules S2 [68], ainsi que les cytonèmes apicaux du sac aérien du disque imaginal de l'aile [76]. Dans ces cytonèmes, Dia se localise aux pointes des protubérances où elle s'est avérée affecter le transfert du morphogène Dpp en favorisant la nucléation de l'actine. De façon intéressante, la localisation et activation de

Dia dépend de sa liaison à Rho1. Effectivement, Rho1 induit le changement de conformation de Dia nécessaire pour son association à la membrane plasmique, ainsi que son rôle de nucléateur d'actine [267]. Ainsi Dia est p.ex. enrichie aux pointes des filopodes induits par la présence de Rho1 constitutivement active dans les hémocytes de drosophiles [268].

D'autre part, plusieurs interactions fonctionnelles ont été identifiées entre la kinase Slik (ou Slik chez les mammifères) et Rho1 (RhoA) (Chapitre 1, section 2.4.2). Parmi celles-ci, le laboratoire du Dr Jean-François Côté a découvert que Slik sauvage ou son mutant catalytiquement inactif s'associe spécifiquement à RhoA sous sa forme active [108]. De manière intéressante, cette interaction passe par le biais du domaine SlikCTD. Dans cette étude il a également été montré que l'activation de Rho1 par sa RhoGEF64C promeut l'association de Rho1 et Slik, la localisation corticale de Slik, ainsi que le niveau de phosphorylation de la dMoésine [108]. Par ailleurs, nous avons observé une colocalisation de Slik-mCherry et GFP-Rho1 au cortex cellulaire ainsi que dans les cytonèmes de cellules S2 (Figure 3.12).

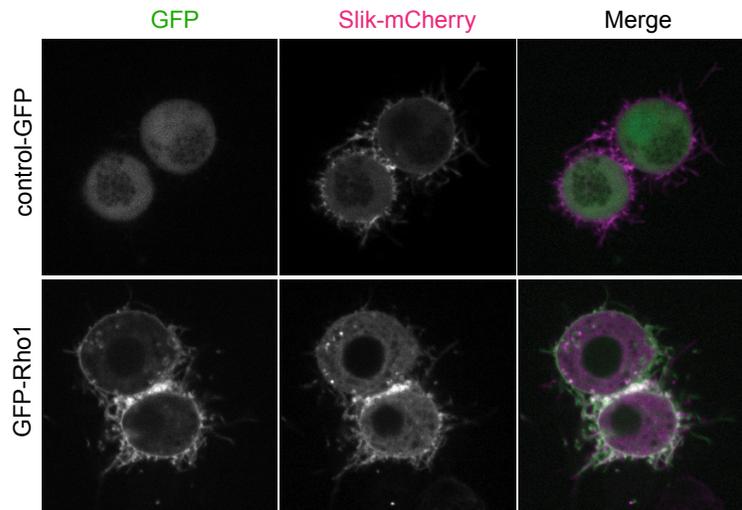


Figure 3.12 Slik et Rho1 colocalisent au cortex cellulaire et le long de cytonèmes
 Images confocales de cellules S2 vivantes exprimant de manière transitoire des constructions d'ADNc annotées (GFP ou GFP-Rho1 en vert, Slik-mCherry en mauve). Contrairement à la GFP, Rho1-GFP colocalise avec Slik-mCherry au cortex cellulaire et aux cytonèmes (colocalisation en blanc) (pour les procédures expérimentales voir Chapitre 3, section 2.5.4).

Je propose ainsi que Rho1 activé participe à la fonction non-catalytique de Slik par le modèle suivant (Figure 3.13): dans les cellules contrôles, Rho1^{GTP} recrute et

active sa protéine effectrice Dia au cortex cellulaire pour induire l'élongation des cytonèmes. La voie de signalisation Rho1/Dia ne nécessite pas la présence de Slik. Toutefois, lorsque Slik, Slik^{KR} ou SlikCTD est surexprimée, cela augmente l'activation et recrutement de Dia au cortex cellulaire par le biais de Rho1^{GTP}. Pour tester ce modèle de recherche il faudrait tester si l'élongation des cytonèmes par Slik, Slik^{KR} ou SlikCTD dépend de RhoGEF64C, Rho1 et Dia.

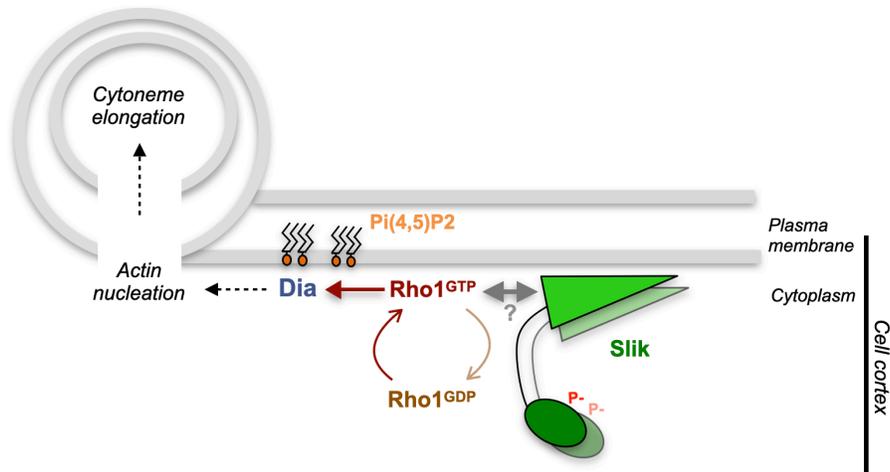


Figure 3.13 **Modèle d'étude: Slik induit l'élongation des cytonèmes par Rho1/Dia**

Rho1 activé (Rho1^{GTP}) recrute et active sa protéine effectrice Dia au cortex cellulaire [267]. Dia est nécessaire pour la formation des cytonèmes [68, 76]. Il existe une interaction complexe entre Slik et Rho1 (Chapitre 1, section 2.4.2). Dans ce modèle d'étude, il est proposé que Slik ne soit pas nécessaire à la formation de cytonèmes par la voie Rho1/Dia. Toutefois, la surexpression de Slik, Slik^{KR} ou SlikCTD induit l'élongation des cytonèmes en augmentant l'activation et recrutement de Dia au cortex cellulaire par le biais de Rho1^{GTP}.

3.3.2 La fonction kinase de Slik réduit-elle la taille des cytonèmes?

Notre étude met en évidence que le CTD de Slik est requis pour l'élongation des cytonèmes dans les cellules S2 (Figure 3.3). En effet, la surexpression de Slik Δ CTD réduit la longueur et la prévalence des cytonèmes dans les cellules S2. De manière intéressante, la surexpression du domaine kinase de Slik cause un arrondissement des cellules de mammifères, de façon dépendante de son activité kinase [99]. De plus, il a été montré que le CTD agit comme un domaine auto-inhibiteur sur les activités catalytiques de Slik et Lok [107, 269]. Donc nous émettons l'hypothèse que Slik Δ CTD inhibe la biogenèse des cytonèmes par la suractivation de son substrat catalytique, la dMoésine.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réduit l'expression de la dMoésine dans les cellules exprimant Slik Δ CTD (Figure 3.14). Nos observations préliminaires soutiennent que la suppression de la dMoésine rétablit la longueur maximale des cytonèmes, ainsi que leur occurrence dans les cellules exprimant Slik Δ CTD-GFP. Par ailleurs, nous avons également découvert que l'expression de la forme constitutivement active dMoésine-T559D cause un raccourcissement des cytonèmes par rapport à l'expression de la dMoésine sauvage (résultats non publiés). De plus, la perte d'activité de dMoésine (ou Slik) augmente la longueur des cytonèmes (Figure 3.6). Il semble donc que les fonctions catalytique et non-catalytique de Slik affectent la morphogenèse des cytonèmes de manière opposée. Cependant, les cytonèmes des cellules exprimant Slik^{KR}-GFP ne sont pas plus longs que ceux de Slik-GFP. Finalement, pour tester si Slik Δ CTD inhibe la biogenèse des cytonèmes par le biais de son activité kinase, nous prévoyons de tester l'effet du mutant catalytiquement inactif Slik^{KR} Δ CTD sur la morphogenèse des cytonèmes. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la stabilité corticale contrôlée par l'activité de la dMoésine [29] influence la morphogenèse des cytonèmes.

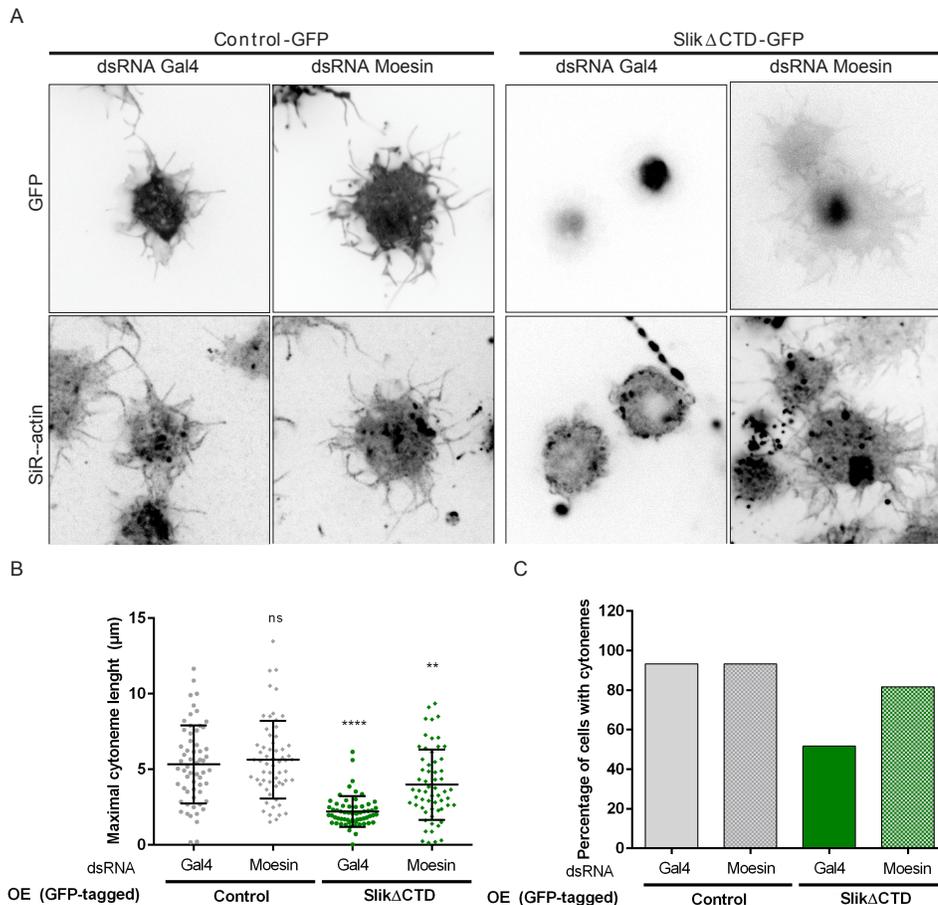


Figure 3.14 SlikΔCTD réduit la taille des cytonèmes dépendamment de dMoésine

(A) Images confocales à la surface des cellules S2 vivantes et traitées comme indiqué et exprimant de manière transitoire les constructions d'ADNc annotées (rangée supérieure) et sondées avec SiR-actine (rangée inférieure). (B) Quantification de la longueur maximale des cytonèmes mesurée sur le signal SiR-actine. Les données d'une expérience unique sont représentées comme la moyenne ± SD, ANOVA unidirectionnel avec des valeurs ns $p > 0.5$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. (C) Le pourcentage de cellules avec des cytonèmes de plus de 2 μm a été calculé (pour les procédures expérimentales voir Chapitre 3, section 2.5.4).

3.3.3 Comment Strip et Cka sont nécessaires à la biogenèse des cytonèmes?

Nous avons précédemment montré que dSTRIPAK/Slik agit comme un activateur de la dMoésine (Chapitre 2). Et nous venons de révéler que l'activation de la dMoésine réduit la taille des cytonèmes (Figure 3.14). Donc nous aurions attendu que la suppression de dSTRIPAK, tout comme la suppression de Slik ou dMoésine, cause une élongation des cytonèmes (Figure 3.6). Au contraire, les cellules S2 dépourvues de Strip ou Cka présentent deux-fois moins de cytonèmes et avec une longueur maximale

réduite de moitié, par rapport aux cellules contrôles (Figures 3.5 et 3.6). Donc Strip et Cka sont requis pour la biogenèse des cytonèmes.

La première question qui se pose est de savoir si le mécanisme moléculaire responsable de la régulation de l'activité kinase de Slik par dSTRIPAK, est également d'application pour son activité non-catalytique? Comme mentionné dans la discussion du manuscrit, il faudra pour cela tester si les mutants phospho-déficients de Slik^{NCD/CTD} allongent les cytonèmes de façon indépendante de dSTRIPAK. Si c'est le cas, cela révélera que dSTRIPAK favorise la biogenèse des cytonèmes par la déphosphorylation de Slik (Figure 3.15A). Puisque la déphosphorylation de Slik promeut sa localisation corticale (Figure 2.8), cela suggérera que dSTRIPAK contrôle les cytonèmes par la localisation de Slik. Toutefois, si ce n'est pas le cas, j'é mets deux autres hypothèses pour expliquer le rôle de dSTRIPAK dans la biogenèse des cytonèmes.

(i) Notre modèle d'étude à la section précédente (Figure 3.14) propose que la voie de signalisation Rho1/Dia contrôle la morphogenèse des cytonèmes. Or, des évidences dans la littérature révèlent des interactions fonctionnelles entre STRIPAK et cette GTPase. En effet, dans les cellules de mammifères, des chercheurs ont identifié une interdépendance entre la kinase effectrice de RhoA, ROCK et les STRIPs sur la contractilité cellulaire. Toutefois, l'activité de RhoA mesuré par une sonde FRET n'était pas modifiée dans les cellules dépourvues de STRIP1 ou STRIP2 [217]. Chez la levure, il a été proposé que l'orthologue de Strip (Far11) agit en amont de Rho pour réguler le cytosquelette d'actine [236]. Par ailleurs, une analyse à large spectre a identifié une interaction génétique entre Cka et Rho1 dans la prolifération de cellules S2 [270]. Enfin, Chen *et al.* ont mis en lumière une interaction fonctionnelle et complexe entre RhoA, STRIPAK et la voie Hippo [196]. En effet, les chercheurs ont montré que RhoA contrôle l'association de GCKs activatrices de Hippo au complexe STRIPAK [196]. Ainsi, lorsque RhoA est inactive cela compromet l'interaction et l'inhibition des kinases MST1 et MAP4K4 par PP2A^{STRIPAK}. Toutefois, RhoA n'agit par directement, mais par le biais de protéines activatrices en amont de la voie Hippo. Ces données indiquent que STRIPAK est capable de réguler les voies en aval de

RhoA, et vice-versa. Dans l'étude des cytonèmes, il serait intéressant de tester ce triangle d'interactions complexe entre dSTRIPAK, Slik, et Rho1 (Figure 3.15B).

- (ii) La formation de protrusions cellulaires implique la fusion de vésicules, le réarrangement du cytosquelette et le trafic endocytaire [271]. Différentes études ont identifié que STRIPAK est impliqué dans la dynamique des endosomes [223, 225, 266]. Premièrement, Strip est impliqué dans le transport rétrograde d'endosomes précoces dans les cellules S2 et les cellules neuronales de *Drosophila* [223]. Ainsi, Strip est nécessaire à l'élongation des axones. En parallèle, il a été montré que Cka est impliquée dans le transport rétrograde d'autophagosomes le long des axones, et de manière PP2A-dépendante [225]. De plus, les Striatines sont nécessaires à la croissance des dendrites chez les rats [227, 228]. STRIPAK favorise également l'extension du canal excréteur qui est un tube unicellulaire chez le ver *C. Elegans* [266]. En absence de composants de STRIPAK, dont l'orthologue de Cka, la longueur du tube était réduite, ainsi que le recyclage endocytaire. Dans notre étude, nous avons identifié que dSTRIPAK est requis pour la biogenèse des cytonèmes *in vitro* et *in vivo* (Figure 3.5). Il serait donc intéressant d'investiguer si cela passe par le trafic d'endosomes (Figure 3.15C). De plus, ceci aidera peut-être à comprendre les résultats controversés obtenus pour la Dynamine (GTPase qui régule la fission de vésicules endocytées à la membrane plasmique) [76, 81].

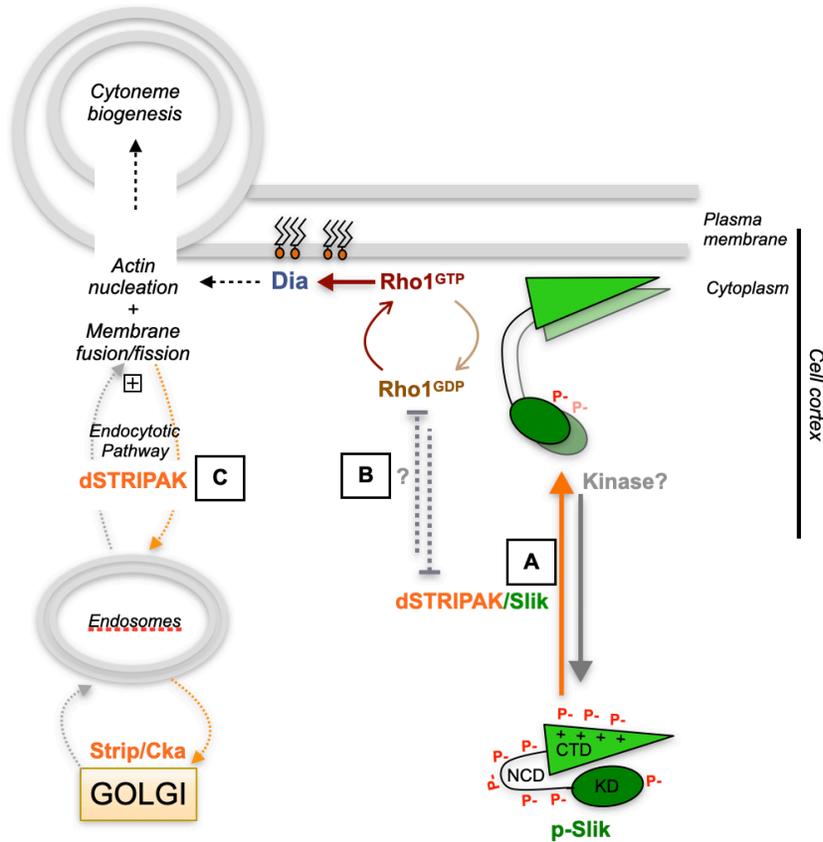


Figure 3.15 Comment dSTRIPAK est requis pour la biogenèse des cytonèmes?

Trois différentes possibilités sont proposées dans ma thèse pour expliquer le rôle de dSTRIPAK sur la biogenèse des cytonèmes: **(A)** dSTRIPAK favorise la biogenèse des cytonèmes par la déphosphorylation de Slik; **(B)** Il existe un triangle d'interactions complexes entre dSTRIPAK, Slik, et Rho1 pour contrôler la morphogénèse des cytonèmes ; **(C)** dSTRIPAK est requis pour le trafic endocyttaire nécessaire à la biogenèse des protrusions cellulaires.

3.4 Slik induit une signalisation de croissance à distance

À ce jour, les cytonèmes sont définis comme des filopodes spécialisés sur lesquels des vésicules extracellulaires contenant des molécules de signalisation se déplacent afin d'être sécrétées au contact de cellules cibles. La vidéomicroscopie sur les S2 nous a permis de révéler l'existence de trafic vésiculaire dynamique le long des cytonèmes Slik-positifs (Figure 3.10). Malgré le manque d'analyses quantitatives, nos observations sont semblables à celles décrites dans la littérature. De plus, nous avons constaté que Slik participe à une communication intercellulaire en libérant des vésicules Slik-positives au bout des cytonèmes. Il reste à définir le type de vésicules qui se déplacent le long des cytonèmes Slik-positifs, ainsi que la signalisation responsable de

l'effet pro-prolifératif induit par Slik. À l'aide de résultats préliminaires et de la littérature, je discute ces interrogations.

3.4.1 Les cytonèmes Slik-positifs transportent et libèrent des vésicules extracellulaires?

Plusieurs résultats obtenus au laboratoire permettent d'émettre l'hypothèse que les cytonèmes Slik-positifs servent de « rails » pour transporter et libérer des vésicules extracellulaires.

- (i) Le marqueur d'exosomes CD63 a précédemment été observé le long de cytonèmes *in vivo* [72]. Les exosomes sont issus de la libération de vésicules intraluminales des corps multivésiculaires [272]. Ceux-ci sont eux-mêmes formés suite à la maturation d'endosomes tardifs. Une étudiante à la maîtrise, Marie Bordet, a constaté que Slik endogène colocalise spécifiquement avec des vésicules Rab7-positives dans le cytoplasme de cellules S2 (Figure 3.16A-B). Cette petite protéine G marque les endosomes précoces et tardifs, et les corps multivésiculaires (MVBs) [273]. Puisque la taille moyenne des MVBs est plus large (~250 à 1000 nm) que celle des cytonèmes (~200 nm), nous spéculons que leur trafic dans les cytonèmes est responsable des renflements membranaires visibles le long des cytonèmes Slik-positifs. Rab7 ainsi que CD63 couplés à un fluorophore permettront d'investiguer le trafic de MVB le long des cytonèmes par vidéomicroscopie.
- (ii) Ophélie Delcorte, une autre étudiante à la maîtrise, a identifié que Slik est présente dans les fractions de microvésicules (MV) et d'exosomes (Exo) isolées par ultracentrifugation du milieu conditionné de cellules S2 (Figure 3.16C). Malgré l'absence de contrôles par le biais de marqueurs spécifiques de ces vésicules extracellulaires, la taille des vésicules présentes dans les fractions a été validée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*). Donc Slik endogène est contenue dans les vésicules extracellulaires dont la taille varie entre 40 à 1000 nm. De plus, les retards de mobilité sur gel de Slik dans les fractions MV et Exo indiquent une modification post-traductionnelle de Slik. L'ubiquitinylation pourra être identifiée par avec un anticorps spécifique, la phosphorylation pourra être testée

par traitement à la λ -phosphatase, et d'autres modifications (glycosylation, lipidation) pourront être analysés par spectrométrie de masse. Le fait que Slik soit modifiée dans ces fractions indique une fonction potentielle de Slik dans leur biogenèse. D'ailleurs, nous avons également identifié la dMoésine dans les fractions extracellulaires. Des analyses protéomiques réalisées sur le milieu de culture de neutrophiles formant des cytonèmes, ont révélé un enrichissement en protéines cytoplasmiques et composants du cytosquelette d'actine, dont la Moésine [81].

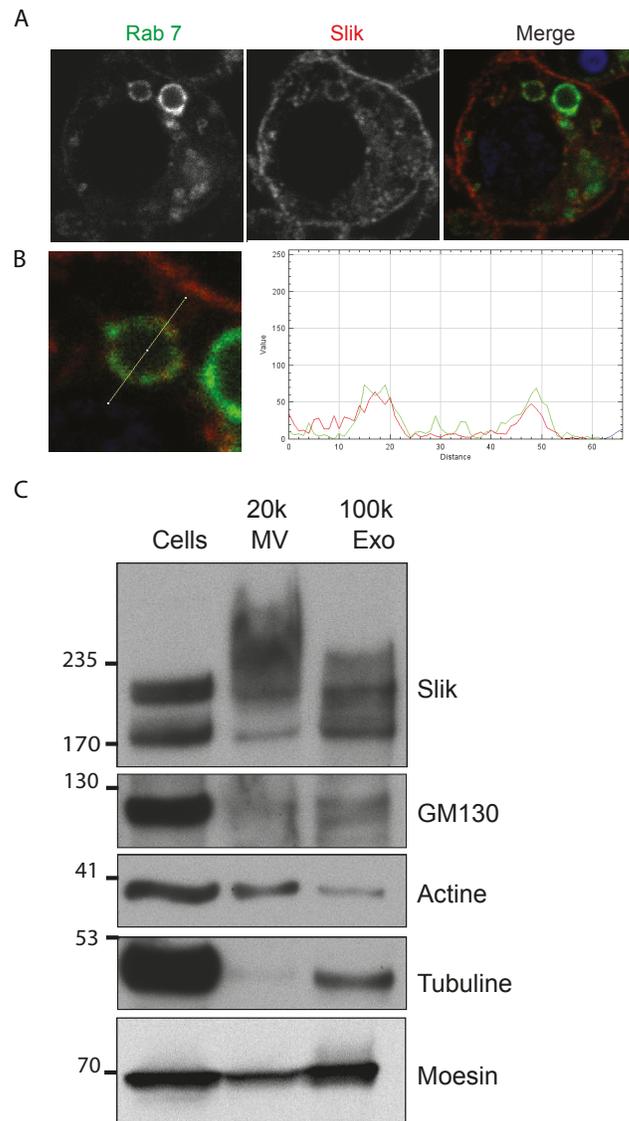


Figure 3.16 Slik est présente dans les fractions de vésicules extracellulaires

(A) Image confocale d'une cellule S2 marquée par immunofluorescence pour les vésicules Rab7-positives (vert) et Slik (rouge) au cortex et dans le cytoplasme. **(B)** Le graphique (à droite) représente l'intensité de fluorescence de Rab7 (vert) et Slik (rouge) le long de la ligne tracée sur

l'image (à gauche). Slik colocalise aux vésicules Rab7-positives. **(C)** Pour l'analyse des vésicules extracellulaire, le milieu (sans sérum) conditionné a été d'abord centrifugé à 3000g pour éliminer les débris cellulaires, puis à 20 000g (20k) pour récolter les microvésicules (MV) et enfin à 100 000g (100k) pour récupérer les exosomes (Exo). Les lysats cellulaires, et des fractions 20k et 200k ont été analysés par immunobuvardage avec les anticorps anti-Slik (protéine cible), anti-GM130 (Golgi enrichit dans la fraction cellulaire), anti-actine (enrichie dans les MV), anti-tubuline (enrichie dans les Exo) et anti-dMoésine.

3.4.2 Comment Slik induit la signalisation de prolifération non-autonome?

Le Dr David Hipfner avait découvert que l'effet pro-prolifératif de Slik était dépendant de la MAP3K Raf, mais pas de la voie canonique ERK/MAPK [83]. Ensuite, son laboratoire avait testé l'implication de plusieurs gènes dont l'expression accélère principalement la division cellulaire (tels que PI3K, Myc, Ras85D, E2F, CyclineD/Cdk4). Tous augmentaient la prolifération autonome dans le DP, mais aucun n'affectait la morphogénèse de la PM [85].

Désormais, en vue de nos découvertes que Slik allonge les cytonèmes (Figure 3.3), nous émettons l'hypothèse que la signalisation non-autonome est induite par des cytonèmes émanant de la surface apicale des cellules DP. Des résultats récents obtenus au laboratoire de Dr David Hipfner indiquent que les cellules DP qui surexpriment Slik sauvage ou son mutant catalytiquement inactif (Slik^{KD}) présentent des projections d'actine dans la lumière du disque (Figure 3.17A). Ces projections ne sont pas visibles dans le tissu contrôle. Des protrusions apicales similaires et qui entrent en contact avec les cellules de la PM sus-jacente avaient précédemment été documentées: ces projections présentaient un trafic de vésicules Rab5-positives et exprimaient le récepteur de Dpp, Tkv [71]. Toutefois, les auteurs manquaient (i) de marqueurs pour identifier si ces protubérances apicales étaient des cytonèmes, et (ii) d'outils pour spécifiquement abolir leur formation afin d'examiner leur fonction. Nos résultats préliminaires révèlent que Slik (Slik^{KD}-GFP) est localisée sur ces protrusions d'actine, qui peuvent s'étendre sur plusieurs diamètres dans la lumière du disc (Figure 3.17B). Est-ce que Slik pourrait servir de marqueur pour identifier les cytonèmes? Ultérieurement il sera intéressant de tester l'implication de Dia (contrôle positif), ainsi que Strip et Cka, sur la formation de ces projections apicales. Enfin, pour examiner le rôle de signalisation de ces protrusions, il faudra également tester la présence de Tkv.

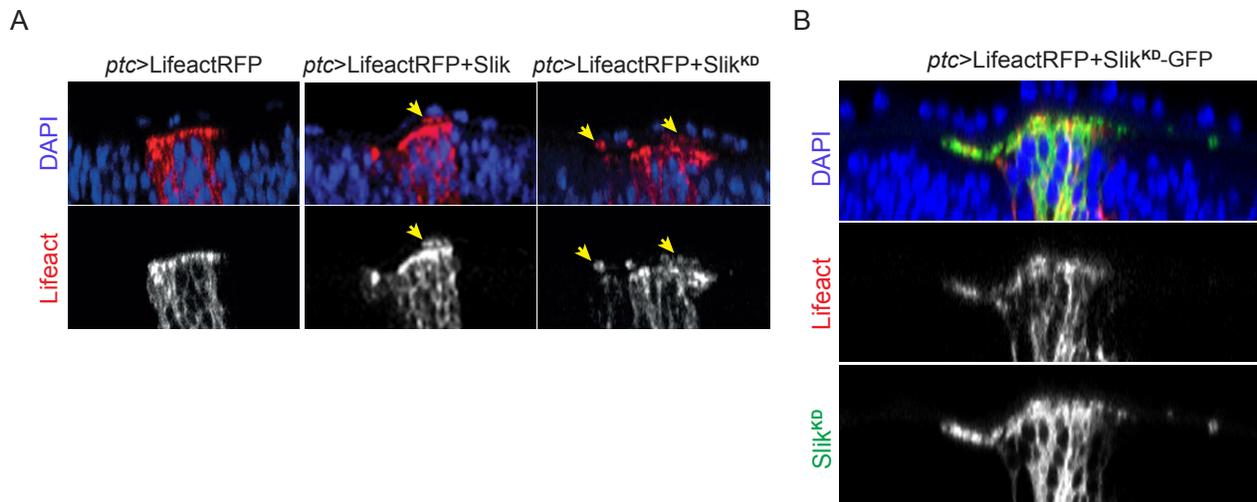


Figure 3.17 **Slik induit des protrusions d'actine apicales dans le disque de l'aile**

(A, B) Images confocales du disque imaginal de l'aile. Les cellules épithéliales du disque propre (DP) sont identifiables par la présence de noyaux denses, alors que les cellules de la membrane péripodiale (PM) sus-jacentes sont éloignées (DAPI bleu). Les disques surexprimant Slik sauvage ou de son mutant catalytiquement inactif (Slik^{KD}) par le gène sélecteur *Ptc* présentent des projections d'actine (Lifeact-RFP) dans la lumière du disque. **(B)** Ces projections expriment Slik^{KD}-GFP (vert) et peuvent s'étendre sur plusieurs diamètres de cellules (pour les procédures expérimentales voir Chapitre 3, section 2.5.6). Résultats obtenus au laboratoire du Dr David Hipfner.

De manière intéressante, il est connu que l'expression de Dpp (aussi appelé BMP, TGF- β , orthologue de BMP2 chez les mammifères) ou de son récepteur activé Tkv augmente la division cellulaire et la croissance cellulaire de manière autonome [274]. Il a été montré que en moyenne la division cellulaire dans le disque de l'aile est induite lorsque la signalisation Dpp augmente de 50% [275]. J'émetts l'hypothèse que Slik induit sa signalisation de croissance à distance par le biais des cytonèmes apicaux qui favorisent la signalisation Dpp dans le tissu sus-jacent. Pour investiguer cela, il faudra comparer les niveaux de Smad phosphorylé (facteur de transcription en aval de la voie canonique Dpp/Tkv) dans le tissu PM sus-jacent de la *Ptc*-Slik par rapport aux tissus contrôles adjacents.

CHAPITRE 4: Discussion et Perspectives

1. Slik est une protéine périphérique non-permanente régulée par phosphorylation

Les changements de composition du cortex cellulaire et d'activité des protéines corticales sont impliqués dans la morphogenèse. Ainsi dans l'introduction de cette thèse, nous avons vu **l'importance de l'association non-permanente de protéines périphériques** pour réorganiser le cortex cellulaire (Chapitre 1, section 1.1). Ces changements sont contrôlés par des voies de signalisation complexes, et permettent de répondre à différents processus morphogénétiques. Toutefois, la coordination entre les changements structurels et les cascades de signalisation impliquées n'est pas totalement élucidée.

Au cours de ma thèse, nos travaux ont mis en évidence une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la composition du cortex cellulaire. En effet, nous avons découvert que le complexe phosphatase de dSTRIPAK régule l'association corticale de Slik. Or, sa localisation corticale promeut la stabilité du cytosquelette sous la membrane plasmique par son effecteur, la dMoésine (Chapitre 2). Bien qu'il reste à déceler la machinerie moléculaire sous-jacente, la localisation corticale de Slik semble aussi importante pour ses fonctions non-catalytiques: la biogenèse des cytonèmes et l'induction de la signalisation de croissance (Chapitre 3). L'ensemble de ces processus contrôlent la morphogenèse chez la mouche.

1.1 La localisation de Slik en périphérie

Malgré l'importance évidente de la kinase Ste20 Slik dans le développement embryonnaire de la drosophile, tant par son activité catalytique que non-catalytique [83], peu d'attention avait été portée à sa localisation.

Le Dr Sébastien Carréno et le Dr David Hipfner avaient constaté que la distribution de Slik superposait celle de la dMoésine phosphorylée à la membrane plasmique de cellules S2 et cellules épithéliales [29, 84]. Dans le tissu épithélial, la nécessité du domaine C-terminal (CTD) pour la localisation apicale des kinases GCK-V a été caractérisé [47, 85]. Dans les fibroblastes de mammifères, l'équipe du Dr Luc Sabourin a découvert que Slik est recrutée aux sites d'adhésion cellulaires [118] et au

front de migration [125, 276]. Dans les sites d'adhésion, Slik colocalise avec la kinase CK2 [104]. Durant le processus migratoire, Slik est activée par la voie Src/FAK/MAPK [123]. Toutefois, sa délocalisation au front de migration est dépendante de la protéine adaptatrice LMO4 (*LIM-only protein4*) et de la kinase Src, mais pas de la voie classique FAK/MAPK [123, 125, 276]. Plus récemment, le laboratoire du Dr Jean-François Côté a découvert que Rho1 constitutivement active promeut la localisation corticale de Slik dans les cellules S2 [108].

Au Chapitre 2, nous révélons pour la première fois que la localisation de Slik est régulée par son niveau de phosphorylation. En effet, nous avons d'abord confirmé que Slik endogène est présente dans le cytoplasme et majoritairement au cortex des cellules S2 (Figure 2.6). Nous avons ensuite découvert qu'elle est délocalisée du cortex vers le cytoplasme en réponse à l'inhibition chimique de PP2A. À l'inverse, Slik est enrichie au cortex en réponse à l'inhibition de kinases. Dans le but de caractériser les sites de phosphorylation de Slik, nous avons généré deux mutants phospho-déficients, soit sur les 17 sites identifiés sur le domaine NCD, soit sur les 4 sites présents sur le CTD. De façon surprenante les deux mutants de Slik étaient drastiquement enrichis au cortex cellulaire (Figure 2.8). Goni *et al.* avaient établi que les protéines périphériques non-permanentes basculaient entre un état soluble dans le cytosol, et un état lié à la membrane [4]. Nous considérons ainsi Slik comme une kinase dont la localisation périphérique est non-permanente et régulée par phosphorylation.

La phosphorylation des protéines peut affecter plusieurs propriétés de celles-ci, dont la localisation subcellulaire, mais aussi la conformation spatiale, l'activité enzymatique, et les interactions protéines-protéines. Nos résultats suggèrent que la phosphorylation régule l'association de Slik à la membrane plasmique par liaisons ioniques (Chapitre 4, section 1.2). De plus, nos résultats manifestent également que la localisation de Slik implique la régulation de sa conformation spatiale (Chapitre 4, section 1.3).

1.2 La phosphorylation de Slik modifie sa liaison ionique avec la membrane plasmique?

La charge globalement négative de la surface membranaire ainsi que la charge des protéines sont déterminantes pour la localisation subcellulaire de celles-ci [6, 251, 277]. Les protéines se comportent effectivement comme des acides ou bases faibles d'après leur point isoélectrique (pI) étant « le pH pour lequel la charge nette de la molécule est zéro » [278]. Bien que la structure tertiaire de la protéine soit primordiale pour l'exposition des résidus chargés, le pI théorique se définit par la composition en acides aminés de la protéine. Ainsi, nous avons utilisé un outil bio-informatique (<https://web.expasy.org/protparam/>) pour calculer le pI théorique de Slik et de ces domaines (Figure 4.1A). De manière intéressante, SlikCTD responsable de la localisation corticale de Slik (Figure 4.1B), présente un pI basique (~9.5) par la présence de nombreux acides aminés chargés positivement (R/K en gras dans Figure 4.1C). Bien que le pI doit être vérifié par la technique de focalisation isoélectrique [278], nous suggérons que le CTD polybasique cible la kinase à la membrane plasmique par liaisons ioniques.

De plus, nous émettons l'hypothèse que la charge négative ajoutée par le groupement phosphate perturbe les liaisons ioniques entre Slik et la membrane plasmique. Slik hautement phosphorylée est ainsi détachée de la membrane plasmique par répulsion électrostatique. Au contraire, Slik moins phosphorylée est enrichie à la membrane plasmique par les charges positives de son domaine CTD. Malgré que l'ensemble de nos résultats obtenus avec Slik corrèle avec ce modèle, l'utilisation de liposomes composés de phospholipides acides permettra de le tester *in vitro*. Effectivement, notre modèle sera vérifié si les interactions ioniques entre Slik et les liposomes acides sont augmentées pour les mutants phospho-déficients de Slik^{NCD/CTD} par rapport à Slik sauvage. De plus, nous nous attendons à ce que Slik Δ CTD ne soit pas associée aux liposomes, contrairement à SlikCTD. Cependant, le laboratoire du Dr David Hipfner avait trouvé que SlikCTD n'interagissait avec aucun phosphatidylinositol testé *in vitro* [85]. Cela suggère qu'une régulation plus complexe existe pour SlikCTD.

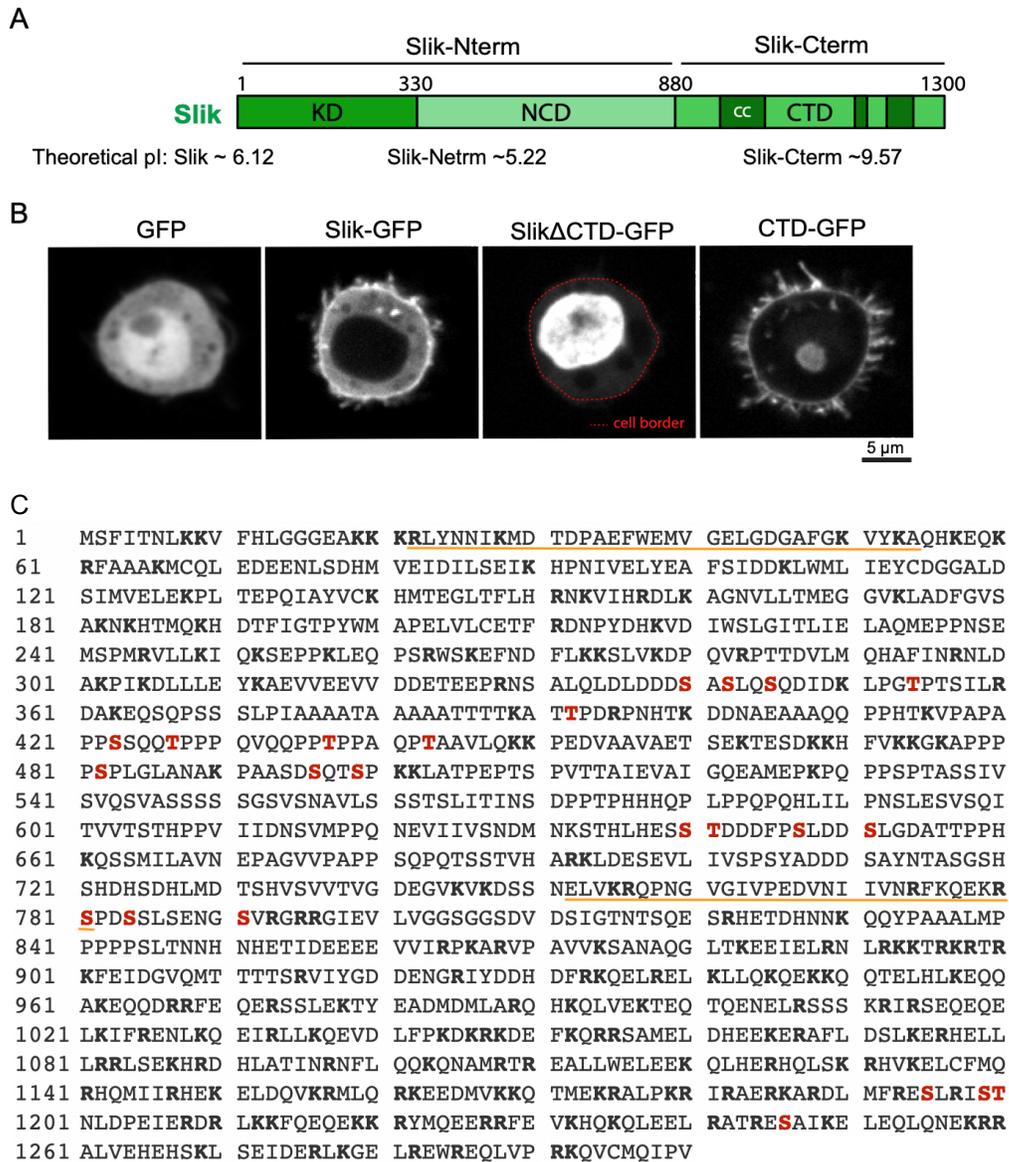


Figure 4.1 **SlikCTD polybasique est responsable de la localisation corticale de Slik**

(A) Représentation schématique de Slik (isoforme A) avec les points isoélectriques (pI) théoriques de chaque domaine: le domaine kinase (KD), le domaine non-conservé (NCD), et le domaine C-terminal (CTD). (B) Images confocales de cellules S2 exprimant les cDNA annotées. (C) Séquence en acides aminés de Slik (isoforme A) avec les résidus Arg/Lys (en gras), les séquences NLS prédites à l'aide d'un logiciel bio-informatique (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>) (soulignées en orange), et les Ser/Thr mutés dans Slik^{NCD/CTD} (en rouge). Échelle, 5 μm.

1.3 La phosphorylation de Slik modifie sa conformation spatiale?

L'implication des domaines non-catalytiques dans la régulation des kinases est de plus en plus prise en considération [95, 96]. Toutefois, leurs mécanismes de régulation restent méconnus à ce jour. Pour les kinases GCK-V, le domaine CTD bien

conservé a été décrit comme étant un domaine régulateur. À l'inverse, peu de choses sont connues sur le domaine NCD. Notre étude met en lumière l'importance des deux domaines NCD et CTD pour la régulation de Slik.

D'une part, nous avons confirmé que Slik dépourvue de CTD est majoritairement nucléaire dans les cellules S2 (Figure 3.3 et Figure 4.1B). À l'aide d'un logiciel bio-informatique (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>) nous avons identifié deux signaux de localisation nucléaire (NLS) dans la région N-terminal de Slik (sous-lignée en orange dans la Figure 4.1C). En mutant ces NLS prédits, nous pourrions tester s'ils causent la localisation nucléaire de Slik Δ CTD. Toutefois, la forme entière de Slik est exclue du noyau (Figure 4.1B). Une première possibilité est que le CTD masque les motifs NLS sur la région N-terminale. En effet, il a été démontré chez les mammifères que le CTD est capable d'interagir avec le domaine kinase de Slik [105]. Par ailleurs, il est possible que le CTD contrôle l'export nucléaire de la kinase par son interaction, démontrée pour SlikCTD, avec la nucléoporeine Tpr (*Translocated promoter region*) responsable d'exporter des protéines du noyau [106, 279].

D'autre part, nos travaux ont mis en évidence que la phosphorylation sur NCD ou CTD de Slik régule la localisation de sa forme entière (Figure 2.8). Toutefois, la localisation du domaine SlikCTD seul n'est pas contrôlée par phosphorylation (Figure 3.7). De même, l'expression de SlikCTD seul induit l'élongation des cytonèmes de manière indépendante de dSTRIPAK (Figure 3.5). Ces résultats indiquent l'importance de la région N-terminal de Slik pour sa régulation par phosphorylation et par dSTRIPAK. Nous spéculons ainsi que la déphosphorylation du domaine NCD ou CTD induit un changement de conformation de Slik qui « libère » le domaine CTD polybasique pour promouvoir sa localisation corticale. Toutefois, SlikCTD seul (donc non-masqué par le domaine N-terminal) ne nécessite pas ce changement de conformation pour lier la membrane plasmique. Des expériences de co-immunoprécipitation avec les mutants phospho-déficients de Slik^{NCD/CTD} et les formes tronquées de Slik nous permettront d'examiner si les événements de phosphorylation de Slik régulent l'association de ses domaines N- et C-terminaux.

Dans cette première partie de la discussion, je propose donc que Slik soit une kinase périphérique non-permanente et régulée par phosphorylation de cette façon: la forme phosphorylée de Slik est cytoplasmique, en conformation fermée. En induisant la déphosphorylation de Slik sur ces domaines NCD et CTD, le complexe phosphatase de dSTRIPAK promeut sa conformation « ouverte » nécessaire à son association à la membrane plasmique par le biais de son domaine CTD polybasique (Figure 4.2).

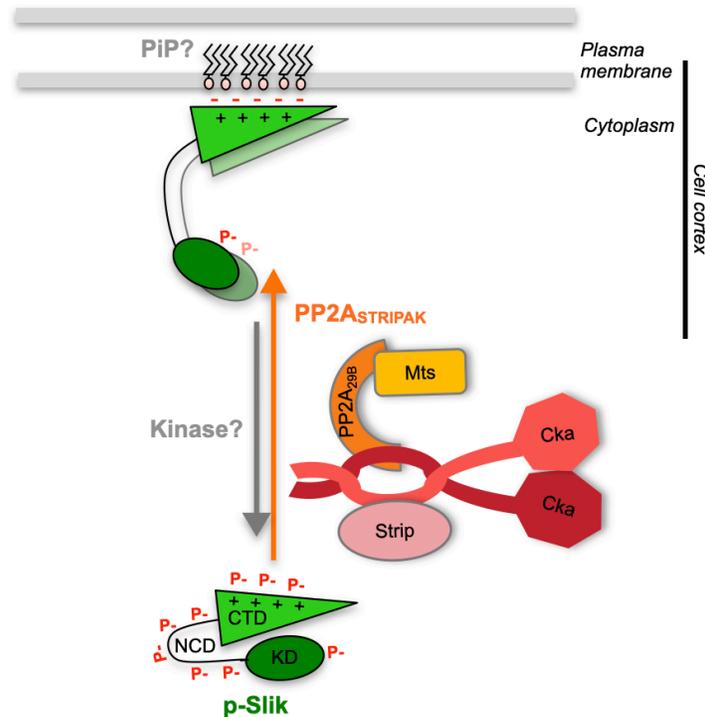


Figure 4.2 Modèle d'étude: Slik est une protéine périphérique non-permanente régulée par phosphorylation

Les résultats obtenus dans cette thèse permettent d'établir ce modèle de régulation de Slik: Sa forme hyper-phosphorylée est cytoplasmique et en conformation fermée. En induisant la déphosphorylation de Slik sur ces domaines NCD et CTD, PP2A_{STRIPAK} promeut sa conformation « ouverte » nécessaire à son association à la membrane plasmique par le biais de son domaine CTD polybasique. Ainsi Slik peut effectuer ses fonctions catalytiques et non-catalytiques. Figure réalisée par C. De Jamblinne.

2. dSTRIPAK participe à la régulation spatiotemporelle de la dMoésine

La transition G2/M est caractérisée par des changements morphologiques, induits par de multiples cascades de signalisation (Chapitre 1, section 1.2). Au laboratoire, nous avons découvert que l'activation spécifique de la dMoésine à l'entrée de la mitose régule ainsi l'arrondissement cellulaire en métaphase [29, 30]. De plus, la régulation spatiotemporelle de la dMoésine au cours de la mitose est essentielle pour conserver la stabilité génomique dans les cellules filles (Figure 1.10). Bien que trois régulateurs majeurs de l'activité de dMoésine dans les cellules S2 ont été caractérisés, **la coordination entre le cycle cellulaire et la régulation de la dMoésine** n'est pas élucidée. Au Chapitre 2, nous avons découvert que dSTRIPAK contrôle la localisation corticale de Slik en interphase et lors de la transition en mitose (Figure 2.9). De plus, nous avons démontré que dSTRIPAK active la dMoésine par cette régulation de Slik (Figure 2.8). Ici, je discute comment dSTRIPAK participe à la régulation spatiotemporelle de la dMoésine.

2.1 Slik est enrichie au cortex cellulaire à l'entrée de la mitose

Chantale Roubinet, une ancienne doctorante au laboratoire a précédemment examiné la régulation spatiotemporelle de la dMoésine [86]. Par immunofluorescence elle a mesuré que la dMoésine est 3-fois plus phosphorylée en métaphase qu'en interphase. Elle a également participé à caractériser les trois régulateurs majeurs de l'activité de dMoésine dans les cellules S2 (Figure 1.17). Voici les résultats qui permettent de proposer que chacun de ces trois régulateurs participe en synergie pour induire l'activation mitotique de la dMoésine.

Premièrement, les domaines membranaires riches en $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ régulent à la fois la distribution spatiale de la dMoésine et son activation à la membrane plasmique [86]. Barbara Decelle a quantifié à l'aide d'une sonde fluorescente une augmentation (de 1,2-fois) du niveau de $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane plasmique à l'entrée de la mitose (résultat non publié). Puisque le $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ lie la dMoésine à la membrane plasmique, cette augmentation pourrait recruter davantage de dMoésine lors de la transition G2/M.

Deuxièmement, la phosphatase PP1-87B est responsable d'inactiver la dMoésine en interphase [86]. À l'entrée de la mitose, PP1-87B couplée à la GFP est redistribuée du cytoplasme vers le fuseau mitotique. Il a ainsi été suggéré que cette localisation empêche PP1-87B d'inactiver la dMoésine phosphorylée au cortex en métaphase. En anaphase, PP1-87B s'accumule sur les chromosomes [86, 280] tout comme son orthologue humain PP1-y [281]. Ainsi, PP1-87B et sa sous-unité régulatrice Sds22 régulent l'inactivation de la dMoésine aux pôles cellulaires en anaphase et permettent l'élongation polaire nécessaire pour la sortie de mitose [87].

Troisièmement, la kinase Slik est responsable du niveau basal de phosphorylation de la dMoésine en interphase et de son augmentation spécifique en métaphase [86]. De façon intéressante, les cellules S2 dépourvues de PP1-87B présentent un niveau de phosphorylation de dMoésine en interphase aussi élevé qu'en métaphase. Cela indique que la kinase Slik est activée tout au long du cycle cellulaire. De plus, l'abondance et l'activité des kinases Lok et Slk sont constantes au cours du cycle cellulaire, testées par essais kinase *in vitro* dans des cellules HeLa synchronisées [111, 128]. Les auteurs suggèrent alors qu'une autre forme de régulation prend place durant le cycle cellulaire. Au Chapitre 2, nous avons révélé pour la première fois que la localisation de Slik au cortex cellulaire augmente de 1,3 à 1,5-fois à l'entrée de la mitose (Figure 2.8).

Je propose donc que ces trois changements lors de la transition G2/M; (i) l'augmentation de $Pi(4,5)P_2$, (ii) la délocalisation de PP1-87B, ainsi que (iii) l'enrichissement de Slik au cortex cellulaire, participent en synergie pour atteindre une augmentation de 3-fois de l'activité de la dMoésine à l'entrée mitotique (Figure 4.3).

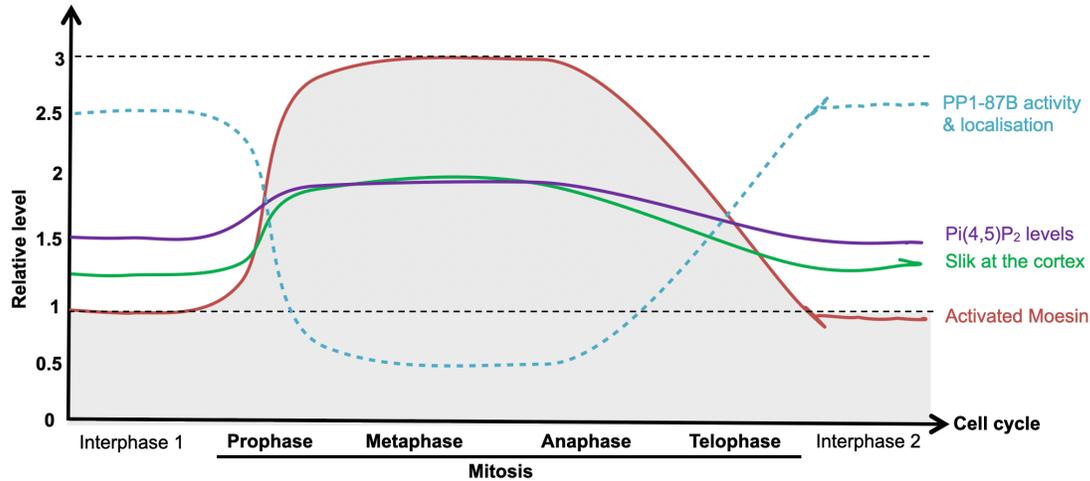


Figure 4.3 **Modèle d'étude: Pi(4,5)P₂, Slik et Pp1-87B participent à l'activation spécifique de la dMoésine en mitose**

Représentation schématisée de la synergie des trois régulateurs de la dMoésine au cours du cycle cellulaire. En rouge: le niveau de phosphorylation de la dMoésine mesurée par immunofluorescence indique une augmentation de 3-fois en métaphase [86]. En mauve: le niveau de Pi(4,5)P₂ mesuré à l'aide d'une sonde Tubby-GFP a indiqué un ratio cortex/cytoplasme de 1,5 en interphase [86]. À l'entrée de la mitose, une augmentation de 1,2-fois de sa localisation membranaire a été mesurée (résultat non publié). En vert: la localisation de Slik-GFP a indiqué un ratio cortex/cytoplasme de 1,2 en interphase et une augmentation de ~1,4-fois à l'entrée de la mitose (Chapitre 2). En bleu: PP1-87B est cytoplasmique en interphase, et est délocalisée au fuseau mitotique en métaphase [86]. Chez les mammifères, les kinases Cdk1/Cycline B et Aurora B inhibent des complexes PP1 [282, 283].

2.2 dSTRIPAK déphosphoryle Slik durant la transition G2/M?

L'entrée, la progression, et la sortie de mitose sont caractérisées par des changements de phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire [284, 285]. Ces changements de phosphorylation sont la conséquence d'une régulation spatiale et temporelle des protéines kinases et phosphatases.

Ainsi, la transition G2/M est initiée par l'activation de kinases mitotiques, telles que les kinases Cdk1 (*Cyclin-dependent kinase*), Gwl (*Greatwall*), Aurora B et Plk1, qui sont responsables de la phosphorylation de centaines de protéines à l'entrée mitotique [286]. L'activité augmentée de ces kinases mitotiques est accompagnée de la réduction des activités des phosphatases opposées. Les kinases Gwl et Cdk1/Cycline B activent p.ex. des inhibiteurs de PP2A-B [287] et PP2A-B' [288], respectivement. À l'inverse, la sortie de la mitose est caractérisée par la dégradation de nombreuses protéines, dont la Cycline B (essentielle à l'activité de Cdk1) et d'autres kinases mitotiques. Par

conséquent cela lève l'inhibition des phosphatases mitotiques. Celles-ci déphosphorylent ensuite de nombreuses protéines activées en mitose et les kinases mitotiques. P.ex. PP1 déphosphoryle la kinase Gwl [289] et par conséquent lève l'inhibition sur PP2A-B [287].

Toutefois, la modélisation que l'activité des kinases mitotiques est opposée à celle des phosphatases durant la progression mitotique est de plus en plus remise en question. Premièrement, des kinases mitotiques, telles que Cdk1, sont activées par déphosphorylation par les phosphatases Cdc25 pour amorcer la transition G2/M [290]. Deuxièmement, ce ne sont pas tous les complexes PP1 et PP2A qui sont inhibés à l'entrée de la mitose. P.ex. l'activité de PP2A-B'/B56 est importante en prométaphase pour réguler l'équilibre entre les activités de PP1 et Aurora B et ainsi contrôler l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique [291]. Troisièmement, des analyses du phosphoprotéome de Cdk chez la levure en division indiquent un renouvellement de phosphorylation rapide [292]. Les auteurs spéculent alors la présence de cycles de phosphorylation/déphosphorylation qui forment un seuil variable durant la mitose. Enfin, l'activité de certains complexes phosphatases, tel que PP2A-B'' et PP2A-B'''/Striatines, est méconnue en mitose.

Notre modèle d'étude au Chapitre 2 propose qu'il existe un équilibre entre Slik hautement phosphorylé dans le cytoplasme et Slik déphosphorylée par PP2A_{STRIPAK} au cortex cellulaire (Figure 2.14 et Figure 4.2). À l'entrée mitotique, nous observons que l'équilibre de Slik est déplacé vers sa localisation corticale. De plus, nos résultats suggèrent que cet enrichissement de Slik durant la transition G2/M est contrôlé par sa déphosphorylation par dSTRIPAK. En effet, aussi bien l'inhibition chimique de PP2A, que la suppression des composants de PP2A_{STRIPAK} réduisent le recrutement cortical de Slik en métaphase (Figure 2.8). Afin de tester si les sites de phosphorylation identifiés étaient nécessaires à ce changement de localisation, nous avons observé les mutants phospho-déficients de Slik^{NCD/CTD} en division. Toutefois, ces phosphomutants sont également recrutés au cortex cellulaire à l'entrée de la mitose. Ce résultat suggère que l'enrichissement de Slik à l'entrée mitotique est soit contrôlé par un mécanisme alternatif à la phosphorylation, ou bien implique d'autres sites de phosphorylation. Pour vérifier si

cela est dû au niveau de phosphorylation de Slik, il faudrait évaluer l'état de phosphorylation de Slik au cours du cycle cellulaire dans des cellules synchronisées. Les points de contrôles mitotiques nécessaires pour la synchronisation expérimentale sont absents dans les cellules de drosophile [293]. Ainsi, la prochaine étape serait de tester la localisation de Slk ou Lok dans des cellules de mammifères synchronisées. Si notre hypothèse est bonne, les kinases GCK-V devraient être davantage phosphorylées en interphase qu'en métaphase. De plus, il serait possible de tester si cet état de phosphorylation dépend de STRIPAK. Si c'est le cas, cela indiquerait que PP2A-B^{''}/Striatine est activé lors de la transition G2/M.

Enfin, d'autres questions intéressantes restent en suspens: Est-ce que les kinases GCK-V peuvent alors être considérées comme des kinases mitotiques? Ont-elles d'autres fonctions que la phosphorylation des ERMs à l'entrée de la division? De façon intéressante et comme décrit dans l'introduction (Chapitre 1, section 2.4.2), Lok et Slk ont un second substrat en commun, notamment la kinase mitotique Plk1.

2.3 L'assemblage de dSTRIPAK/Slik suite à la fragmentation mitotique du Golgi?

En vue de chercher quels stimuli pourraient amorcer l'activation spécifique de la dMoésine à l'entrée de la mitose, Sebastien avait précédemment proposé l'implication de la fragmentation mitotique de l'appareil du Golgi.

En effet, l'appareil du Golgi, organisé en ruban périnucléaire, subit une fragmentation séquentielle à l'entrée de la mitose dans les cellules de mammifères [294]. Chez la drosophile, malgré que le Golgi soit organisé en piles individualisées, elles subissent également cette fragmentation caractéristique [295]. J'ai confirmé cela dans les cellules S2 en visualisant le cis-Golgi à l'aide de la protéine matricielle GM130 (Figure 4.4A). Plus récemment, il a été documenté que le désassemblage mitotique du Golgi corrèle avec la libération de certaines protéines initialement associées au Golgi, et qui acquièrent des fonctions spécifiques durant la mitose [296]. De façon intéressante, différentes localisations périnucléaires ont été documentées pour les composants de STRIPAK [197]. Nous avons confirmé que Cka et Strip localisent au Golgi dans les

cellules S2, tel que les Striatines et STRIPs dans les cellules Hela [253]. En effet, nous avons observé que GFP-Strip cytoplasmique colocalise partiellement avec le cis-Golgi, et GFP-Cka entoure le cis-Golgi (Figure 4.4B).

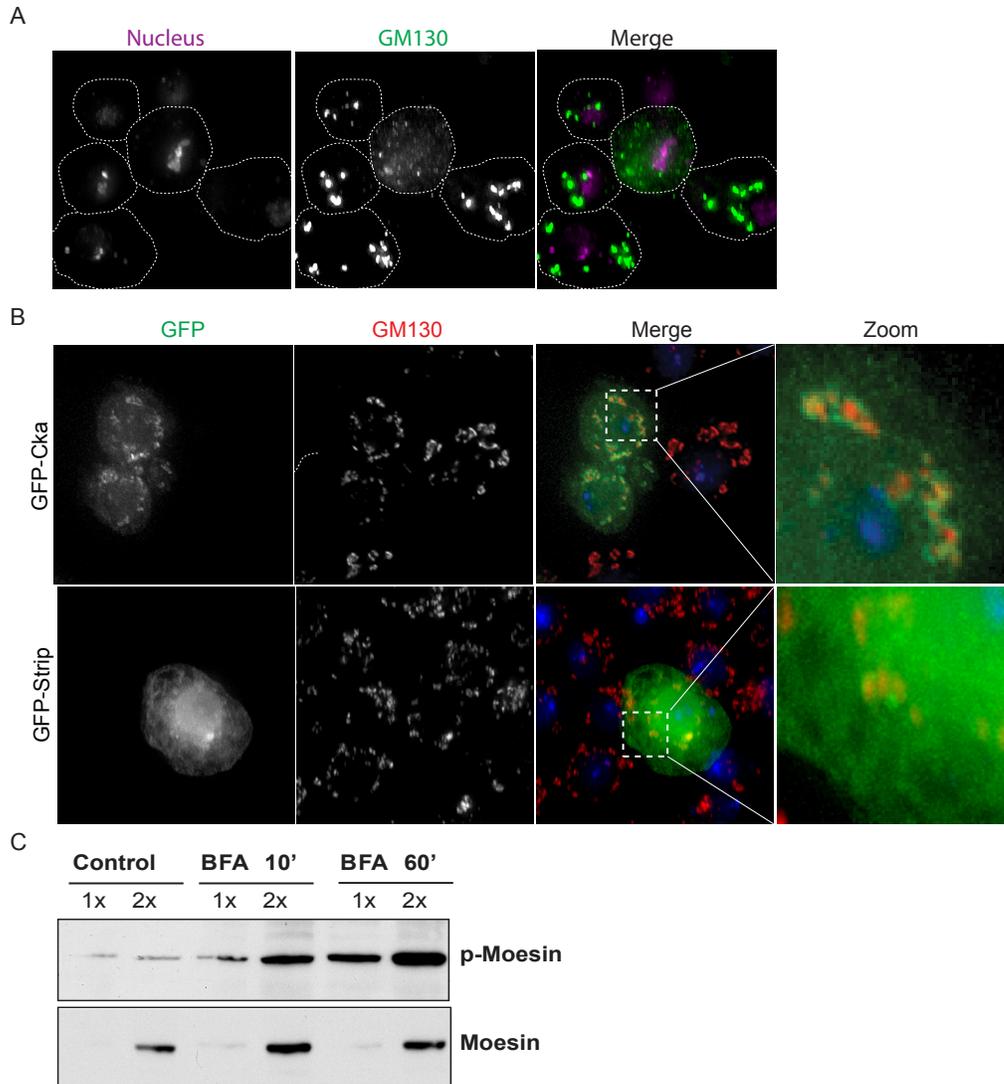


Figure 4.4 Strip et Cka colocalisent avec le cis-Golgi, qui se fragmente en mitose

(A) Images de cellules S2 marquées par immunofluorescence avec un anticorps qui cible spécifiquement la protéine GM130 présente sur le cis-Golgi (vert). L'ADN marqué par le Dapi (mauve) permet de visualiser les cellules en mitose. **(B)** Images de cellules exprimant de manière transitoire GFP-Cka et GFP-Strip (vert) et marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti-GM130 (rouge). L'ADN est marqué au Dapi (en bleu). **(C)** Lysats de cellules S2 traitées telles qu'indiquées et analysées par immunobuvardage (deux concentrations de dépôts différentes) avec les anticorps qui ciblent spécifiquement la dMoésine phosphorylée sur la T556 (p-Moesin) ou la dMoésine totale (Moesin) (pour les procédures expérimentales voir Chapitre 2, section 2.5).

Nous proposons alors que dSTRIPAK étant associé à l'appareil du Golgi, soit libéré durant la fragmentation mitotique pour activer la dMoésine. Afin de tester cette hypothèse, nous avons obtenu des résultats préliminaires indiquant que l'induction de la fragmentation du Golgi par un traitement à la Brefeldine A (BFA) [295], augmentait le niveau de phosphorylation de la dMoésine (Figure 4.4C). Pour investiguer si cela passe par la voie dSTRIPAK/Slik, il serait intéressant de répéter cette expérience dans des cellules dépourvues de Slik ou PP2A_{STRIPAK}. De plus, je spécule que l'association de Slik au complexe dSTRIPAK soit augmentée suite à la fragmentation du Golgi. Cette hypothèse pourrait être testée soit par essais de ligature de proximité (PLA) entre Cka et Slik au cours du cycle cellulaire de cellules S2, soit par expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules de mammifères synchronisées. L'ensemble de ces résultats nous informeraient sur le potentiel rôle de la fragmentation mitotique du Golgi comme régulateur spatiotemporel de la dMoésine par le biais du complexe dSTRIPAK/Slik (Figure 4.5).

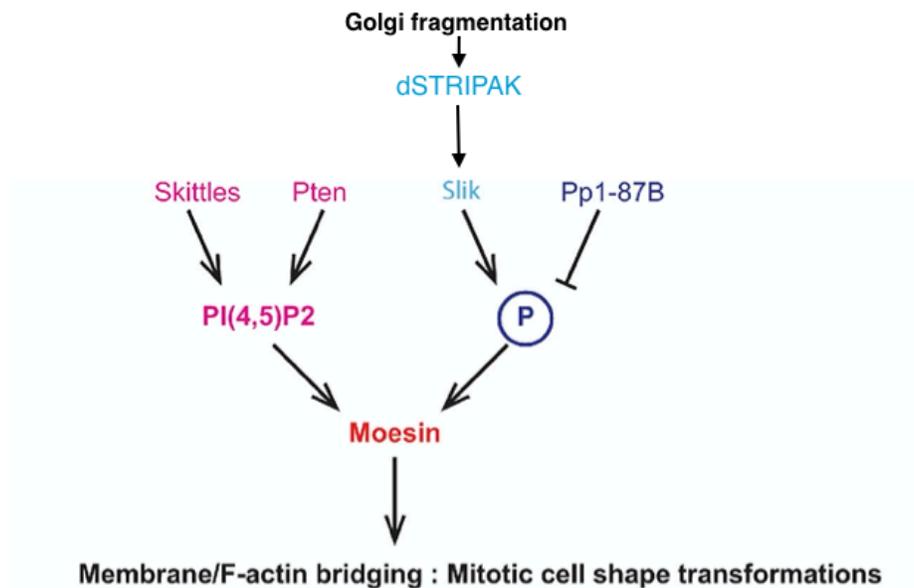


Figure 4.5 **Modèle d'étude: La fragmentation du Golgi induit l'activation de la dMoésine par dSTRIPAK/Slik**

Notre modèle de recherche actuel est que la fragmentation de l'appareil du Golgi à l'entrée de la mitose libère des composants de dSTRIPAK, qui vont s'associer avec Slik pour la déphosphoryler et ainsi induire son recrutement au cortex cellulaire. Cet enrichissement participe avec l'augmentation du Pi(4,5)P₂ et la délocalisation de PP1-87B à l'activation caractéristique de la dMoésine à l'entrée de la mitose. Figure adaptée de © [86].

2.4 Et si dSTRIPAK régulaît d'autres fonctions catalytiques de Slik?

Nous avons découvert que dSTRIPAK régule la phosphorylation Slik-dépendante de la dMoésine importante pour la morphogenèse mitotique des cellules S2 et l'intégrité épithéliale du disque imaginal de l'aile (Chapitre 2). L'activation de dMoésine par Slik est également nécessaire pour la morphogenèse des photorécepteurs [84, 164] et la ramification des tubes respiratoires [297] chez la drosophile. Peu de régulateurs en amont de ces fonctions morphogénétiques sont connus. Donc, il serait intéressant de tester si la voie de signalisation dSTRIPAK/Slik est d'application dans ces processus.

Plus récemment, il a été découvert que Slik phosphoryle la Thr152 sur Taline aux sites d'adhésions musculaires pour induire son recrutement et sa fonction dans l'organisation musculaire [298]. Chez les mammifères, il a été montré que Slik phosphoryle la Ser250 de Paxilline afin de maintenir sa localisation aux points focaux d'adhésion et sa fonction dans la migration cellulaire [126]. Paxilline et Taline sont deux protéines d'adhésions qui lient le cytosquelette d'actine aux Intégrines transmembranaires. Si dSTRIPAK contrôle également l'activité de ces protéines d'adhésions par le biais de Slik, cela impliquera davantage le complexe dSTRIPAK/Slik dans la régulation de la morphogenèse cellulaire.

Enfin, alors que Slik régule positivement l'activité de la dMoésine, il a été montré qu'elle régule négativement la fonction de la protéine étroitement apparentée à la dMoésine, Merline [299]. En effet, le disque de l'aile mutant pour Slik présente une activité diminuée de la dMoésine, mais au contraire une surexpression de Merline dans le disque de l'aile. Or Merline/NF2 est un suppresseur de tumeur qui active la voie Hippo pour inhiber la prolifération [196]. De façon importante, Dr David Hipfner a révélé que l'induction de la prolifération par Slik ne passe pas par Merline [85]. De plus, Merline est régulée par la fonction catalytique de Slik [299], alors que la signalisation de prolifération par Slik est indépendante de sa fonction kinase. Toutefois, il serait envisageable que dSTRIPAK régule l'activité compétitive de Slik envers dMoésine et Merline. En contrôlant l'association corticale de Slik, dSTRIPAK favoriserait l'activation de la dMoésine et l'inactivation de Merline simultanément.

2.5 Et si cette voie de signalisation était conservée par l'évolution?

Les kinases GCK-V régulent l'activité des ERMs dans différents processus morphogénétiques importants, tels que la migration, la division et la polarité cellulaires (Tableau 4.1). Toutefois, nos connaissances sur la régulation spatiotemporelle de Lok et Slk en amont des ERMs sont faibles.

GCK-V	ERMs	Fonctions	Types cellulaire	Références
LOK	Moésine	Migration cellulaire	Cellules Jurkat (lymphocytes T)	<i>Belkina et al., 2009</i>
LOK et SLK	Ézrine	Microvillosités apicales	Cellules Jeg-3 (épithéliales)	<i>Viswanatha et al., 2012</i>
SLK	Ézrine	Fuseau mitotique	Cellules HeLa (cancéreuses)	<i>Machicoane et al., 2014</i>

Tableau 4.1 **Fonctions associées à l'activation des ERMs par les kinases GCK-V**

Lok accroît le niveau de phosphorylation des ERMs dans une lignée de lymphocytes T en culture, et cette activité entrave leur migration cellulaire [110]. Lok et Slk sont responsables de la phosphorylation de l'Ézrine au cortex apical de cellules épithéliales polarisées, et par conséquent la biogenèse des microvillosités dans ces cellules [47]. Dans les cellules HeLa, l'Ézrine activée par Slk régule la localisation du complexe trimérique Gai/LGN/NuMa et l'orientation du fuseau mitotique durant la division [28].

De façon intéressante, Dr Luc Sabourin a identifié une interaction entre Slk et des composantes du complexe STRIPAK chez la souris (résultat non publié). Cela suggère que le complexe dSTRIPAK/Slik est conservé chez les mammifères. Une étude a récemment évalué l'activité catalytique de plusieurs kinases de type Ste20, dont Slk, dans des cellules KO STRIP1/2 [196]. Leurs résultats indiquent qu'en l'absence de STRIP1/2, l'activité kinase *in vitro* de Slk est fortement augmentée, sans affecter le niveau de phosphorylations des ERMs. Toutefois, il a précédemment été montré que la déplétion individuelle de STRIP1 ou STRIP2 induit des effets opposés sur le niveau de phosphorylation des ERMs et la forme cellulaire, suggérant que les paralogues ont des fonctions distinctes [217, 221]. L'utilisation de la drosophile nous a permis d'éviter cette diversité fonctionnelle et de caractériser une interaction fonctionnelle entre le complexe phosphatase PP2A_{STRIPAK} et la kinase Slik.

Les ERMs favorisent les capacités migratoires et invasives de plusieurs lignées cancéreuses et sont surexprimées dans plusieurs cancers (Chapitre 1, section 3.3).

Puisque nous ne connaissons pas encore précisément les voies de signalisation altérées dans ces conditions, il serait intéressant d'examiner l'implication de STRIPAK. Effectivement, STRIPAK serait une cible thérapeutique envisageable s'il favorise la localisation périphérique des kinases GCK-V pour y activer les ERMs. Cependant, puisqu'il régule de nombreuses kinases Ste20, il faudrait bloquer spécifiquement son interaction avec les kinases GCK-V. Bien que le cheminement de recherche soit encore long avant d'arriver à cette perspective, il est important de déceler les mécanismes moléculaires impliqués dans la morphogenèse et altérés durant la tumorigenèse.

3. dSTRIPAK/Slik contrôle la formation et la signalisation des cytonèmes

Au cours des deux dernières décennies, des protubérances cellulaires impliquées dans l'échange de molécules de signalisation ont été identifiées dans de nombreux organismes, et différents types cellulaires ou tissulaires [300]. Les deux principales catégories de protrusions signalisatrices sont les cytonèmes et les nanotubes tunnels (TNTs) [54, 300]. Malgré des différences morphologiques et fonctionnelles, **le manque de marqueurs spécifiques rend leur identification ambiguë** dans divers contextes. Ainsi il n'est pas encore établi si les cytonèmes et les TNTs sont deux structures fondamentalement différentes ou si les TNT sont l'évolution des cytonèmes [54].

3.1 L'identification des protrusions cellulaires

À ce jour, les cytonèmes sont majoritairement documentés chez la drosophile et jouent un rôle crucial dans leur développement embryonnaire en établissant les gradients de morphogènes. Certaines études ont toutefois identifié des filopodes de signalisation semblables aux cytonèmes chez les vertébrés en développement. En effet, des morphogènes étaient transportés le long d'extensions cytoplasmiques et participaient à la signalisation dans des embryons de poussins ou durant la gastrulation de poisson-zèbres [301, 302].

Les TNTs sont principalement identifiés chez les vertébrés, et contrairement aux cytonèmes, ils n'ont pas été observés chez l'embryon à ce jour [300]. À l'inverse des cytonèmes qui ne forment pas de connexion cytoplasmique entre les cellules, les TNTs sont des protrusions tubulaires qui relient directement deux cellules (Figure 4.6). Ces « tunnels » de 100 à 500 nm de large ne transfèrent pas seulement des molécules de signalisation, mais aussi des organites, des pathogènes, du calcium, des microARNs, et des protéines ou lipides membranaires vers des cellules avoisinantes (jusqu'à ~100 µm de distance) [303]. Les TNTs, tout comme les autres protrusions, sont formés suite au réarrangement du cytosquelette d'actine et à l'apport de membrane plasmique par les voies sécrétoires [304]. Ainsi les Rho GTPase, Cdc42 et Rac1, et leurs effecteurs

Arp2/3, WASP, WAVE contrôlent la biogenèse des TNTs dans les macrophages en culture [305].

Au Chapitre 3, nous avons identifié que dSTRIPAK/Slik contrôle la formation de cytonèmes chez la drosophile. Comprendre si cette voie de signalisation est spécifique à leur biogenèse ou est aussi impliquée dans la formation de TNTs, nous permettra d'avancer dans la caractérisation et distinction de ces protrusions.

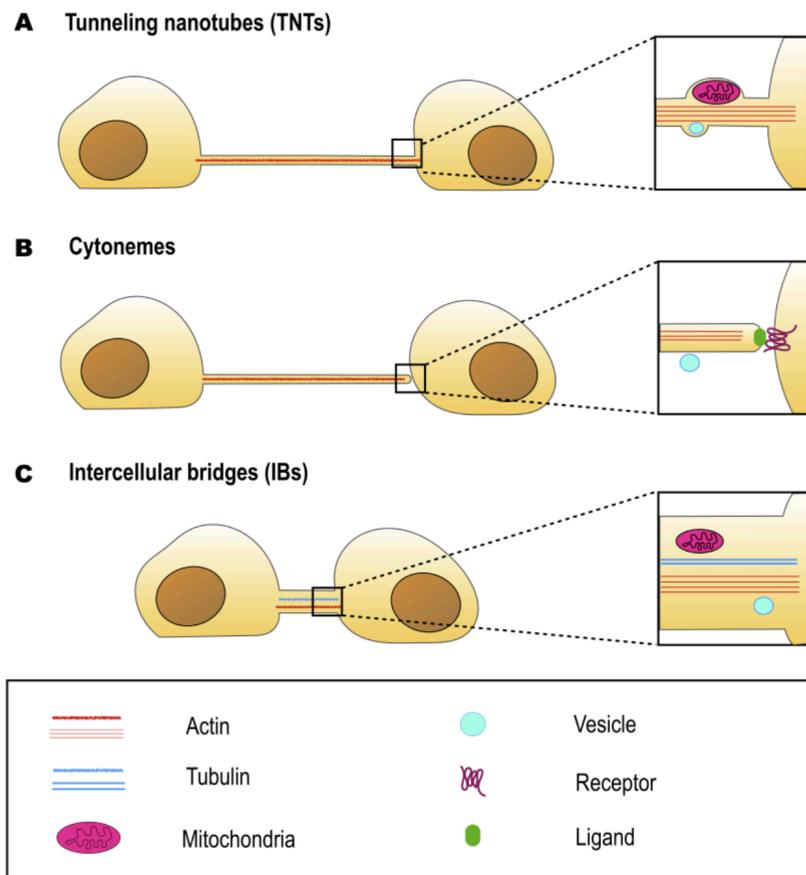


Figure 4.6 **Similitudes et différences entre les différents protrusions cellulaires de signalisation**

Illustrations schématiques des nanotubes tunnels (TNTs) **(A)**, des cytonèmes **(B)** et des ponts intracellulaires **(C)**. Les TNTs et les cytonèmes ont des morphologies similaires, ils contiennent de l'actine mais pas de la tubuline. Cependant, les TNT sont ouverts et permettent la continuité du cytoplasme, tandis que les cytonèmes sont fermés. Les ponts intercellulaires sont ouverts, mais sont généralement plus courts et plus larges que les TNTs. Certains ponts intercellulaires contiendraient également de la tubuline. Les trois types de structures cellulaires sont capables de transférer des marchandises. Cependant, alors que les cytonèmes transfèrent des vésicules contenant des molécules de signalisation, les TNT et les ponts intercellulaires sont capables de transférer également des organelles p.ex. des mitochondries. Figure issue de © [54].

3.2 Le rôle des protrusions cellulaires dans le cancer

Depuis une quinzaine d'années, les TNTs sont caractérisés dans de nombreuses cellules de mammifères en culture, dont des lignées cancéreuses, ainsi que dans des tissus *in vivo* [54, 303]. Une nouvelle technique d'imagerie 3D a p.ex. permis de visualiser des nanotubes membranaires reliant des cellules cancéreuses métastasées dans le cerveau de souris [306]. Des évidences indiquent que les TNTs confèrent aux cellules cancéreuses une résistance aux chimiothérapies, radiothérapies et chirurgies [303]. Ainsi, il a été suggéré que les TNTs favorisent la communication de cellules cancéreuses à cellules cancéreuses, ou entre les cellules cancéreuses et leur micro-environnement.

Des évidences récentes indiquent que les cytonèmes participent également à la progression cancéreuse [307]. Effectivement, dans un modèle de tumeur induite dans le disque de l'aile, inhiber la formation des cytonèmes par le biais de protéines régulatrices connues (SCAR, Dia, Nrg, et Caps), corrèle avec une réduction de la croissance tumorale et de la mortalité [307]. Or, la communication entre les cellules tumorales et les cellules stromales avoisinantes participe à la survie, la croissance et l'invasion tumorale [308]. Ainsi, les chercheurs de cette étude ont émis l'hypothèse que les cytonèmes favorisent la communication au sein du micro-environnement tumoral [307]. Tester la présence des cytonèmes Slik-positifs dans ce modèle tumoral du disque imaginal de l'aile et examiner la nécessité de dSTRIPAK dans la progression cancéreuse nous renseignera sur l'importance de cette signalisation dans la tumorigenèse.

4. Études de la composition du cortex cellulaire

Malgré l'importance de la composition, l'assemblage et la plasticité du cortex cellulaire dans les processus morphogénétiques vitaux, notre compréhension de sa régulation est superficielle. Depuis peu, des analyses protéomiques ont permis d'étudier la plasticité corticale lors de processus cellulaires spécifiques :

- (i) L'analyse par spectrométrie de masse du cortex purifié en isolant les blebs cellulaires a fourni une liste de composants corticaux [309]. Dans cette étude les chercheurs ont répété l'expérience après suppression d'une protéine candidate pour évaluer son effet sur la composition corticale.
- (ii) En analysant l'interactome de l'actine filamenteuse isolée à partir de cellules en interphase et de cellules en mitose comparativement, Serres *et al.* ont identifié des protéines associées à l'actine enrichies en mitose [310]. La microscopie à super-résolution a ensuite permis d'examiner les potentiels régulateurs de l'architecture du cortex mitotique.
- (iii) La composition protéique des filopodes dendritiques a été analysée par spectrométrie de masse à partir d'une purification d'une protéine membranaire [311]. Des axones de neurones de rats ont également été analysés suite à leur isolation par des puces à micromotifs [312].

Afin de caractériser davantage l'implication de dSTRIPAK/Slik sur la composition du cortex cellulaire, je propose d'effectuer des analyses protéomiques des protéines corticales dans les cellules dépourvues de dSTRIPAK et les cellules surexprimant Slik. Ces données nous renseigneront d'une part sur l'ensemble des modifications corticales régulées par dSTRIPAK/Slik et d'autre part sur les potentiels candidats impliqués dans la biogenèse des cytonèmes Slik-positifs (Figure 4.7).

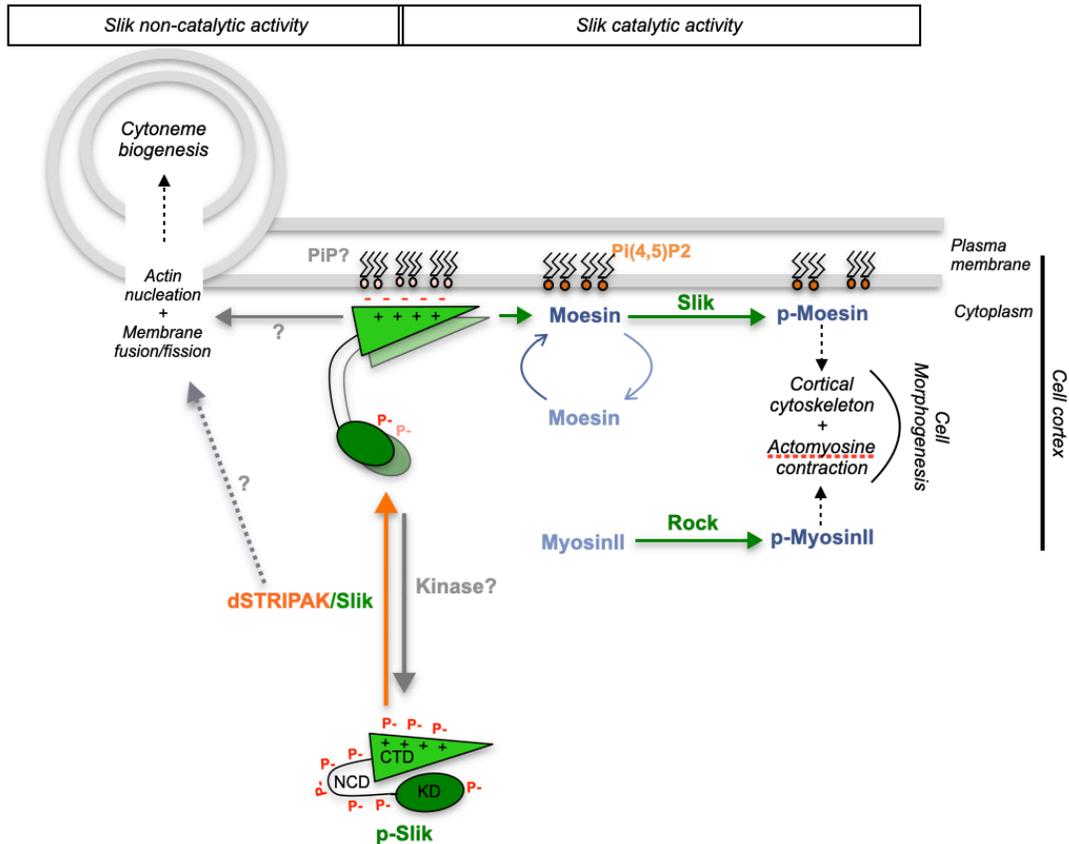


Figure 4.7 L'étude de la composition du cortex cellulaire pourrait nous renseigner sur les fonctions catalytiques et non-catalytiques de Slik

Les résultats obtenus dans cette thèse permettent d'établir ce modèle de régulation de l'activité catalytique et non-catalytique de Slik par dSTRIPAK. Les flèches grises indiquent les mécanismes qui restent à décoder. Basées sur les techniques décrites en [309-312], je propose d'effectuer des analyses protéomiques des protéines corticales dans les cellules dépourvues de dSTRIPAK et les cellules surexprimant Slik afin de découvrir (i) l'ensemble des modifications corticales régulées par dSTRIPAK/Slik et (ii) d'identifier de potentiels candidats impliqués dans la biogenèse des cytonèmes Slik-positifs. Figure réalisée par C. De Jamblinne.

5. Conclusion

Notre travail met en évidence l'importance de la localisation spatiale d'une protéine et de ces différents domaines. En l'occurrence, nous avons identifié une kinase périphérique dont l'association au cortex cellulaire influence ses fonctions morphogénétiques. En découvrant comment la localisation corticale de cette kinase est régulée, notre recherche met en évidence une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la plasticité du cortex cellulaire. Or, l'organisation du cortex varie pour répondre aux besoins morphogénétiques de la cellule. Si cette adaptation est inhibée, des fonctions cellulaires fondamentales seront altérées menant potentiellement à l'apparition de cellules cancéreuses.

*La vie, c'est comme une bicyclette,
il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre.*

Albert Einstein

En recherche, c'est pareil ...

Références

1. Turing, A.M., The chemical basis of morphogenesis. 1953. Bull Math Biol, 1953. **52**(1-2): p. 153-97; discussion 119-52.
2. Bezanilla, M., et al., Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. J Cell Biol, 2015. **209**(3): p. 329-37.
3. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
4. Goni, F.M., The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(6): p. 1467-76.
5. McLaughlin, S. and D. Murray, Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. Nature, 2005. **438**(7068): p. 605-11.
6. Goldenberg, N.M. and B.E. Steinberg, Surface charge: a key determinant of protein localization and function. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1277-80.
7. Bivona, T.G., et al., PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 481-93.
8. Schaks, M., G. Giannone, and K. Rottner, *Actin dynamics in cell migration*. Essays Biochem, 2019. **63**(5): p. 483-495.
9. Pollitt, A.Y. and R.H. Insall, WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 15): p. 2575-8.
10. Faix, J. and K. Rottner, *The making of filopodia*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(1): p. 18-25.
11. Bisi, S., et al., Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(5): p. 565-73.
12. Pellegrin, S. and H. Mellor, *Actin stress fibres*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 20): p. 3491-9.

13. Laporte, D., R. Zhao, and J.Q. Wu, Mechanisms of contractile-ring assembly in fission yeast and beyond. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(9): p. 892-8.
14. Karsenti, E., Microtubule dynamics: severing microtubules in mitosis. *Curr Biol*, 1993. **3**(4): p. 208-10.
15. Barbiero, I., R. De Rosa, and C. Kilstrup-Nielsen, Microtubules: A Key to Understand and Correct Neuronal Defects in CDKL5 Deficiency Disorder? *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(17).
16. Zhu, X. and I. Kaverina, Golgi as an MTOC: making microtubules for its own good. *Histochem Cell Biol*, 2013. **140**(3): p. 361-7.
17. Benarroch, E.E., Dynamics of microtubules and their associated proteins: Recent insights and clinical implications. *Neurology*, 2016. **86**(20): p. 1911-20.
18. Ritter, A., et al., Molecular insight into the regulation and function of MCAK. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2015. **51**(4): p. 228-45.
19. Schliwa, M. and G. Woehlke, *Molecular motors*. *Nature*, 2003. **422**(6933): p. 759-65.
20. McKenney, R.J., et al., Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science*, 2014. **345**(6194): p. 337-41.
21. Moller, L.L.V., A. Klip, and L. Sylow, Rho GTPases-Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health. *Cells*, 2019. **8**(5).
22. Abdrabou, A. and Z. Wang, Post-Translational Modification and Subcellular Distribution of Rac1: An Update. *Cells*, 2018. **7**(12).
23. Chen, Z., et al., Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature*, 2010. **468**(7323): p. 533-8.
24. Kiyomitsu, T. and I.M. Cheeseman, Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(3): p. 311-7.

25. Dao, V.T., et al., Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 16): p. 2996-3004.
26. Champion, L., M.I. Linder, and U. Kutay, *Cellular Reorganization during Mitotic Entry*. *Trends Cell Biol*, 2017. **27**(1): p. 26-41.
27. Cramer, L.P. and T.J. Mitchison, Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(1): p. 109-19.
28. Machicoane, M., et al., SLK-dependent activation of ERMs controls LGN-NuMA localization and spindle orientation. *J Cell Biol*, 2014. **205**(6): p. 791-9.
29. Carreno, S., et al., Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J Cell Biol*, 2008. **180**(4): p. 739-46.
30. Kunda, P., et al., Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr Biol*, 2008. **18**(2): p. 91-101.
31. Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher, Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(4): p. 276-87.
32. Solinet, S., et al., The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *J Cell Biol*, 2013. **202**(2): p. 251-60.
33. Maddox, A.S. and K. Burridge, RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol*, 2003. **160**(2): p. 255-65.
34. Stewart, M.P., et al., Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature*, 2011. **469**(7329): p. 226-30.
35. Morgan, T.H., Localization of the Hereditary Material in the Germ Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1915. **1**(7): p. 420-9.
36. Adams, M.D., et al., The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.

37. Mirzoyan, Z., et al., *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Front Genet*, 2019. **10**: p. 51.
38. Schneider, I., Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*, 1972. **27**(2): p. 353-65.
39. Manning, G., et al., Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(10): p. 514-20.
40. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
41. Das, V., et al., The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J Cell Physiol*, 2019.
42. Chang, C.J., et al., p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(3): p. 317-23.
43. Gupta, S. and A. Maitra, *EMT: Matter of Life or Death?* *Cell*, 2016. **164**(5): p. 840-2.
44. Nakajima, Y.I., Mitotic spindle orientation in epithelial homeostasis and plasticity. *J Biochem*, 2018. **164**(4): p. 277-284.
45. Tepass, U., et al., Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, 2001. **35**: p. 747-84.
46. Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher, Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1993. **105 (Pt 4)**: p. 1025-43.
47. Viswanatha, R., et al., Local phosphocycling mediated by LOK/SLK restricts ezrin function to the apical aspect of epithelial cells. *J Cell Biol*, 2012. **199**(6): p. 969-84.
48. Fristrom, D., The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review. *Tissue Cell*, 1988. **20**(5): p. 645-90.

49. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, Coordinating changes in cell adhesion and phenotype during EMT-like processes in cancer. *F1000 Biol Rep*, 2010. **2**: p. 86.
50. Yilmaz, M. and G. Christofori, EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
51. Felipe Lima, J., et al., EMT in Breast Carcinoma-A Review. *J Clin Med*, 2016. **5**(7).
52. Brand, A.H. and N. Perrimon, Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 1993. **118**(2): p. 401-15.
53. Garcia-Bellido, A., P. Ripoll, and G. Morata, Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol*, 1973. **245**(147): p. 251-3.
54. Korenkova, O., A. Pepe, and C. Zurzolo, Fine intercellular connections in development: TNTs, cytonemes, or intercellular bridges? *Cell Stress*, 2020. **4**(2): p. 30-43.
55. Ramirez-Weber, F.A. and T.B. Kornberg, Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, 1999. **97**(5): p. 599-607.
56. Driever, W. and C. Nusslein-Volhard, A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell*, 1988. **54**(1): p. 83-93.
57. Rogers, K.W. and A.F. Schier, Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 377-407.
58. Lee, J.J., et al., Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell*, 1992. **71**(1): p. 33-50.
59. Tabata, T. and T.B. Kornberg, Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, 1994. **76**(1): p. 89-102.
60. Spencer, F.A., F.M. Hoffmann, and W.M. Gelbart, Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 1982. **28**(3): p. 451-61.

61. Padgett, R.W., R.D. St Johnston, and W.M. Gelbart, A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature*, 1987. **325**(6099): p. 81-4.
62. Wolpert, L., Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol*, 1969. **25**(1): p. 1-47.
63. Lecuit, T., et al., Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature*, 1996. **381**(6581): p. 387-93.
64. Porter, J.A., K.E. Young, and P.A. Beachy, Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, 1996. **274**(5285): p. 255-9.
65. Bischoff, M., et al., Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(11): p. 1269-81.
66. Du, L., et al., Feedback regulation of cytoneme-mediated transport shapes a tissue-specific FGF morphogen gradient. *Elife*, 2018. **7**.
67. Gonzalez-Mendez, L., A.C. Gradilla, and I. Guerrero, The cytoneme connection: direct long-distance signal transfer during development. *Development*, 2019. **146**(9).
68. Bodeen, W.J., et al., A fixation method to preserve cultured cell cytonemes facilitates mechanistic interrogation of morphogen transport. *Development*, 2017. **144**(19): p. 3612-3624.
69. Chen, W., et al., Essential basal cytonemes take up Hedgehog in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development*, 2017. **144**(17): p. 3134-3144.
70. Gonzalez-Mendez, L., I. Seijo-Barandiaran, and I. Guerrero, *Cytoneme-mediated cell-cell contacts for Hedgehog reception*. *Elife*, 2017. **6**.
71. Demontis, F. and C. Dahmann, Apical and lateral cell protrusions interconnect epithelial cells in live *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Dyn*, 2007. **236**(12): p. 3408-18.

72. Gradilla, A.C., et al., Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5649.
73. Feinberg, E.H., et al., GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron*, 2008. **57**(3): p. 353-63.
74. Roy, S., F. Hsiung, and T.B. Kornberg, Specificity of *Drosophila* cytonemes for distinct signaling pathways. *Science*, 2011. **332**(6027): p. 354-8.
75. Hsiung, F., et al., Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature*, 2005. **437**(7058): p. 560-3.
76. Roy, S., et al., Cytoneme-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* decapentaplegic signaling protein. *Science*, 2014. **343**(6173): p. 1244624.
77. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
78. Gradilla, A.C. and I. Guerrero, Cytoneme-mediated cell-to-cell signaling during development. *Cell Tissue Res*, 2013. **352**(1): p. 59-66.
79. Couto, A., et al., An apicobasal gradient of Rac activity determines protrusion form and position. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15385.
80. Koizumi, K., et al., RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(23): p. 4647-61.
81. Galkina, S.I., et al., Inhibition of the GTPase dynamin or actin depolymerisation initiates outward plasma membrane tubulation/vesiculation (cytoneme formation) in neutrophils. *Biol Cell*, 2015. **107**(5): p. 144-58.
82. Gonzalez-Mendez, L., et al., Polarized sorting of Patched enables cytoneme-mediated Hedgehog reception in the *Drosophila* wing disc. *EMBO J*, 2020: p. e103629.
83. Hipfner, D.R. and S.M. Cohen, The *Drosophila* sterile-20 kinase slik controls cell proliferation and apoptosis during imaginal disc development. *PLoS Biol*, 2003. **1**(2): p. E35.

84. Hipfner, D.R., N. Keller, and S.M. Cohen, Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2243-8.
85. Panneton, V., et al., Regulation of Catalytic and Non-catalytic Functions of the Drosophila Ste20 Kinase Slik by Activation Segment Phosphorylation. *J Biol Chem*, 2015. **290**(34): p. 20960-71.
86. Roubinet, C., et al., Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol*, 2011. **195**(1): p. 99-112.
87. Kunda, P., et al., PP1-mediated moesin dephosphorylation couples polar relaxation to mitotic exit. *Curr Biol*, 2012. **22**(3): p. 231-6.
88. Speck, O., et al., Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature*, 2003. **421**(6918): p. 83-7.
89. Morrison, D.K., M.S. Murakami, and V. Cleghon, Protein kinases and phosphatases in the Drosophila genome. *J Cell Biol*, 2000. **150**(2): p. F57-62.
90. Manning, G., et al., The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
91. Hanks, S.K. and T. Hunter, Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 1995. **9**(8): p. 576-96.
92. Dan, I., N.M. Watanabe, and A. Kusumi, The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(5): p. 220-30.
93. Wu, C., et al., Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(27): p. 15984-92.
94. Miller, C.J., et al., Comprehensive profiling of the STE20 kinase family defines features essential for selective substrate targeting and signaling output. *PLoS Biol*, 2019. **17**(3): p. e2006540.

95. Zhu, G., Y. Liu, and S. Shaw, Protein kinase specificity. A strategic collaboration between kinase peptide specificity and substrate recruitment. *Cell Cycle*, 2005. **4**(1): p. 52-6.
96. Miller, C.J. and B.E. Turk, Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. *Trends Biochem Sci*, 2018. **43**(5): p. 380-394.
97. Delpire, E., The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflugers Arch*, 2009. **458**(5): p. 953-67.
98. Kuramochi, S., et al., LOK is a novel mouse STE20-like protein kinase that is expressed predominantly in lymphocytes. *J Biol Chem*, 1997. **272**(36): p. 22679-84.
99. Sabourin, L.A. and M.A. Rudnicki, Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase. *Oncogene*, 1999. **18**(52): p. 7566-75.
100. Pike, A.C., et al., Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *EMBO J*, 2008. **27**(4): p. 704-14.
101. Luhovy, A.Y., et al., Regulation of the Ste20-like kinase, SLK: involvement of activation segment phosphorylation. *J Biol Chem*, 2012. **287**(8): p. 5446-58.
102. Cybulsky, A.V., et al., Regulation of Ste20-like kinase, SLK, activity: Dimerization and activation segment phosphorylation. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0177226.
103. Zinovkina, L.A., et al., A proposed new mammalian cell protein kinase, associated with microtubules. *Mol Biol (Mosk)*, 1998. **32**(2): p. 341-8.
104. Chaar, Z., et al., v-Src-dependent down-regulation of the Ste20-like kinase SLK by casein kinase II. *J Biol Chem*, 2006. **281**(38): p. 28193-9.
105. Delarosa, S., et al., Activity of the Ste20-like kinase, SLK, is enhanced by homodimerization. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **301**(3): p. F554-64.
106. Jaber, A., et al., Identification of Tpr and alpha-actinin-4 as two novel SLK-interacting proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(10 Pt A): p. 2539-52.

107. Pelaseyed, T., et al., Ezrin activation by LOK phosphorylation involves a PIP2-dependent wedge mechanism. *Elife*, 2017. **6**.
108. Bagci, H., et al., Mapping the proximity interaction network of the Rho-family GTPases reveals signalling pathways and regulatory mechanisms. *Nat Cell Biol*, 2020. **22**(1): p. 120-134.
109. Endo, J., et al., Deficiency of a STE20/PAK family kinase LOK leads to the acceleration of LFA-1 clustering and cell adhesion of activated lymphocytes. *FEBS Lett*, 2000. **468**(2-3): p. 234-8.
110. Belkina, N.V., et al., LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(12): p. 4707-12.
111. Walter, S.A., et al., Stk10, a new member of the polo-like kinase family highly expressed in hematopoietic tissue. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18221-8.
112. Al-Zahrani, K.N., et al., Essential role for the SLK protein kinase in embryogenesis and placental tissue development. *Dev Dyn*, 2014. **243**(5): p. 640-51.
113. Itoh, S., et al., Molecular cloning and characterization of a novel putative STE20-like kinase in guinea pigs. *Arch Biochem Biophys*, 1997. **340**(2): p. 201-7.
114. Costigan, C., S. Gehrung, and M. Snyder, A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(3): p. 1162-78.
115. Hao, W., et al., Induction of apoptosis by the Ste20-like kinase SLK, a germinal center kinase that activates apoptosis signal-regulating kinase and p38. *J Biol Chem*, 2006. **281**(6): p. 3075-84.
116. Sabourin, L.A., et al., Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(2): p. 684-96.

117. Cybulsky, A.V., et al., The Ste20-like kinase SLK promotes p53 transactivation and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(4): p. F971-80.
118. Wagner, S., et al., Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule. Role in Rac1-mediated regulation of actin dynamics during cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37685-92.
119. Zinovkina, L.A., et al., Chinese hamster protein homologous to human putative protein kinase KIAA0204 is associated with nuclei, microtubules and centrosomes in CHO-K1 cells. *FEBS Lett*, 1997. **414**(1): p. 135-9.
120. Burakov, A.V., et al., Ste20-related protein kinase LOSK (SLK) controls microtubule radial array in interphase. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5): p. 1952-61.
121. Zhapparova, O.N., et al., Ste20-like protein kinase SLK (LOSK) regulates microtubule organization by targeting dynactin to the centrosome. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(20): p. 3205-14.
122. Fokin, A.I., et al., SLK/LOSK kinase regulates cell motility independently of microtubule organization and Golgi polarization. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016. **73**(2): p. 83-92.
123. Wagner, S., et al., FAK/src-family dependent activation of the Ste20-like kinase SLK is required for microtubule-dependent focal adhesion turnover and cell migration. *PLoS One*, 2008. **3**(4): p. e1868.
124. Roovers, K., et al., The Ste20-like kinase SLK is required for ErbB2-driven breast cancer cell motility. *Oncogene*, 2009. **28**(31): p. 2839-48.
125. Baron, K.D., et al., Recruitment and activation of SLK at the leading edge of migrating cells requires Src family kinase activity and the LIM-only protein 4. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(7): p. 1683-92.
126. Quizi, J.L., et al., SLK-mediated phosphorylation of paxillin is required for focal adhesion turnover and cell migration. *Oncogene*, 2013. **32**(39): p. 4656-63.

127. Guilluy, C., et al., Ste20-related kinase SLK phosphorylates Ser188 of RhoA to induce vasodilation in response to angiotensin II Type 2 receptor activation. *Circ Res*, 2008. **102**(10): p. 1265-74.
128. Ellinger-Ziegelbauer, H., et al., Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells. *Genes Cells*, 2000. **5**(6): p. 491-8.
129. Bretscher, A., Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J Cell Biol*, 1983. **97**(2): p. 425-32.
130. Tsukita, S., Y. Hieda, and S. Tsukita, A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J Cell Biol*, 1989. **108**(6): p. 2369-82.
131. Lankes, W.T. and H. Furthmayr, Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(19): p. 8297-301.
132. Lankes, W., et al., A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*, 1988. **251**(3): p. 831-42.
133. Doi, Y., et al., Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem*, 1999. **274**(4): p. 2315-21.
134. Shcherbina, A., et al., Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett*, 1999. **443**(1): p. 31-6.
135. Kikuchi, S., et al., Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet*, 2002. **31**(3): p. 320-5.
136. Saotome, I., M. Curto, and A.I. McClatchey, Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell*, 2004. **6**(6): p. 855-64.

137. Turunen, O., T. Wahlstrom, and A. Vaheri, Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol*, 1994. **126**(6): p. 1445-53.
138. Niggli, V., et al., Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett*, 1995. **376**(3): p. 172-6.
139. Hirao, M., et al., Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol*, 1996. **135**(1): p. 37-51.
140. Louvet-Vallee, S., ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell*, 2000. **92**(5): p. 305-16.
141. Clucas, J. and F. Valderrama, *ERM proteins in cancer progression*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 2): p. 267-75.
142. Ponuwei, G.A., A glimpse of the ERM proteins. *J Biomed Sci*, 2016. **23**: p. 35.
143. Polesello, C. and F. Payre, Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(6): p. 294-302.
144. Fievet, B., D. Louvard, and M. Arpin, ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(5): p. 653-60.
145. Gould, K.L., et al., cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *EMBO J*, 1989. **8**(13): p. 4133-42.
146. Funayama, N., et al., Radixin is a novel member of the band 4.1 family. *J Cell Biol*, 1991. **115**(4): p. 1039-48.
147. Hamada, K., et al., Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J*, 2000. **19**(17): p. 4449-62.
148. Pearson, M.A., et al., Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*, 2000. **101**(3): p. 259-70.

149. Barret, C., et al., Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol*, 2000. **151**(5): p. 1067-80.
150. Yonemura, S., et al., Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol*, 1998. **140**(4): p. 885-95.
151. Hamada, K., et al., Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J*, 2003. **22**(3): p. 502-14.
152. Reczek, D. and A. Bretscher, The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J Biol Chem*, 1998. **273**(29): p. 18452-8.
153. Hamada, K., et al., Crystallization and preliminary crystallographic studies of RhoGDI in complex with the radixin FERM domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001. **57**(Pt 6): p. 889-90.
154. Li, Q., et al., Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. *J Mol Biol*, 2007. **365**(5): p. 1446-59.
155. Bretscher, A., R. Gary, and M. Berryman, Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry*, 1995. **34**(51): p. 16830-7.
156. Gary, R. and A. Bretscher, Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell*, 1995. **6**(8): p. 1061-75.
157. Berryman, M., R. Gary, and A. Bretscher, Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *J Cell Biol*, 1995. **131**(5): p. 1231-42.

158. Nakamura, F., M.R. Amieva, and H. Furthmayr, Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J Biol Chem*, 1995. **270**(52): p. 31377-85.
159. Edwards, S.D. and N.H. Keep, The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry*, 2001. **40**(24): p. 7061-8.
160. Fievet, B.T., et al., Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol*, 2004. **164**(5): p. 653-9.
161. Oshiro, N., Y. Fukata, and K. Kaibuchi, Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem*, 1998. **273**(52): p. 34663-6.
162. Coscoy, S., et al., Molecular analysis of microscopic ezrin dynamics by two-photon FRAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12813-8.
163. Kitajiri, S., et al., Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *J Cell Biol*, 2004. **166**(4): p. 559-70.
164. Karagiosis, S.A. and D.F. Ready, Moesin contributes an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor morphogenesis. *Development*, 2004. **131**(4): p. 725-32.
165. Hiruma, S., et al., Dynamics and function of ERM proteins during cytokinesis in human cells. *FEBS Lett*, 2017. **591**(20): p. 3296-3309.
166. Ng, T., et al., Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J*, 2001. **20**(11): p. 2723-41.
167. Arpin, M., et al., Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr*, 2011. **5**(2): p. 199-206.
168. Elliott, B.E., et al., The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(3): p. R365-73.
169. Hua, D., et al., Human miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep*, 2012. **27**(3): p. 700-6.

170. Zhang, J., et al., Ezrin promotes invasion and migration of the MG63 osteosarcoma cell. *Chin Med J (Engl)*, 2014. **127**(10): p. 1954-9.
171. Li, Y.Y., C.X. Zhou, and Y. Gao, Moesin regulates the motility of oral cancer cells via MT1-MMP and E-cadherin/p120-catenin adhesion complex. *Oral Oncol*, 2015. **51**(10): p. 935-43.
172. Hong, H., et al., MicroRNA-200b Impacts Breast Cancer Cell Migration and Invasion by Regulating Ezrin-Radixin-Moesin. *Med Sci Monit*, 2016. **22**: p. 1946-52.
173. Yano, K., et al., Regulation of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines. *J Pharm Pharmacol*, 2020. **72**(4): p. 575-582.
174. McClatchey, A.I., et al., Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev*, 1998. **12**(8): p. 1121-33.
175. Horiguchi, A., et al., Inactivation of the NF2 tumor suppressor protein merlin in DU145 prostate cancer cells. *Prostate*, 2008. **68**(9): p. 975-84.
176. Cacev, T., et al., Loss of NF2/Merlin expression in advanced sporadic colorectal cancer. *Cell Oncol (Dordr)*, 2014. **37**(1): p. 69-77.
177. Gschwantler-Kaulich, D., et al., Increase in ezrin expression from benign to malignant breast tumours. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013. **36**(6): p. 485-91.
178. Ma, L. and T. Jiang, Clinical implications of Ezrin and CD44 coexpression in breast cancer. *Oncol Rep*, 2013. **30**(4): p. 1899-905.
179. Yu, L., et al., Moesin is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer. *Oncol Lett*, 2019. **17**(2): p. 1921-1933.
180. Kobel, M., et al., Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 2006. **25**(2): p. 121-30.

181. Schlecht, N.F., et al., Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*, 2012. **6**(2): p. 232-43.
182. Wang, X., M. Liu, and C.Y. Zhao, Expression of ezrin and moesin related to invasion, metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res*, 2014. **13**(3): p. 8002-13.
183. Lugowska, I., et al., The clinical significance of changes in ezrin expression in osteosarcoma of children and young adults. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 12071-12078.
184. Zhang, Y., et al., Osteosarcoma metastasis: prospective role of ezrin. *Tumour Biol*, 2014. **35**(6): p. 5055-9.
185. Zhong, G.X., et al., The clinical significance of the Ezrin gene and circulating tumor cells in osteosarcoma. *Onco Targets Ther*, 2017. **10**: p. 527-533.
186. Liu, Q., B. Xu, and W. Zhou, Correlation between chemotherapy resistance in osteosarcoma patients and PAK5 and Ezrin gene expression. *Oncol Lett*, 2018. **15**(1): p. 879-884.
187. Zhao, D.H., et al., Correlations of ezrin expression with pathological characteristics and prognosis of osteosarcoma: a meta-analysis. *ScientificWorldJournal*, 2014. **2014**: p. 837543.
188. Abdou, A.G., et al., The Prognostic Role of Ezrin and HER2/neu Expression in Osteosarcoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2016. **24**(5): p. 355-63.
189. Ren, L. and C. Khanna, Role of ezrin in osteosarcoma metastasis. *Adv Exp Med Biol*, 2014. **804**: p. 181-201.
190. Cui, Y., et al., Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. *Int J Cancer*, 2009. **124**(7): p. 1614-21.
191. Abiatari, I., et al., Moesin-dependent cytoskeleton remodelling is associated with an anaplastic phenotype of pancreatic cancer. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(5): p. 1166-79.

192. Liang, L., et al., Correlations of Moesin expression with the pathological stage, nerve infiltration, tumor location and pain severity in patients with pancreatic cancer. *J BUON*, 2019. **24**(3): p. 1225-1232.
193. Bartholow, T.L., et al., Immunohistochemical staining of radixin and moesin in prostatic adenocarcinoma. *BMC Clin Pathol*, 2011. **11**: p. 1.
194. Moreno, C.S., et al., WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 2000. **275**(8): p. 5257-63.
195. Goudreault, M., et al., A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(1): p. 157-71.
196. Chen, R., et al., STRIPAK integrates upstream signals to initiate the Hippo kinase cascade. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(12): p. 1565-1577.
197. Kuck, U., D. Radchenko, and I. Teichert, STRIPAK, a highly conserved signaling complex, controls multiple eukaryotic cellular and developmental processes and is linked with human diseases. *Biol Chem*, 2019.
198. Janssens, V. and J. Goris, Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
199. Moreno, C.S., W.S. Lane, and D.C. Pallas, A mammalian homolog of yeast MOB1 is both a member and a putative substrate of striatin family-protein phosphatase 2A complexes. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 24253-60.
200. Gordon, J., et al., Protein phosphatase 2a (PP2A) binds within the oligomerization domain of striatin and regulates the phosphorylation and activation of the mammalian Ste20-Like kinase Mst3. *BMC Biochem*, 2011. **12**: p. 54.

201. Ribeiro, P.S., et al., Combined functional genomic and proteomic approaches identify a PP2A complex as a negative regulator of Hippo signaling. *Mol Cell*, 2010. **39**(4): p. 521-34.
202. Zheng, Y., et al., Homeostatic Control of Hpo/MST Kinase Activity through Autophosphorylation-Dependent Recruitment of the STRIPAK PP2A Phosphatase Complex. *Cell Rep*, 2017. **21**(12): p. 3612-3623.
203. Kim, J.W., et al., STRIPAK directs PP2A activity toward MAP4K4 to promote oncogenic transformation of human cells. *Elife*, 2020. **9**.
204. Sangodkar, J., et al., All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J*, 2016. **283**(6): p. 1004-24.
205. Chen, F., et al., Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2007. **17**(4): p. 293-303.
206. Kean, M.J., et al., Structure-function analysis of core STRIPAK Proteins: a signaling complex implicated in Golgi polarization. *J Biol Chem*, 2011. **286**(28): p. 25065-75.
207. Benoist, M., S. Gaillard, and F. Castets, The striatin family: a new signaling platform in dendritic spines. *J Physiol Paris*, 2006. **99**(2-3): p. 146-53.
208. Chen, C., et al., Striatins contain a noncanonical coiled coil that binds protein phosphatase 2A A subunit to form a 2:2 heterotetrameric core of striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) complex. *J Biol Chem*, 2014. **289**(14): p. 9651-61.
209. Tang, Y., et al., Architecture, substructures, and dynamic assembly of STRIPAK complexes in Hippo signaling. *Cell Discov*, 2019. **5**: p. 3.
210. Smith, T.F., et al., The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(5): p. 181-5.
211. Ribeiro, P.S., et al., Combined Functional Genomic and Proteomic Approaches Identify a PP2A Complex as a Negative Regulator of Hippo Signaling. *Molecular Cell*, 2010. **39**(August 27, 2010): p. 521–534.

212. Ashton-Beaucage, D., et al., A functional screen reveals an extensive layer of transcriptional and splicing control underlying RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol*, 2014. **12**(3): p. e1001809.
213. Madsen, L., et al., Human ASPL/TUG interacts with p97 and complements the proteasome mislocalization of a yeast ubx4 mutant, but not the ER-associated degradation defect. *BMC Cell Biol*, 2014. **15**: p. 31.
214. Ohoka, Y. and Y. Takai, Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90. *Genes Cells*, 1998. **3**(9): p. 603-12.
215. Uetz, P., et al., A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2000. **403**(6770): p. 623-7.
216. Poggeler, S. and U. Kuck, A WD40 repeat protein regulates fungal cell differentiation and can be replaced functionally by the mammalian homologue striatin. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(1): p. 232-40.
217. Madsen, C.D., et al., STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(1): p. 68-80.
218. Yu, F.X., B. Zhao, and K.L. Guan, Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*, 2015. **163**(4): p. 811-28.
219. Neal, S.J., Q. Zhou, and F. Pignoni, STRIPAK-PP2A regulates Hippo-Yorkie signaling to suppress retinal fate in the *Drosophila* eye disc peripodial epithelium. *J Cell Sci*, 2020.
220. Hyodo, T., et al., Misshapen-like kinase 1 (MINK1) is a novel component of striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) and is required for the completion of cytokinesis. *J Biol Chem*, 2012. **287**(30): p. 25019-29.
221. Bai, S.W., et al., Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biol*, 2011. **9**: p. 54.

222. Rohn, J.L., et al., Comparative RNAi screening identifies a conserved core metazoan actinome by phenotype. *J Cell Biol*, 2011. **194**(5): p. 789-805.
223. Sakuma, C., et al., Drosophila Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5180.
224. Sakuma, C., et al., A STRIPAK component Strip regulates neuronal morphogenesis by affecting microtubule stability. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17769.
225. Neisch, A.L., T.P. Neufeld, and T.S. Hays, A STRIPAK complex mediates axonal transport of autophagosomes and dense core vesicles through PP2A regulation. *J Cell Biol*, 2017. **216**(2): p. 441-461.
226. Hutchins, J.R., et al., Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science*, 2010. **328**(5978): p. 593-9.
227. Castets, F., et al., Zinedin, SG2NA, and striatin are calmodulin-binding, WD repeat proteins principally expressed in the brain. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 19970-7.
228. Bartoli, M., et al., Down-regulation of striatin, a neuronal calmodulin-binding protein, impairs rat locomotor activity. *J Neurobiol*, 1999. **40**(2): p. 234-43.
229. Hunter, K.W., Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(5): p. 201-4.
230. Wang, Q., et al., Moesin Expression Is Associated with Glioblastoma Cell Proliferation and Invasion. *Anticancer Res*, 2017. **37**(5): p. 2211-2218.
231. Koenderink, G.H. and E.K. Paluch, Architecture shapes contractility in actomyosin networks. *Curr Opin Cell Biol*, 2018. **50**: p. 79-85.
232. Stephens, D.J., Functional coupling of microtubules to membranes - implications for membrane structure and dynamics. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 12): p. 2795-804.
233. Nakajima, Y., et al., Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation. *Nature*, 2013. **500**(7462): p. 359-62.

234. Roch, F., et al., Differential roles of PtdIns(4,5)P₂ and phosphorylation in moesin activation during Drosophila development. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 12): p. 2058-67.
235. Tan, J., et al., PI4KIIIalpha is required for cortical integrity and cell polarity during Drosophila oogenesis. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 5): p. 954-66.
236. Hwang, J. and D.C. Pallas, STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. **47**: p. 118-48.
237. Shi, Z., S. Jiao, and Z. Zhou, STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. *Oncogene*, 2016. **35**(35): p. 4549-57.
238. Kyriakis, J.M., Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem*, 1999. **274**(9): p. 5259-62.
239. Cohen, P., S. Klumpp, and D.L. Schelling, An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett*, 1989. **250**(2): p. 596-600.
240. Favre, B., P. Turowski, and B.A. Hemmings, Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem*, 1997. **272**(21): p. 13856-63.
241. Janssens, V., J. Goris, and C. Van Hoof, *PP2A: the expected tumor suppressor*. *Curr Opin Genet Dev*, 2005. **15**(1): p. 34-41.
242. Mehsen, H., et al., PP2A-B55 promotes nuclear envelope reformation after mitosis in Drosophila. *J Cell Biol*, 2018. **217**(12): p. 4106-4123.
243. Strack, S., J.T. Cribbs, and L. Gomez, Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. *J Biol Chem*, 2004. **279**(46): p. 47732-9.
244. Plutoni, C., et al., Misshapen coordinates protrusion restriction and actomyosin contractility during collective cell migration. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3940.

245. Elramli, N., et al., Assembly of a heptameric STRIPAK complex is required for coordination of light-dependent multicellular fungal development with secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet*, 2019. **15**(3): p. e1008053.
246. Bodenmiller, B. and R. Aebersold, Phosphoproteome resource for systems biology research. *Methods Mol Biol*, 2011. **694**: p. 307-22.
247. Gnad, F., J. Gunawardena, and M. Mann, PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D253-60.
248. Hu, Y., et al., iProteinDB: An Integrative Database of Drosophila Post-translational Modifications. *G3 (Bethesda)*, 2019. **9**(1): p. 1-11.
249. Das, S., J.E. Dixon, and W. Cho, Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7491-6.
250. Thelen, M., et al., Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature*, 1991. **351**(6324): p. 320-2.
251. Kurotani, A., et al., Localization-specific distributions of protein pI in human proteome are governed by local pH and membrane charge. *BMC Mol Cell Biol*, 2019. **20**(1): p. 36.
252. Nilsson, J., Protein phosphatases in the regulation of mitosis. *J Cell Biol*, 2019. **218**(2): p. 395-409.
253. Frost, A., et al., Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1339-52.
254. Ramkumar, N. and B. Baum, Coupling changes in cell shape to chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016. **17**(8): p. 511-21.
255. Zecca, M. and G. Struhl, A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth. *PLoS Biol*, 2010. **8**(6): p. e1000386.

256. Roubinet, C., P.T. Tran, and M. Piel, Common mechanisms regulating cell cortex properties during cell division and cell migration. *Cytoskeleton* (Hoboken), 2012. **69**(11): p. 957-72.
257. Trammell, M.A., et al., Mob4 plays a role in spindle focusing in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 8): p. 1284-92.
258. Bae, S.J., et al., SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK. *Elife*, 2017. **6**.
259. Bae, S.J., L. Ni, and X. Luo, STK25 suppresses Hippo signaling by regulating SAV1-STRIPAK antagonism. *Elife*, 2020. **9**.
260. Kornberg, T.B. and S. Roy, Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development*, 2014. **141**(4): p. 729-36.
261. Kornberg, T.B., Distributing signaling proteins in space and time: the province of cytonemes. *Curr Opin Genet Dev*, 2017. **45**: p. 22-27.
262. Huang, H. and T.B. Kornberg, Myoblast cytonemes mediate Wg signaling from the wing imaginal disc and Delta-Notch signaling to the air sac primordium. *Elife*, 2015. **4**: p. e06114.
263. Peng, Y., C. Han, and J.D. Axelrod, Planar polarized protrusions break the symmetry of EGFR signaling during *Drosophila* bract cell fate induction. *Dev Cell*, 2012. **23**(3): p. 507-18.
264. Huang, H., S. Liu, and T.B. Kornberg, *Glutamate signaling at cytoneme synapses*. *Science*, 2019. **363**(6430): p. 948-955.
265. Kornberg, T.B., Cytonemes and the dispersion of morphogens. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2014. **3**(6): p. 445-63.
266. Lant, B., et al., CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6449.
267. Rousso, T., et al., Apical targeting of the formin Diaphanous in *Drosophila* tubular epithelia. *Elife*, 2013. **2**: p. e00666.

268. Williams, M.J., M.S. Habayeb, and D. Hultmark, Reciprocal regulation of Rac1 and Rho1 in *Drosophila* circulating immune surveillance cells. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 3): p. 502-11.
269. Storbeck, C.J., et al., Distinct roles for Ste20-like kinase SLK in muscle function and regeneration. *Skelet Muscle*, 2013. **3**(1): p. 16.
270. Horn, T., et al., Mapping of signaling networks through synthetic genetic interaction analysis by RNAi. *Nat Methods*, 2011. **8**(4): p. 341-6.
271. Anitei, M. and B. Hoflack, Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat Cell Biol*, 2011. **14**(1): p. 11-9.
272. Hessvik, N.P. and A. Llorente, Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(2): p. 193-208.
273. Vanlandingham, P.A. and B.P. Ceresa, Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*, 2009. **284**(18): p. 12110-24.
274. Martin-Castellanos, C. and B.A. Edgar, A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development*, 2002. **129**(4): p. 1003-13.
275. Wartlick, O., et al., Dynamics of Dpp signaling and proliferation control. *Science*, 2011. **331**(6021): p. 1154-9.
276. Storbeck, C.J., et al., The Ldb1 and Ldb2 transcriptional cofactors interact with the Ste20-like kinase SLK and regulate cell migration. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(19): p. 4174-82.
277. Kozlowski, L.P., Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(D1): p. D1112-D1116.
278. Pergande, M.R. and S.M. Cologna, Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. *Proteomes*, 2017. **5**(1).

279. Frosst, P., et al., Tpr is localized within the nuclear basket of the pore complex and has a role in nuclear protein export. *J Cell Biol*, 2002. **156**(4): p. 617-30.
280. Rodrigues, N.T., et al., Kinetochore-localized PP1-Sds22 couples chromosome segregation to polar relaxation. *Nature*, 2015. **524**(7566): p. 489-92.
281. Trinkle-Mulcahy, L., et al., Repo-Man recruits PP1 gamma to chromatin and is essential for cell viability. *J Cell Biol*, 2006. **172**(5): p. 679-92.
282. Preisinger, C., et al., Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signalling. *EMBO J*, 2005. **24**(4): p. 753-65.
283. Nasa, I., et al., Aurora B opposes PP1 function in mitosis by phosphorylating the conserved PP1-binding RVxF motif in PP1 regulatory proteins. *Sci Signal*, 2018. **11**(530).
284. Dephoure, N., et al., A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(31): p. 10762-7.
285. Olsen, J.V., et al., Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*, 2010. **3**(104): p. ra3.
286. Petrone, A., et al., Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2016. **15**(7): p. 2448-61.
287. Wang, P., X. Pinson, and V. Archambault, PP2A-twins is antagonized by greatwall and collaborates with polo for cell cycle progression and centrosome attachment to nuclei in drosophila embryos. *PLoS Genet*, 2011. **7**(8): p. e1002227.
288. Porter, I.M., et al., Bod1 regulates protein phosphatase 2A at mitotic kinetochores. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2677.
289. Ma, S., et al., Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1. *J Cell Sci*, 2016. **129**(7): p. 1329-39.
290. Bollen, M., D.W. Gerlich, and B. Lesage, Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol*, 2009. **19**(10): p. 531-41.

291. Foley, E.A., M. Maldonado, and T.M. Kapoor, Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(10): p. 1265-71.
292. Swaffer, M.P., et al., CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, 2016. **167**(7): p. 1750-1761 e16.
293. Banfalvi, G., Overview of cell synchronization. *Methods Mol Biol*, 2011. **761**: p. 1-23.
294. Sutterlin, C., et al., Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 359-69.
295. Kondylis, V. and C. Rabouille, The Golgi apparatus: lessons from *Drosophila*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(23): p. 3827-38.
296. Valente, C. and A. Colanzi, Mechanisms and Regulation of the Mitotic Inheritance of the Golgi Complex. *Front Cell Dev Biol*, 2015. **3**: p. 79.
297. Ukken, F.P., et al., Slik and the receptor tyrosine kinase Breathless mediate localized activation of Moesin in terminal tracheal cells. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e103323.
298. Katzemich, A., et al., Slik phosphorylation of Talin T152 is crucial for proper Talin recruitment and maintenance of muscle attachment in *Drosophila*. *Development*, 2019. **146**(20).
299. Hughes, S.C. and R.G. Fehon, Phosphorylation and activity of the tumor suppressor Merlin and the ERM protein Moesin are coordinately regulated by the Slik kinase. *J Cell Biol*, 2006. **175**(2): p. 305-13.
300. Mattes, B. and S. Scholpp, Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochem Cell Biol*, 2018. **150**(5): p. 431-442.
301. Sanders, A.A. and I. Kaverina, Nucleation and Dynamics of Golgi-derived Microtubules. *Front Neurosci*, 2015. **9**: p. 431.

302. Stanganello, E., et al., Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 5846.
303. Roehlecke, C. and M.H.H. Schmidt, Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(4).
304. Abounit, S. and C. Zurzolo, Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 5): p. 1089-98.
305. Hanna, S.J., et al., The Role of Rho-GTPases and actin polymerization during Macrophage Tunneling Nanotube Biogenesis. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 8547.
306. Parker, I., et al., Lattice light sheet imaging of membrane nanotubes between human breast cancer cells in culture and in brain metastases. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 11029.
307. Fereres, S., et al., Cytoneme-mediated signaling essential for tumorigenesis. *PLoS Genet*, 2019. **15**(9): p. e1008415.
308. Pietras, K. and A. Ostman, Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(8): p. 1324-31.
309. Biro, M., et al., Cell cortex composition and homeostasis resolved by integrating proteomics and quantitative imaging. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2013. **70**(11): p. 741-54.
310. Serres, M.P., et al., F-Actin Interactome Reveals Vimentin as a Key Regulator of Actin Organization and Cell Mechanics in Mitosis. *Dev Cell*, 2020. **52**(2): p. 210-222 e7.
311. Furutani, Y. and Y. Yoshihara, Proteomic Analysis of Dendritic Filopodia-Rich Fraction Isolated by Telencephalin and Vitronectin Interaction. *Front Synaptic Neurosci*, 2018. **10**: p. 27.
312. Chuang, C.F., et al., Unbiased Proteomic Study of the Axons of Cultured Rat Cortical Neurons. *J Proteome Res*, 2018. **17**(5): p. 1953-1966.

